



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO
MESTRADO PROFISSIONAL DE FORMAÇÃO PARA A PESQUISA
BIOMÉDICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FORMAÇÃO TÉCNICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: BIOFÍSICA E FISIOLOGIA

AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS DE ANÁLISE PARA FUNGOS PRESENTES NO AR DE
AMBIENTES INTERIORES

LEILE DE SOUZA LIMA

Rio de Janeiro
Junho de 2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO
MESTRADO PROFISSIONAL DE FORMAÇÃO PARA A PESQUISA
BIOMÉDICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FORMAÇÃO TÉCNICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: BIOFÍSICA E FISILOGIA

AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS DE ANÁLISE PARA FUNGOS PRESENTES NO AR DE
AMBIENTES INTERIORES

LEILE DE SOUZA LIMA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Formação Técnica do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção de título de Mestre em Formação para a Pesquisa Biomédica. Área de concentração: Biofísica e Fisiologia.

Orientadoras:
Susana Frases e Marcia Attias.

Rio de Janeiro
Junho de 2014

AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS DE ANÁLISE PARA FUNGOS PRESENTES NO AR DE AMBIENTES INTERIORES

LEILE DE SOUZA LIMA

Orientadoras: Susana Frases e Marcia Attias

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Formação Técnica do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção de título de Mestre em Formação para a Pesquisa Biomédica. Área de concentração: Biofísica e Fisiologia.

Dra. Susana Frases. IBCCF-UFRJ (Orientadora)

Dra. Marcia Attias. IBCCF-UFRJ (Orientadora)

Dra. Jennifer Lowe. IBCCF-UFRJ (Presidente)

Dr. Celso Barbosa Sant'Anna. INMETRO (Membro da Banca)

Dra. Rosely Zancope de Oliveira. FIOCRUZ (Membro da Banca)

Dr. Rodrigo Paes de Almeida. FIOCRUZ (Suplente externo)

Dra. Sonia Rozental. IBCCF-UFRJ (Revisora e Suplente interna)

FICHA CATALOGRÁFICA

LIMA, LEILE DE SOUZA

AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS DE ANÁLISE PARA FUNGOS PRESENTES NO AR DE AMBIENTES INTERIORES/ Leile de Souza Lima. – Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2014.

Orientadoras: Susana Frases e Marcia Attias

Dissertação (mestrado profissional) – Universidade Federal do Rio de Janeiro / Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho / Programa de Pós-graduação em Formação Técnica, 2014.

Referências Bibliográficas: f. 91-96

1. Qualidade do ar interior; 2. Fungos anemófilos; 3. Amostragem ativa; 4. Amostragem passiva; 5. Normas e legislações. I. Frases, Susana; II. Attias, Marcia; III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho; IV. Título.

Dedico esta dissertação ao meu marido, Frederyco, que me ensina como ser melhor a cada dia e que transforma meu mundo com seu amor e dedicação.

AGRADECIMENTOS

As minhas orientadoras, Prof. Susana Frases e Prof. Marcia Attias, pela confiança em mim depositada. Principalmente a Prof. Susana que antes de tudo, sempre foi uma grande amiga.

Aos Professores Eloi Garcia e Wanderley de Souza pela oportunidade concedida em participar deste programa de pós graduação.

Aos Laboratórios LUCHM (UFRJ) e LAMIC (INMETRO) pelo apoio financeiro de toda parte experimental deste trabalho.

Ao Dr. Rodrigo Almeida pela imprescindível colaboração na identificação dos fungos isolados.

Aos colegas de laboratório por toda ajuda e torcida, principalmente a Carol, Dani, Glauber, Vanessa e Naty.

Aos meus alunos de IC, Fernanda, Marcus e Vinicius pela ajuda nos experimentos.

A todos os colegas do mestrado profissional, principalmente a Rafa, Felipe, Jorgete e Joana pelas trocas durante todo o mestrado e companheirismo.

Aos meus queridos amigos pelas dicas e incentivos frequentes.

A minha família pelo amor e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida, principalmente a minha mãe que é minha base de tudo.

Ao meu marido, pela enorme paciência e estímulo ao longo desta jornada.

E a sociedade brasileira que nos impulsiona a desenvolver o nosso trabalho.

RESUMO

LIMA, LEILE DE SOUZA. **Avaliação dos métodos de análise fungos presentes no ar de ambientes interiores**. Rio de Janeiro, 2013. Dissertação (Mestrado Profissional de Formação para Pesquisa Biomédica) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Nas últimas décadas, a importância da qualidade do ar interior (QAI) tem sido enfatizada, principalmente com relação aos contaminantes biológicos, devido aos prejuízos que podem causar a saúde humana. Dentre os poluentes biológicos, os fungos são amplamente descritos em estudos relacionados à QAI por serem agentes de doenças crônicas e disseminadas com possibilidade de óbito. Para avaliação da QAI, metodologias classificadas como passivas e ativas são utilizadas baseadas na contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs). Os parâmetros brasileiros para avaliação de ambientes interiores são preconizados pela Resolução (RE) nº09/2003 da ANVISA. Nosso objetivo fundamenta-se na avaliação da eficácia de métodos passivos e ativos de detecção de fungos utilizados na análise da QAI em dois ambientes distintos. A metodologia do nosso trabalho foi baseada na RE nº09/2003. Os locais climatizados selecionados foram de naturezas distintas, um com e outro sem aeração natural. As coletas foram realizadas por amostragem Passiva (sedimentação espontânea), Ativa (amostrador de ar por impactação com acelerador linear) e Direta (filtros dos climatizadores). As células obtidas foram cultivadas em meio Batata Dextrose Agar (BDA), incubadas a 30°C por 4 dias e repicadas até o isolamento. Posteriormente, foram incubadas a 37°C para verificação de potenciais patógenos. No ambiente sem aeração foi obtido um total de 924 UFCs sendo 52 por amostragem Passiva, 800 por amostragem Ativa e 72 por amostragem Direta. A diversidade morfológica alcançada foi de 46 filamentosos e 9 leveduras. Dos 55 fungos isolados 12 fungos foram positivos no crescimento a 37°C. A microbiota anemófila inclui os gêneros *Aspergillus* sp., *Rizopus* sp. *Mucor* sp., *Fusarium* sp., *Trichoderma* sp., *Scytalidium* sp., *Exophiala* sp., Família *Dematiaceae*, *Hormonema dematioides*, além de fungos não esporulados e espécies desconhecidas. No ambiente com aeração natural a concentração de fungos foi de 137 UFCs, sendo 124 por amostragem Ativa e 13 por amostragem Passiva. Neste ambiente a amostragem Direta não foi realizada, pois a

ventilação natural é utilizada predominantemente para a renovação do ar. A diversidade morfológica alcançada foi de 23 filamentosos e 1 levedura, onde 6 fungos foram positivos para crescimento a 37°C. Dentre eles, estão os gêneros *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Paecilomyces* sp., fungos não esporulados e espécies desconhecidas.

Nossos resultados apontam que a amostragem Ativa se destacou recuperando o maior número de esporos presentes nos dois ambientes: 87% no ambiente sem aeração natural e 90% no ambiente com aeração natural. A amostragem Passiva, em ambos os casos, recuperou concentrações inferiores, 5,6% no ambiente sem aeração natural e 10% no ambiente com aeração natural. Além disso, a amostragem Passiva não mostrou diferença na recuperação de esporos entre um ambiente muito contaminado e pouco contaminado. Nossos resultados apontam que os parâmetros para avaliar a concentração de poluentes biológicos precisam ser reavaliados pela ANVISA, pois os critérios estabelecidos para avaliar a QAI contidos na norma podem subestimar concentração fúngica do interior de um ambiente. Apesar da amostragem ativa ter demonstrado maior eficácia, concluímos que se faz necessário o estabelecimento de critérios bioanalíticos que possam validar a metodologia Ativa possibilitando a comprovação de sua eficiência.

Palavras chave: Qualidade do ar interior; Fungos anemófilos, Amostragem ativa, Amostragem passiva, Normas e legislações.

ABSTRACT

LIMA, LEILE DE SOUZA. **Evaluation of methods for analyzing fungi present in the air indoors.** Rio de Janeiro, 2013 Dissertation (Masters of Professional Training for Biomedical Research) - Institute of Biophysics Carlos Chagas Filho, Federal University of Rio de Janeiro.

In recent decades, the importance of indoor air quality (IAQ) has been emphasized, particularly concerning to biological contaminants, due to the damage that it can cause to human health. Among the organic pollutants, fungi are widely described in studies related to IAQ, once they are agents of chronic diseases and disseminated with the possibility of death. In order to evaluate the IAQ, methodologies classified as passive and active are used based on the count of colony forming units (CFUs). Brazilian parameters for evaluation of indoor environments are recommended by the Resolution (ER) n ° 09/2003 of ANVISA. Brazilian parameters for evaluation of indoor environments are recommended by the Resolution (ER) n ° 09/2003 of ANVISA. Our goal is based on the evaluation of the effectiveness of active and passive methods of detection of fungi used in the analysis of IAQ in two different environments. The methodology of our study was based on Report No 09/2003. The air-conditioned locations selected were of different natures, one with and one without natural aeration. Fungal cells suspended in the air in both environments were collected by passive sampling (spontaneous sedimentation), ACTIVE (impaction air sampler with linear accelerator) and Direct (filters of air conditioners). Cells were grown up in PDA medium and incubated at 30°C for 4 days and passaged until the insulation. Subsequently, they were incubated at 37°C for evaluation of potential pathogens. In the environment without airing, a total of 924 CFU were obtained, according to the methodology: 52 CFU by Passive sampling, 800 CFU by Active sampling and 72 by Direct sampling. The morphological diversity achieved was 45 filamentous and 9 yeast. 12 of the 54 fungal isolates were positive for fungal growth at 37 ° C. The airborne microbiota includes the genera *Aspergillus* sp., *Rizopus* sp., *Mucor* sp., *Fusarium* sp., *Phialophora* sp., *Trichoderma* sp., *Scytalidium* sp., *Exophiala* sp., *Dematiaceae* Family, *Hormonema dematioides* and non- sporulating fungi and other unknown species. In an environment with natural aeration the concentration of fungi was 137 CFU, composed by 124 Active

samples and 13 Passive samples. In this environment the direct sampling was not conducted, since natural ventilation is used predominantly for fresh air. The morphological diversity achieved was 23 filamentous and 1 yeasts, where six were positive for fungal growth at 37°C. Among them we found the genera *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Paecilomyces* sp., nonsporting fungi and unknown species. Our results indicate that Active sampling is the most effective methodology for recovering the highest number of spores present in both environments: 87 % on the environment without natural aeration and 90 % on the environment with natural aeration. The Passive sampling in both cases, recovered concentrations below 5.6% in the natural environment without aeration and 10% on the environment with natural aeration. Furthermore, the passive sampling showed no difference in recovery the spores when comparing very contaminated and little contaminated environments. Our results indicate that the parameters for evaluating the concentration of biological pollutants need to be reassessed by ANVISA, since the criteria used to evaluate the IAQ described in the resolution may underestimate fungal concentration within an environment. Although active sampling had shown greater efficacy, we conclude that it is necessary to establish bioanalytical criteria that can validate Active methodology in order to prove its efficiency.

Keywords: Indoor air quality; Airborne fungi, active sampling, passive sampling, standards and laws.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. Ambiente climatizado sem ventilação natural	47
FIGURA 2. Ambiente climatizado com ventilação natural	48
FIGURA 3. Imagens do ambiente climatizado sem ventilação natural onde as amostragens foram realizadas	50
FIGURA 4. Imagens do tipo de amostrador de ar utilizado	51
FIGURA 5. Montagem de microcultivo para análise microscópica de fungos filamentosos	55
FIGURA 6. Foto do sistema VITEK II utilizado nas identificações das leveduras.....	56
FIGURA 7. Imagem das provas de assimilação de carboidratos realizadas pelo kit comercial API [®] 20 C AUX	57
FIGURA 8. Culturas mistas obtidas pelos diferentes tipos de amostragens realizados no ambiente climatizado sem ventilação natural	59
FIGURA 9. Culturas mistas obtidas pelos diferentes tipos de amostragens realizados no ambiente climatizado com ventilação natural	60
FIGURA 10. Gráfico comparativo entre as amostragens passivas realizadas	61
FIGURA 11. Gráfico comparativo entre as amostragens ativas realizadas	62
FIGURA 12. Placas de cultura mista obtidas pela amostragem direta	63
FIGURA 13. Comparativo entre as UFCs totais obtidas nos ambientes amostrados.....	64
FIGURA 14. Gráfico comparativo entre as amostragens realizadas no ambiente sem ventilação natural	64
FIGURA 15. Gráfico comparativo entre as amostragens realizadas no ambiente com ventilação natural	65
FIGURA 16. Método utilizado para identificação macroscópica dos isolados contida nas fichas de identificação	63

FIGURA 17. Estruturas fúngicas visualizadas por Microscopia Óptica (100x) obtidas dos fungos isolados no ambiente sem aeração natural	67
FIGURA 18. Estruturas fúngicas visualizadas por Microscopia Óptica (100x) obtidas dos fungos isolados no ambiente com aeração natural	68

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Principais poluentes não-biológicos produzidos em interiores.....	24
TABELA 2. Parâmetros físicos para ambientes internos climatizados artificialmente determinados pela RE nº176/00 ANVISA	33
TABELA 3. Número mínimo de amostras necessário para avaliação do ambiente interior em função da área construída	35
TABELA 4. Diferenciação dos níveis de risco baseados na atividade desenvolvida de acordo com a CP 109/03.....	36
TABELA 5. Limites máximos de poluentes biológicos tolerados pela CP nº 109/03	36
TABELA 6. Comparação entre as características das metodologias passiva e ativa	39
TABELA 7. Descrição das Características macroscópicas apresentadas por fungos após crescimento em meio sólido	43
TABELA 8: Quantidade de UFCs totais obtidas no ambiente climatizado sem ventilação natural	58
TABELA 9: Quantidade de UFCs totais obtidas no ambiente climatizado com ventilação natural	60
TABELA 10. Detalhes bioquímicos dos testes realizados pelo VITEK II nas leveduras isoladas dos ambientes avaliados	70
TABELA 11. Detalhes bioquímicos dos testes realizados pelo API® 20 nas leveduras isoladas dos ambientes avaliados	71
TABELA 12. Tabela dos fungos com possíveis potenciais patógenos isolados no ambiente climatizado sem ventilação natural	74
TABELA 13. Tabela dos fungos com possíveis potenciais patógenos isolados no ambiente climatizado com ventilação natural	75

LISTA DE SIGLAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas

ABPA - Aspergilose bronco-pulmonar alérgica

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BDA - Batata Dextrose Ágar

BRASINDOOR - Sociedade Brasileira de Meio Ambiente e Controle da Qualidade do Ar de Interiores

CCS - Centro de Ciências da Saúde

CO – Monóxido de Carbono

CO₂ – Dióxido de Carbono

COV – Compostos orgânicos voláteis

DER – Doenças Relacionadas a Edifícios

IBCCF - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

IgE - Imunoglobulina E

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia.

LUCHM - Laboratório de Ultra Estrutura Celular Herta Meyer

MAPA - Micose bronco-pulmonar alérgica

NaCl – Cloreto de sódio

NO₂ – Dióxido de Nitrogênio

NO_x- Óxidos de Nitrogênio

NT- Normas Técnicas

OMS - Organização Mundial de saúde

P/S - Penicilina/Steptomycin

PMOC - Plano de Manutenção, Operação e Controle.

QAI – Qualidade do ar interior

RE – Resolução

SED - Síndrome do Edifício Doente

TR – Toneladas de refrigeração

UFC - Unidade Formadoras de Colônia

UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro

UTIs – Unidade de Terapia Intensiva

VRM- valores máximos recomendáveis

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 HISTÓRICO	21
1.2 POLUENTES DO AR INTERIOR	22
1.2.1 Poluentes não-biológicos	23
1.2.2 Poluentes biológicos	23
1.2.2.1 Bactérias	25
1.2.2.2 Fungos	26
1.3 QUALIDADE DO AR INTERIOR (QAI)	27
1.3.1 Síndrome do Edifício Doente (SED)	28
1.3.2 Fungos e a QAI	29
1.4 NORMATIVAS E LEGISLAÇÕES BRASILEIRAS PARA QAI	30
1.4.1 Sociedade Brasileira de Meio Ambiente e Controle da Qualidade do Ar de Interiores (BRASINDOOR)	30
1.4.2 Portaria nº 3.523 de 28 de Agosto de 1998 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)	31
1.4.3 Resolução nº 176 e Resolução nº 09 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)	32
1.4.4 Consulta Pública nº 109, de 11 de Dezembro de 2003	35
1.4.5 Decreto municipal nº 22496 de 18 de Dezembro de 2002	37
1.4.6 NBR 15848:2010, de 11 de Junho de 2010 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT)	37
1.5 METODOLOGIAS BIOANALÍTICAS DISPONÍVEIS PARA AVALIAÇÃO DA QAI	38

1.6 METODOLOGIAS BIOANALÍTICAS DISPONÍVEIS PARA AVALIAÇÃO DA QAI	40
2 JUSTIFICATIVA	43
3 OBJETIVO GERAL	44
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
4 METODOLOGIA	45
4.1 AMBIENTES SELECIONADOS E PONTOS DE COLETA	45
4.1.1 Ambiente climatizado sem ventilação natural	45
4.1.2 Ambiente climatizado com ventilação natural	46
4.2 MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE AMOSTRAS	49
4.2.1 Estratégia de Amostragem	49
4.2.1.1 Estratégia de amostragem empregada no ambiente climatizado sem ventilação natural	49
4.2.2 Amostragem Ativa	51
4.2.3 Amostragem passiva	51
4.2.4 Amostragem direta	52
4.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO	52
4.4 QUANTIFICAÇÕES FÚNGICAS DOS ISOLADOS	53
4.5 ISOLAMENTO EM CULTIVO PURO DOS FUNGOS OBTIDOS	53
4.6 TESTES PARA DETECÇÃO DE POSSÍVEIS PATÓGENOS HUMANOS	53
4.7 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO CLÁSSICA DOS ISOLADOS FÚNGICOS	53
4.7.1 Identificação dos fungos por Características Macroscópicas	54
4.7.2 Identificação dos fungos por Microscopia Óptica	54
4.7.3 Identificação das leveduras pelo Sistema VITEX® II	56

4.7.4 Identificação das leveduras pelo sistema API [®] 20	57
4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	57
5 RESULTADOS	58
5.1 AMOSTRAS OBTIDAS DE ACORDO COM AS METODOLOGIAS UTILIZADAS	58
5.1.1 Ambiente climatizado <u>sem</u> ventilação natural (LUCHM)	59
5.1.2 Ambiente climatizado <u>com</u> ventilação natural (INMETRO)	59
5.1.3 Amostragens Passivas.....	60
5.1.4 Amostragens Ativas	61
5.1.5 Amostragens Diretas.....	62
5.1.6 Correlação entre as amostragens	64
5.2 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO CLÁSSICA DOS ISOLADOS FÚNGICOS	65
5.2.1 Caracterização dos isolados fúngicos no ambiente climatizado sem ventilação natural	65
5.2.1.1 Identificações por Características Macroscópicas	66
5.2.1.2 Identificação dos fungos por Microscopia Óptica	67
5.2.1.3 Identificação das leveduras pelo Sistema automatizado VITEK [®] II	68
5.2.1.4 Identificação das leveduras pelo sistema visual API [®] 20	71
5.2.2 Identificação dos isolados fúngicos do ambiente climatizado com ventilação natural	71
5.2.2.1 Identificações por Características Macroscópicas	71
5.2.2.2 Identificação dos fungos por Microscopia Óptica	72
5.2.2.3 Identificação das leveduras pelo Sistema automatizado VITEK [®] II	73
5.3 POSSÍVEIS PATÓGENOS HUMANOS	73

5.3.1 Análise dos fungos com potencial patogênico do ambiente <u>sem</u> ventilação natural	69
5.3.2 Análise dos fungos com potencial patogênico do ambiente <u>com</u> ventilação natural	75
6 DISCUSSÃO	76
6.1 APLICABILIDADE	76
6.2 PERIODICIDADE	76
6.3 ESTRATÉGIA DE AMOSTRAGEM	77
6.3.1 Ambiente climatizado <u>sem</u> aeração natural	77
6.3.2 Ambiente climatizado <u>com</u> aeração natural	78
6.4 MÉTODO DE AMOSTRAGEM	78
6.4.1 Amostragem Passiva	78
6.4.2 Amostragem Ativa	79
6.4.3 Amostragem Direta	79
6.5 LIMITE DE UFCs	80
6.6 TEMPO DE AMOSTRAGEM	79
6.7 CULTIVO DOS ISOLADOS	81
6.8 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS	81
6.8.1 Ambiente <u>sem</u> ventilação natural	82
6.8.2 Ambiente <u>com</u> ventilação natural	83
6.9 POSSÍVEIS PATÓGENOS HUMANOS	84
6.9.1 Ambiente <u>sem</u> ventilação natural	84
6.9.2 Ambiente <u>com</u> ventilação natural	85
6.10 CONSIDERAÇÕES FINAIS	85

7 CONCLUSÕES	88
8 RECOMENDAÇÕES	89
9 BIBLIOGRAFIA	91
10 ANEXOS	97

1 INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO

As primeiras referências sobre a preocupação com ar interior de ambientes datam do período Neolítico, na Idade Média, quando os homens se depararam com a poluição gerada ao cozinhar em recintos fechados. Posteriormente, no Século XIX, com a edificação de chaminés em residências o problema foi minimizado (BRIMBLECOME, 1987). No Século XVIII, Benjamin Franklin relata problemas relacionados à contaminação de interiores, referindo-se à contaminação do ar proveniente da utilização de carvão e madeira para o aquecimento. Ele disserta sobre os riscos para a saúde e aponta medidas para o seu controle, salientando a necessidade de ventilação dos ambientes e da construção de chaminés mais eficientes (MAYAN, 2012). Tempos depois, com o uso generalizado de energia elétrica e gás natural, a poluição tornou-se um problema externo. Contudo, na década de 70, devido à crise energética, novas formas de edificações ganharam espaço com a evolução arquitetônica, onde o número de aberturas nos prédios foi reduzido objetivando economia de energia com manutenção da circulação e refrigeração do ar (INMETRO, 2014). Esta tendência fez com que às atenções voltassem novamente para o ar de interiores, onde os problemas causados pelo acúmulo de poluentes pode facilmente superar os danos causados pela poluição atmosférica (COMTOIS & MARCOUX, 1999).

A tendência arquitetônica adotada nas últimas décadas, no que se refere à construção civil, teve como objetivo alocar um maior número de pessoas por metro quadrado, seja por motivos estéticos, controle de ruído e/ou climatização artificial (SHIRMER *et al*, 2011). A renovação do ar interior faz-se necessária em qualquer edifício, independente da sua natureza, seja em um pavilhão industrial, administrativo ou residencial, visando promover a diluição da concentração de poluentes, bem como minimizar os efeitos de temperaturas extremas. Os edifícios devem criar um ambiente saudável, além de condições ambientais que não comprometam o estado de saúde de seus ocupantes e proporcionem conforto diante das atividades a serem desenvolvidas (MAYAN, 2012).

Devido ao prolongado tempo de permanência em construções “hermeticamente” fechadas, dependentes exclusivamente de sistemas condicionadores de ar para a renovação do ar interior, a poluição desses ambientes internos tornou-se um problema compartilhado por inúmeros países, pois, em centros urbanos, 90% do tempo diário das pessoas são gastos dentro deste tipo de edificação (CARRER *et al*, 2004). A captação inadequada de ar externo somado à insuficiência na renovação do ar interior, inevitavelmente, levam ao aumento da concentração de poluentes químicos, físicos e biológicos nos recintos. A natureza e concentração desses poluentes variam de acordo com o ambiente externo e suas características, como proximidade de circulação de automóveis, zonas industriais, até mesmo atividade humana e estruturas de alvenaria. Sendo assim, pode-se afirmar que o ar externo é a principal fonte de contaminação do ar interno (GAUER *et al*, 2008). Entretanto, é sabido que materiais como carpetes, colas, vernizes, computadores, impressoras e móveis prensados liberam componentes que contribuem para o acúmulo de substâncias nocivas no ar (BIRKUS & AQUINO, 1998; BATISTA, 2008). Outro fator contribuinte são os produtos de limpeza, fumo, alimentos e principalmente o sistema de climatização. Apesar de serem invisíveis em sua maioria, tais poluentes frequentemente causam prejuízo para a saúde humana, podendo atuar isoladamente ou em conjunto (DEGOBBI & GAMBALE, 2008).

1.2 POLUENTES DO AR INTERIOR

Os poluentes que acometem ambientes interiores podem ser divididos em duas classes: contaminantes de origem não-biológica (material particulado, fumaça de cigarro, monóxido e dióxido de carbono, óxido e dióxido de nitrogênio, dióxido de enxofre e ozônio) e os de origem biológica (fungos, bactérias, vírus, algas, amebas e pólen).

1.2.1 Poluentes não-biológicos

Dentre os poluentes não-biológicos, o material particulado destaca-se como uma mistura de componentes, químicos e físicos, dispersos no ar tanto sólidos como líquidos (SHIRMER *et al*, 2008). Também, são conhecidos como “aerodispersóides” e se encontram no ar devido às suas dimensões diminutas ou temperatura elevada (QUADROS *et al*, 2009). Atividades como varrer, tirar pó ou qualquer movimentação brusca de ar contribuem para a dispersão das partículas que, em sua maioria, têm origem de veículos automotores, processos industriais, queima de biomassa, resuspensão de poeiras entre outros (SHIRMER *et al*, 2008).

Esses poluentes contêm uma quantidade maior de compostos orgânicos devido à natureza das atividades realizadas dentro do edifício e características da sua fonte. Os particulados produzidos em ambientes internos, em geral, são mais diminutos que os dispersos em ambientes externos. Tal característica faz dos particulados internos potencialmente mais perigosos à saúde por serem facilmente inaláveis, possuindo diâmetro inferior a 10 μm (QUADROS *et al*, 2009). Esses particulados destinam-se diferentemente de acordo com seu tamanho, podendo ficar retido no trato respiratório ou até mesmo chegar aos alvéolos pulmonares. A tabela abaixo descreve os principais poluentes orgânicos, suas fontes e seus prejuízos à saúde humana (TABELA 1).

1.2.2 Poluentes biológicos

Atualmente, os contaminantes de origem biológica são considerados os contaminantes mais relevantes do ar interior e são usualmente denominados bioaerossóis. Existe uma grande variedade de micro-organismos que podem estar presentes em ambientes internos que, quando dispersos no ar, são facilmente inalados devido ao tamanho diminuto (SILVEIRA, 2001).

TABELA 1. Principais poluentes não biológicos produzidos em ambientes internos

CONTAMINANTES DE ORIGEM NÃO-BIOLÓGICA ENCONTRADOS EM AMBIENTES INTERIORES	
Compostos Orgânicos Voláteis (COV)	Os principais COVs são benzeno, tolueno, etilbenzeno, xileno, formaldeído e acetaldeído (SCHIRMER <i>et al</i> , 2008). Originam-se de materiais de construção, acabamento, decoração, mobiliário, processos de combustão e emissões metabólicas de micro-organismos (BRIKUS & NETO, 1999).
Compostos Inorgânicos	Os principais são monóxido (CO) e dióxido de carbono, óxido e dióxido de nitrogênio, dióxido de enxofre e radônio. O CO merece atenção por ser um gás tóxico, incolor e inodoro e possuir alta afinidade com a hemoglobina reduzindo a capacidade dos glóbulos vermelhos de transportar oxigênio para os tecidos, provocando a morte de células por inanição (BASTO, 2007).
Dióxido de Carbono (CO₂)	Gás incolor, inodoro e não inflamável. É produzido por um processo de combustão completa de combustíveis fósseis, por processos metabólicos, fogões a gás, veículos motores em garagem, atividade metabólica de seres humanos e animais de estimação. Os locais onde os ocupantes permanecem a maior parte do tempo têm a tendência de apresentar as concentrações mais altas (BATISTA, 2008).
Óxidos de Nitrogênio (NOx)	São um grupo de gases altamente reativos, que em sua maioria são incolores e inodoros tendo como similaridade, nitrogênio e oxigênio em quantidades variáveis na sua composição. Entram em ambientes através dos sistemas de captação quando estes estão colocados no nível da rua e pode interferir no transporte de oxigênio para os tecidos produzindo efeitos parecidos como os do CO (BATISTA, 2008).
Dióxido de Nitrogênio (NO₂)	Está associado à utilização de aquecedores à querosene, queima de lenha e fumaça de tabaco dentre outras fontes. Este gás entra nos ambientes internos através dos sistemas de ventilação. SILVEIRA (2001) relata que o NO ₂ aumenta o número de infecções respiratórias, afeta indivíduos suscetíveis a alergias e pode desencadear asma.
Dióxido de enxofre	É um gás incolor com um cheiro asfíxiante característico, produtos da combustão de combustíveis fósseis, sendo liberado por muitos processos industriais. Entra nos ambientes através do sistema de ventilação (BATISTA, 2008). Causa danos ao sistema respiratório inferior e leva a diminuição da função pulmonar (GAUER <i>et al</i> , 2008).
Radônio	Gás radioativo produzido pelo decaimento do elemento químico rádio. É encontrado em solos, águas freáticas e inúmeros materiais de construção. Entra nos interiores através de fissuras e rachaduras no alicerce, paredes e lajes do prédio. BRIKUS & NETO salientam que esse gás é classificado na Europa e nos EUA como um dos principais poluentes em recintos fechados, representando um sério risco à saúde da população.
Fumaça de cigarro	Forma um aerossol composto por material particulado, vapores e gases produzindo uma mistura complexa de poluentes que, em altas concentrações, incomoda e irrita os indivíduos presentes. Tem sido associada a uma série de impactos a saúde, tanto crônica, quanto aguda, dentre elas o câncer de pulmão (PRECIOSO <i>et al</i> , 2007). Contudo, esse poluente tem sido minimizado nos ambientes internos devido a Lei nº12.546 de 14 de Dezembro de 2011 que proíbe fumar em ambientes fechados.

Esses micro-organismos, quando dispersos no ar, podem tornar o ambiente insalubre. São associados frequentemente ao Material Particulado inalável (partículas inferiores a 10 µm), mas podem ser dispersos de forma isolada. O ar torna-se então um potencial disseminador desses contaminantes, contudo não pode ser utilizado como meio de cultura (CORTES, 2003). Em ambientes interiores, o crescimento e multiplicação de micro-organismos dependem da disponibilidade de nutrientes, como matéria orgânica e inorgânica, onde quanto maior a disponibilidade maior será a diversidade de micro-organismos (VIEIRA *et al*, 2008). Estudos realizados por CHAO e colaboradores (2001) em 21 escritórios em Boston demonstram que a presença de água ou apenas umidade (em carpetes, cortinas e mobília, por exemplo) em ambientes internos, propicia o aparecimento e proliferação de micro-organismos.

Contaminantes biológicos podem causar danos à saúde dos ocupantes de uma edificação em graus diferentes de severidade, entretanto, fatores como a imunidade do indivíduo, a dimensão das partículas, a profundidade da penetração e a dosagem mínima do agente capaz de provocar a doença são fatores determinantes para infecção (BASTO, 2007). Os principais contaminantes biológicos do ar são fungos, bactérias, algas, vírus entre outros. Contudo, os fungos e as bactérias são amplamente descritos em estudos relacionados à qualidade do ar por serem agentes de doenças crônicas e disseminadas que podem levar ao óbito. Outros contaminantes biológicos como pólen, algas etc., apesar de frequentemente detectados no ar ainda são pouco estudados (MORAES, 2006; NAPOLI *et al*, 2012).

1.2.2.1 Bactérias

As populações bacterianas presentes no ar de interiores são altamente heterogêneas e a presença de determinadas espécies podem mudar facilmente influenciadas pela sazonalidade, entretanto, tais influências ainda são desconhecidas. (MEADOW *et al*, 2014). Dentre as bactérias, *Legionella sp.* aparece como principal contaminante do ar interior. As bactérias deste gênero tornaram-se conhecidas, em 1976, quando um grupo de 250 Legionários hospedados em um hotel da Filadélfia apresentaram problemas respiratórios, sendo que 176 entraram em quadro agudo e 29

foram à óbito. Pesquisas resultaram na identificação desta bactéria, que foi dispersa a partir do sistema de ar condicionado central do edifício (DEGOBBI& GAMBALE, 2008; HIGASKINO *et al*, 2007). Todavia, são inúmeras as bactérias passíveis de dispersão pelo ar, principalmente por sistemas climatizados, incluindo os seguintes gêneros: *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Straphylococcus*, *Mycoplasma*, *Chlamydia* e *Mycobacterium* (QUADROS, 2009b).

1.2.2.2 Fungos

Os fungos que possuem dispersão aérea são denominados anemófilos, possuindo a capacidade de colonizar diferentes substratos e habitats de forma singular e muito eficiente (LOBATO *et al*, 2009). Sendo assim, o ar atmosférico torna-se o meio de dispersão mais utilizado e mais bem sucedido dos fungos, não se resumindo apenas aos conídios (BUTTNER& STETZENBACH, 1993). A literatura menciona que dos 1,5 milhão de espécies de fungos existentes, cerca de 1.000 espécies evoluíram para explorar o ambiente construído (SINGH, 2005). Os fungos são heterotróficos e necessitam de carbono para a sua proliferação, sendo extraído das fontes disponíveis no ambiente (celulose de papéis e tecidos, queratina de cabelo, unhas humanas e escamas de animais, e amido da madeira ou papel de parede). Dentre os fungos, os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium* e *Alternaria* são os comumente encontrados no ar interior (HIGASKINO *et al*, 2007). Estudos sobre a microbiota fúngica presente em condicionadores de ar de Unidade de Terapia Intensiva (UTIs) confirmam os mesmos gêneros, incluindo *Trichoderma* (MOBIM & SALMITO, 2006). Em bibliotecas, pesquisas realizadas para avaliação do ar interior corroboram com a prevalência dos gêneros *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Trichoderma* sp., *Alternaria* sp., e *Fusarium* sp. no ambiente. Os mesmos gêneros foram recuperados na superfície dos acervos somado ao gênero *Candida* sp. (EVANGELISTA, 2012).

1.3 QUALIDADE DO AR INTERIOR (QAI)

A detecção de poluentes no interior de edificações levou à criação do conceito de Qualidade do Ar Interior (QAI). Este conceito se resume em uma combinação de fatores que envolvem fontes de emissão de poluentes, temperatura, umidade, taxa de circulação e renovação do ar (QUADROS, 2009a). Os ocupantes do ambiente e suas atividades contribuem significativamente para o aumento da poluição interior acrescentando as taxas de dióxido de carbono, químicos provenientes da respiração e transporte de micro-organismos (BIRKUS & AQUINO, 1998). A correlação entre concentração de conídios fúngicos e a atividade humana foi avaliada por Buttner & Stetzenbach, em 1993. Em uma sala experimental, ele constatou o aumento significativo das concentrações fúngicas no ar após a interferência de uma pessoa ao caminhar pela sala. Apesar deste estudo, as emissões humanas diretas, como descamação da pele, fala, tosse e espirros, que podem desempenhar um papel significativo sobre a proliferação microbiológica interior, ainda continuam mal compreendidas. A incompreensão dessas taxas de emissão relacionadas à ocupação humana limita o entendimento sobre o destino, transporte e influência desses componentes na microbiota do ar interior (QUIAN *et al*, 2012).

Somada a interferência humana, sugere-se que a ventilação de um ambiente seja a principal responsável pela variação da QAI. (SHIRMER *et al*, 2001). Em ambientes climatizados artificialmente o sistema de ar-condicionado opera suprindo o ambiente com determinada vazão de ar, temperatura e umidade sendo responsável pela ventilação e renovação do ar. Ele deve atuar compensando possíveis perdas desses critérios mantendo a temperatura e umidade relativa do ambiente interno dentro da faixa desejável (TEIXEIRA *et al*, 2005). Estes sistemas possuem similaridades e diferenças que variam de acordo com a função que se destinam e público alvo. Atualmente, sistemas de climatização central (filtros HEPA, 16 a 20 trocas de ar/hora, pressão positiva de entrada de ar, regulagem de temperatura e umidade) e aparelhos tipo *Split* (filtros HEPA, capacidade de refrigeração até 5 toneladas de refrigeração (TR), controle sobre processos de filtração e renovação de ar) são os mais utilizados (BASTO, 2007; QUADROS & LISBOA, 2010).

O sistema de ar condicionado deve proporcionar conforto térmico (controlando a temperatura e umidade), fornecer renovação de ar, remover odores e diluir poluentes (AGÊNCIA PORTUGUESA DO AMBIENTE, 2009). Todavia, de acordo com os padrões da Organização Mundial de Saúde (OMS), mais da metade dos locais fechados como empresas, escolas, residências e até hospitais tem ar de má qualidade devido à falta de higienização e controle dos condicionadores de ar. Em ambientes confinados, com taxas de renovação do ar deficientes, a permanência torna-se rapidamente desagradável nesses locais, devido ao acúmulo de poluentes gerados internamente. A OMS determinou que a má qualidade do ar interior é responsável por 2,7% dos casos de doenças no mundo. Definiu também que sintomas como fadiga, letargia, cefaleia, prurido, ardor nos olhos, anormalidades na pele, irritação do nariz e garganta são comuns a pessoas expostas a tais poluentes (WHO, 1988).

1.3.1 Síndrome do Edifício Doente (SED)

Quando os sintomas citados pela OMS são detectados em 20% dos ocupantes de um edifício, sendo a origem indeterminada ou sem possibilidade de constatação da etiologia, admite-se a Síndrome do Edifício Doente, termo reconhecido desde 1988 pelo comitê técnico da OMS (QUADROS, 2008a). As causas da SED não são identificadas com frequência, normalmente, esses sintomas aumentam durante a permanência no prédio (horas de trabalho) e diminuem rapidamente ao sair do prédio no intervalo do almoço e ao retornar para casa (STERLING *et al*, 1991). A maioria dos sintomas, com exceção dos sintomas cutâneos, melhora nos fins de semana e desaparecem completamente nas férias. A SED possui grande impacto econômico implicando necessariamente na saúde humana, influenciando na produtividade, reduzindo a eficiência no trabalho acarretando o aumento de faltas ao expediente (BRIKUS & NETO, 1999; NUNES *et al*, 2005).

Outro termo utilizado, atualmente, com relação à QAI é o conceito de Doenças Relacionadas a Edifícios (DRE). Diferentemente da SED, são doenças com causa definida e geralmente desencadeadas por agentes biológicos ou químicos presentes no ar, relacionadas a mecanismos imunológicos, processos infecciosos ou toxicidade

direta. Esta síndrome, geralmente, não é letal, porém diminui a expectativa de vida, seus sintomas causam, também, desconforto e absenteísmo no trabalho, reduzindo a eficiência e refletindo por vezes na economia geral do país (DEGOBBI & GAMBALE, 2008).

1.3.2 Fungos e a QAI

O ar contém naturalmente fungos, que são um fator importante para a decomposição da matéria orgânica. No entanto, em espaços interiores, a concentração desses micro-organismos pode ser um fator de grande influência na patologia humana (PONCE-CABARELLO *et al*, 2012). Os fungos são micro-organismos frequentemente relacionados à SED, ocasionando desde micoses a doenças relacionadas com resposta alérgica (SINGH, 2005). Nos últimos anos, esses micro-organismos têm estado em evidência por sua relação com a SED e a DRE devido à variedade de enfermidades e grau de severidade que podem causar (CHAO *et al*, 2001). A inalação ou ingestão é a principal via de exposição dos propágulos fúngicos, entretanto, produtos tóxicos oriundos de seu metabolismo, componentes celulares e micotoxinas potencializam a patogenicidade deste tipo de micro-organismo (KHAN & KARUPPAYIL, 2012; LOBATO *et al*, 2009).

Fungos anemófilos podem desencadear uma série de processos alérgicos e irritações, dores de cabeça, perda de coordenação, náusea, danos no fígado, rim e até mesmo atingir o sistema nervoso central (BRIKUS & NETO, 1999). A maioria dos fungos ambientais está associado a reações alérgicas, irritações e infecções (CHAO *et al*, 2001). Os primeiros relatos sobre a importância QAI em unidades de saúde evidenciaram o gênero *Aspergillus* como principal contaminante. Ainda hoje esse gênero é apontado como mais propenso a ocasionar infecções fúngicas, principalmente, em indivíduos imuno-comprometidos (PEREIRA *et al*, 2005; FRÈALLE *et al*, 2011).

Estudos epidemiológicos nos Estados Unidos e na Europa têm associado *Alternaria alternata* e *Cladosporium herbarum* a presença de mofo no interior de edificações. A presença destes fungos tem sido relacionada ao desenvolvimento, a

persistência e a gravidade da asma. No caso exclusivo de adultos, *Aspergillus fumigatus* surge como responsável pela persistência da asma aguda. A aspergilose bronco-pulmonar alérgica (ABPA) é causada por *A. fumigatus* e é caracterizada por exacerbações de asma, com infiltrados pulmonares, tosse com muco, eosinofilia periférica e pulmonar, e aumento da IgE sérica total e níveis de IgE específicos para fungos, especialmente durante o período de quadro clínico. ABPA é citada como forma mais comum de micose bronco-pulmonar alérgica (MAPA) sendo associada a outros fungos comumente isolados no ar interior como *Candida* sp., *Penicillium* sp. e *Curvularia* sp.

1.4 NORMATIVAS E LEGISLAÇÕES BRASILEIRAS PARA QAI

No Brasil, até a década de 90, as pesquisas iniciadas não tinham como principal foco os contaminantes biológicos. Até então, as atenções estavam voltadas apenas para análises de compostos orgânicos voláteis, formaldeído, acetaldeído, monóxido de carbono, carbono negro e nicotina em diferentes ambientes internos como restaurantes, *shoppings* e bancos. Esta necessidade tornou-se evidente quando, em abril de 1998, o então Ministro das Comunicações, Sérgio Motta, faleceu após ter seu quadro clínico agravado em função de fungos alojados em dutos do sistema de climatização evidenciando a necessidade da criação de normativas e estabelecimento de padrões para ambientes climatizados (INMETRO, 2014; EVANGELISTA, 2012).

1.4.1 Sociedade Brasileira de Meio Ambiente e Controle da Qualidade do Ar de Interiores (BRASINDOOR).

Apesar da preocupação com a QAI ter sido evidenciada em 1998 com o falecimento do ministro, três anos antes, um grupo de pesquisadores de São Paulo e do Rio de Janeiro originou a BRASINDOOR. Inicialmente, a associação foi criada para intensificar a troca de informações entre pesquisadores e estimular novas pesquisas na área promovendo simpósios e editando uma revista científica que veicula artigos

técnicos e científicos, reportagens e divulgação de eventos relacionados à QAI. Para dar apoio a pesquisadores e auxiliar a sociedade na contratação desses serviços, que visam o monitoramento da QAI, a BRASINDOOR expandiu seu programa de simpósios e criou um programa de certificação capaz de identificar produtos, serviços e ambientes que se encontram em condições de validação e de certificação de qualidade, buscando garantias de prestação de bons serviços para a população brasileira. Somente em 1999, depois da publicação da ANVISA que foi criado o programa "Selo da Qualidade da BRASINDOOR". Este programa estabeleceu três categorias de certificação: produtos, serviços e ambientes. Cada uma dessas categorias possui uma série de diretrizes que devem ser atendidas pelos aspirantes à certificação. A primeira diretriz a ser divulgada foi a de ambientes, tendo sido emitido o primeiro certificado ao Centro Empresarial de São Paulo em 1º de março de 1999. Esse certificado é revisto anualmente, com visitas periódicas de verificação. Qualquer ambiente que atenda plenamente às diretrizes estabelecidas pela ANVISA para ar de interiores pode ser certificado e receber o selo de qualidade para ambientes (BRASINDOOR, 2012).

1.4.2 Portaria nº 3.523 de 28 de Agosto de 1998 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)

A Portaria nº 3.523 foi publicada considerando a preocupação no cenário mundial com a QAI. Ela pondera a crescente utilização de sistemas de ar condicionado no país visando à saúde e o bem-estar dos ocupantes de ambientes climatizados. Correlaciona à climatização artificial com a SED devido aos conhecidos danos que esta síndrome pode ocasionar à saúde humana influenciando na produtividade do trabalhador e seu provável absenteísmo.

Visando a necessidade da adesão de procedimentos que diminuam os riscos para saúde dos ocupantes, esta Portaria estabelece que os ambientes climatizados artificialmente de uso público e coletivo devem elaborar e conservar um plano de manutenção dos sistemas de climatização. Ressalta ainda a necessidade de um responsável técnico habilitado em locais abastados por sistemas de climatização com capacidade superior a 5 TR (15.000 kcal/h = 60.000 BTU/H) para implementar e manter

um Plano de Manutenção, Operação e Controle (PMOC). Neste plano deve conter medidas referentes à:

- Execução de procedimentos de limpeza, remoção de poluentes por métodos físicos e manutenção dos componentes dos sistemas de climatização.
- Estabelecimento de parâmetros físicos, químicos e biológicos e sua composição demarcando métodos de controle e limites de concentração.
- Posicionamento sobre condições adequadas de limpeza, manutenção, operação e controle.
- Assegurar o funcionamento dos condicionadores de ar a fim de minimizar os riscos a saúde dos trabalhadores e ocupantes do ambiente.
- Além de garantir a execução do PMOC disponibilizando os planos de ação e os resultados das atividades de manutenção, operação e controle aos ocupantes.

A norma repassa aos proprietários, locatários e prepostos, responsabilidade pelo estabelecimento dos PMOCs para sistemas de climatização resultando na falta de concordância entre os parâmetros e estratégias. Apesar dos avanços alcançados por esta portaria faltava ainda à concepção de critérios mais específicos sobre a QAI dos estabelecimentos como mencionam algumas análises críticas. Estudos mencionam a necessidade da formalização de critérios que avaliassem os procedimentos adotados pelas empresas de manutenção, definição de valores limites à exposição de poluentes, e a urgência no desenvolvimento de métodos para avaliação dos contaminantes e poluentes de ambientes interiores (GONTIJO *et al*, 2000) .

1.4.3 Resolução nº 176/00 e Resolução nº 09/03 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Diante da necessidade de aprimorar os critérios vigentes relacionados à QAI, em 24 de Outubro de 2000 publicou-se a Resolução nº 176/00 (ANEXO 1). Esta RE define que: “Ambientes climatizados são espaços fisicamente denominados e caracterizados por dimensões e instalações próprias, submetidos ao processo de climatização, através

de equipamentos” e estabelece parâmetros biológicos, químicos e físicos para avaliação da QAI. Em 16 de Janeiro de 2003 esta resolução foi atualizada pela RE nº 09/03 devido à necessidade de revisão de alguns critérios. Esta atualização foi embasada na experiência e conhecimento adquirido no país durante os primeiros anos de vigência da RE nº176/00. As modificações realizadas restringiram-se aos fins de avaliação, controle do ar e tipos de amostragem que foram descritas em formato de orientações técnicas sem alterações nos valores limites estabelecidas para presença de contaminantes biológicos no ar (DEGOBBI & GAMBALE, 2008). Para fins de avaliação e controle de ambientes climatizados artificialmente para determinação da QAI recomenda-se que sejam as seguintes Normas Técnicas: NT 001 – Bioaerossóis, NT 002 – Dióxido de Carbono, NT 003 – Temperatura, Umidade e Velocidade do Ar, e NT 004 - Aerodispersóides.

Padrões Referência is de Qualidade do Ar são estabelecidos por esta RE a despeito de valores máximos recomendáveis (VRM) para contaminação biológica, química e parâmetros físicos do ar interior. Os fatores físicos de importância no ambiente interno climatizado de uso comum compreendem temperatura, umidade, velocidade e taxa de renovação do ar e grau de pureza do ar (TABELA 2).

TABELA 2. Parâmetros físicos para ambientes internos climatizados artificialmente determinados pela RE nº176/00 ANVISA.

PARÂMETRO	VALOR MÁXIMO RECOMENDÁVEL (VMR)	
Temperatura	23°C a 26°C(verão)	20°C a 22°C. (inverno)
Umidade relativa do ar	40% a 65% (verão)	35% a 65% (inverno)
Operação da velocidade do ar	Nível de 1,5 m do solo com distribuição de 0,25 m.s ⁻¹	
Taxa de renovação do ar	17 a 27 m ³ /hora pessoa	

A Norma Técnica 001 (Bioaerossóis) detalha o método analítico para pesquisa, monitoramento e controle ambiental da possível colonização, multiplicação e disseminação de fungos em ar ambiental interior considerando como principais fontes, ambientes úmidos, sistemas de ar condicionado e contato entre pessoas (HIGASKINO *et al*, 2007; DEGOBBI & GAMBALE, 2008). Determinam-se como Bioaerossóis micro-organismos viáveis em suspensão no ar, onde os fungos são usados como marcador

epidemiológico escolhido pela ANVISA, ficando estabelecido que a contagem de colônias de fungos dispersos pelo ar tem como limite máximo 750 UFC/m³, sendo inaceitável a presença de fungos patogênicos e/ou toxigênicos. Além disso, a relação I/E deve ser menor ou igual a 1,5, onde I é a quantidade de fungos no ambiente interior e E é a quantidade de fungos no ambiente exterior. Determina-se ainda que:

- Para recuperação dos conídios fúngicos dispersos no ar sejam usados amostradores de ar por impactação com acelerador linear de 1, 2 ou 6 estágios.
- O tempo de amostragem deve durar de 5 a 15 minutos, dependendo das especificações do amostrador.
- O meio de cultivo deve ser cientificamente validado como: Agar Extrato de Malte, Agar Sabouraud Dextrose a 4%, Agar Batata Dextrose e outros.
- A taxa de vazão deve ser preferência lmente de 28,3 l/min.
- Manuseio da amostra deve ser realizado em nível 2 de Biossegurança.

A estratégia de amostragem adotada deve considerar a metragem da área construída dentro de uma mesma edificação climatizada para definir o número de amostras coletadas (TABELA 3). Independente da quantidade de amostras realizadas o equipamento deve ser afixado na altura de 1,50 m do nível do piso. A RE orienta que as unidades funcionais dos estabelecimentos com características epidemiológicas diferenciadas, tais como serviço médico, restaurantes, creches e outros, deverão ser amostrados isoladamente.

Atualmente, diversos trabalhos publicados evidenciam que, apesar da atualização realizada, diversos parâmetros precisam ser revistos. Com relação as diretrizes estabelecidas para os Bioaerossóis surgem críticas relacionadas a concentração limite para presença de conídios, a inexistência de parâmetros relacionados aos produtos metabólicos de micro-organismos, a variação na eficiência dos diferentes aparelhos de amostragem, a diferenciação de critérios de avaliação embasadas nas características epidemiológicas de cada edificação, entre outros (DEGOBBI & GAMBALE, 2008; SHIRMER et al 2008).

TABELA 3. Número mínimo de amostras necessário para avaliação do ambiente interior em função da área construída.

ÁREA CONSTRUIDA (m ²)	NÚMERO MÍNIMO DE AMOSTRAS
Até 1.000	1
1.000 a 2.000	3
2.000 a 3.000	5
3.000 a 5.000	8
5.000 a 10.000	12
10.000 a 15.000	15
15.000 a 20.000	18
20.000 a 30.000	21
Acima de 30.000	25

1.4.4 Consulta Pública nº 109, de 11 de Dezembro de 2003.

As limitações apontadas na RE nº 09/03 indicaram a necessidade de uma legislação à parte, com critérios mais rígidos direcionados para serviços de saúde devido à imunidade comprometida e susceptibilidade dos pacientes aos poluentes internos (FRÉALLE *et al*, 2011). Considerando esta necessidade, a Consulta Pública nº109/03 foi criada com intuito de propor a elaboração de uma Resolução que visa a assegurar o bem estar e conforto desses pacientes bem como dos profissionais de saúde. Entretanto, até o presente momento, a referida RE não foi publicada ([http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP\[6046-2-0\]](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP[6046-2-0])).

Com intuito de criar indicadores de QAI em Serviços de Saúde, esta CP classifica os ambientes em quatro níveis de risco, baseando-se nas próprias diferenciações existentes dos níveis de risco nas unidades de saúde (TABELA 4) (QUADROS *et al*, 2009a).

TABELA 4. Diferenciação dos níveis de risco baseados na atividade desenvolvida de acordo com a CP nº109/03.

CLASSIFICAÇÃO DE RISCO DE OCORRÊNCIA DE EVENTOS ADVERSOS À SAÚDE POR EXPOSIÇÃO AO AR	
Nível 0	Área onde o risco não excede aquele encontrado em ambientes de uso público e coletivo.
Nível 1	Área onde não foi constatado o risco de eventos adversos relacionados à qualidade do ar, porém algumas autoridades, organizações ou investigadores sugerem que o risco deva ser considerado.
Nível 2	Área onde existem <u>fortes evidências de risco</u> de ocorrência de eventos adversos relacionados à qualidade do ar de seus ocupantes ou de pacientes que utilizarão produtos manipulados nestas áreas, baseadas em estudos experimentais, clínicos ou epidemiológicos bem delineados.
Nível 3	Área onde existem fortes evidências de <u>alto risco</u> de eventos adversos de seus ocupantes ou de pacientes que utilizam produtos manipulados nestas áreas, baseados em estudos experimentais, clínicos ou epidemiológicos bem delineados.

FONTE: ANVISA 2003.

Além da classificação de risco para ocorrência de eventos adversos, a CP nº109 sugere que os contaminantes de origem química (Partículas respiráveis menores que 10 μ m - 80 mg/m³; Fenol - 15 mg/m³; Formaldeído - 2,3 mg/m³; Etanol - 1480 mg/m³; Cloro 2,3 mg/m³) devem ser pesquisados de forma particular bem como as variáveis físicas (Temperatura 21° C a 24° C; Umidade relativa 40% a 60%; Velocidade do ar < 0,25 m/s) respeitando os VMRs estabelecidos.

Com relação às variáveis biológicas, ficou acordado que a concentração de esporos bacteriológicos e fúngicos presentes no ar não podem ultrapassar os VMR determinados (TABELA 5). O método analítico de avaliação destes poluentes deve seguir os critérios estabelecidos na NT 002 desta norma que mantém os mesmos parâmetros utilizados na RE nº09/03 com ressalva apenas na adesão de contagem de bactérias como marcador epidemiológico.

TABELA 5. Limites máximos de poluentes biológicos tolerados em cada ambiente pela CP nº 109/03.

PARÂMETROS REFERÊNCIA IS MICROBIOLÓGICOS PARA QAI EM AMBIENTES HOSPITALARES				
Variáveis e Componentes	Nível 0	Nível 1	Nível 2	Nível 3
Partículas biológicas totais no ar ambiental	≤ 750 UFC/m ³	≤500 UFC/m ³	≤200 UFC/m ³	≤50 UFC/m ³

FONTE: ANVISA 2003

1.4.5 Decreto municipal nº 22496 de 18 de Dezembro de 2002.

Considerando a vigência da Portaria ANVISA n.º 3.523, que autoriza o Poder Executivo a criar o Plano de Controle de Qualidade do Ar, em 18 de Dezembro de 2002, o então prefeito Cesar Maia, assina o decreto municipal nº 22496 diante da necessidade de programar as ações de vigilância sanitária previstas pela legislação vigente para o controle da qualidade do ar em ambientes fechados climatizados. Este decreto confere a responsabilidade da Superintendência de Controle de Zoonoses, Vigilância e Fiscalização Sanitária fiscalizar a legislação vigente de controle de qualidade do ar em ambientes interiores climatizados. Também autoriza a instituir convênios com órgãos públicos da Administração Direta e Indireta, Autárquica ou Fundacional, das esferas federal, estadual e municipal, bem como com instituições públicas de ensino superior, tendo em vista o desenvolvimento das ações abrangidas pelo presente Decreto.

De acordo com este decreto, os seguintes parâmetros são necessários à boa qualidade do ar interior nos ambientes climatizados: manutenção do estado de integridade e eficiência de todos os componentes dos sistemas de climatização; verificação visual do estado de limpeza dos componentes do sistema, com remoção de eventuais sujidades por métodos físicos; utilização, na limpeza dos componentes, somente de produtos biodegradáveis; preservação da captação do ar externo livre de possíveis fontes de poluição; e garantia de adequada renovação de ar nos ambientes.

1.4.6 NBR 15848:2010, de 11 de Junho de 2010 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT)

Em 2010 a ABNT publicou a norma ABNT que estipula procedimentos e requisitos relativos às atividades de operação e manutenção, para melhoria dos padrões higiênicos das instalações de ar-condicionado e ventilação, contribuindo desta forma para a QAI e para as legislações vigentes. Entretanto, esta norma apenas

determina os procedimentos e requisitos relativos às atividades de construção, reformas, operação e manutenção das instalações que afetam a QAI, não definindo especificamente metodologia de verificação.

1.5 METODOLOGIAS BIOANALÍTICAS DISPONÍVEIS PARA AVALIAÇÃO DA QAI

Apesar das metodologias preconizadas pelas normativas atuais existem diversos métodos disponíveis para quantificação de micro-organismos dispersos no ar que variam tanto com relação à natureza do método quanto na diversidade de equipamentos (QUADROS *et al*, 2009). Essas metodologias atuais baseiam-se em princípios de detecção de biomassa total e/ou medição de partículas viáveis, sendo o método de compactação em meio sólido o mais utilizado na coleta de esporos dispersos no ar. Para a análise quantitativa de micro-organismos no ar existem várias metodologias passivas e ativas, tais como a sedimentação espontânea, a filtração, a precipitação eletrostática, a impactação centrífuga, a impactação em meio líquido e a impactação em meio sólido (TABELA 6) (DEGOBBI & GAMBALE, 2008).

A sedimentação espontânea consiste em um método passivo de amostragem onde as placas de Petri com o meio de cultura são expostas no ambiente a ser estudado, de forma que as partículas dispersas no ar sedimentem pela força da gravidade. Esta técnica mostra-se limitada, pois impede a real quantificação de micro-organismos presentes no ar e não possui tempo de exposição padronizado, entretanto é frequentemente citada na literatura (SHIRMER *et al*, 2008, QUADROS *et al*, 2009; FLORES & ONOFRE, 2010; CALDEIRA *et al*, 2012). Estudos avaliando a eficácia do método “*pour plate*” para contagem de fungos em placa corroboram com esta possibilidade, evidenciando que, quanto maior o número de colônias crescida por placa, maior o erro na avaliação final das contagens (VIEIRA, 2002).

TABELA 6. Comparação entre as características das metodologias passiva e ativa.

AMOSTRAGEM	PASSIVA	ATIVA
ANÁLISES	Qualitativa	Quantitativa
	Microrganismos viáveis e cultiváveis	Permite a detecção de microrganismos viáveis e cultiváveis e partes desses microrganismos
		Possibilidade do uso de métodos <i>in vitro</i> : *LAL: solução após lavagem do filtro amostrado para detecção de endotoxinas.
		*TAM: contato direto do filtro amostrado com sangue total humano fresco ou cultura de linhagens monocíticas. Dosagem de citocinas para contaminantes biológicos em geral.
VANTAGENS	Baixo custo	Preconizada por diretrizes oficiais
	Maior disponibilidade de uso.	Mais eficiente e sensível.
	Maior número de análises em menor tempo.	Permite avaliação de partículas de vários tamanhos incluindo as alveolares
DESVANTAGENS	Dificuldade na detecção de partículas pequenas como conídios fúngicos.	Variedade de equipamentos dificulta comparação e a reprodutibilidade dos resultados.
	Influência do tempo de amostragem que não é definido.	Necessidade de constante calibração do equipamento.

*LAL- Lisado dos Amebócitos de Limulus; TAM – Teste de Ativação de Monócitos.
 Fonte: CALDEIRA *et al*, 2012.

Outros métodos como filtração, precipitação eletrostática, impactação por centrífuga e método de colisão são utilizados com menor frequência devido às desvantagens envolvidas. A filtração consiste na passagem forçada do ar por um filtro que retém as partículas suspensas do ar. Contudo, a possibilidade de dessecação, ocasionando na possível perda da viabilidade das células destas durante a coleta aparece como desvantagem deste método. A precipitação eletrostática baseia-se na atração de partículas através da carga elétrica que possuem, entretanto, os mecanismos complexos que possuem aparecem como desvantagem. Na impactação por centrífuga, utiliza-se a aceleração para depositar as partículas sobre a superfície coletora. Mas a falta de padronagem deste método com relação ao meio de cultura

(fornecido pelo fabricante) aparece como desvantagem. No método da colisão em meio líquido, as partículas presentes no ar ficam suspensas em um líquido, através do bombeamento de ar para o interior de um frasco de vidro contendo o líquido possuindo como fator limitante as esterilizações necessárias para utilização dos frascos (MORAES, 2006).

Atualmente, a metodologia recomendada para avaliação da QAI é baseada em métodos ativos de amostragem. Essa metodologia faz uso de amostradores de ar por impactação linear de 1, 2 ou 6 estágios, com vazão de 28,3 L/min, durante um período de 5 a 15 minutos. Neste tipo de aparelho, depois de aspirado, o ar deposita-se sob o meio de cultura contido na placa de Petri. A alta eficiência na recuperação de esporos evidencia-se neste aparelho, sendo sugerido pela ANVISA. Entretanto a ausência de técnicas para validar os resultados obtidos tem sido alvo de críticas durante a avaliação da QAI (DEGOBBI & GAMBALE, 2009; CALDEIRA *et al*, 2012).

1.6 PROBLEMAS TÉCNICOS RELACIONADOS À METODOLOGIA ATUAL

Em relação às recomendações técnicas brasileiras, foi definido o índice de 750 UFC/m³ de ar como valor limite para micro-organismos dispersos no ar interior sendo inaceitável a presença de fungos patogênicos. Contudo, pesquisas realizadas para avaliação da QAI em ambientes hospitalares encontrou números superiores de UFCs em ambientes internos quando comparado aos externos (QUADROS *et al*, 2009a). Baseando-se nos resultados deste e de outros estudos realizados pode-se afirmar que o valor de 750 UFC/m³ para ambientes internos é uma exigência de grande tolerância sendo alvo de diversas críticas, principalmente pela variedade de ambientes climatizados existentes (CALDEIRA *et al*, 2012). Outro aspecto a ser considerado refere-se à técnica de coleta recomendada, que apresenta limitações (DEGOBBI & GAMBALE, 2008). Estudos comparativos mostram que há uma variação muito grande na concentração de fungos em vários pontos de um mesmo ambiente interior, pois os propágulos não se distribuem uniformemente no ar ambiente contrapondo a estratégia de amostragem preconizada pela norma. Os resultados do monitoramento de fungos

anemófilos em Unidade Hospitalar reforçam tal afirmação demonstrando que fungos apresentam variações muito amplas em sua incidência de acordo com a estação do ano, temperatura, umidade relativa do ar, hora do dia, velocidade e direção dos ventos, presença da atividade humana e principalmente, climatização dos ambientes (MARTINS-DINIS et al, 2005). Em outro estudo, fungos isolados de superfícies, quando comparados aos coletados por amostradores de ar, apontam diferenças na recuperação de esporos reforçando tais limitações. A amostragem de superfície realizada varia de leve a moderada, dependendo do local de coleta, mostrando-se divergente das concentrações obtidas pelo amostrador de ar. Estes resultados sugerem avaliações de ambientes climatizados realizadas apenas por uma técnica podem não refletir adequadamente o nível de contaminação microbiana em interiores (BUTTNER & STETZENBACH, 1993).

Trabalhos de diversos autores publicados na área salientam a necessidade de garantir métodos unificados para medições de bioaerossóis em ambientes interiores (BUTTNER & STETZENBACH, 1993; NUNES, 2005; DEGOBBI & GAMBALE, 2008). Entretanto, para demonstrar a capacidade de um método para a finalidade pretendida, seja ele por determinação quantitativa, semi-quantitativa e/ou qualitativa, este deve atender às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados como descreve a RE nº 889, de 29 de maio de 2003, da ANVISA. Essa RE serve como guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, citando que testes de identificação precisam atender aos parâmetros de especificidade descritos na mesma.

Os métodos descritos na literatura (passivos e ativos) para avaliação do ar interior, usualmente, utilizam os parâmetros de ausência de Fungos Patogênicos, Contagem de colônias de fungos 750 UFC/m^3 e de I/E (I é a quantidade de fungos no ambiente interior e E é a quantidade de fungos no ambiente exterior) 1,5, como os utilizados pela BRASINDOOR. Entretanto, nenhuma dessas metodologias é validada e os valores atribuídos pelas normas atuais são questionáveis. Além desta necessidade, a falta de materiais de referência gera um empecilho adicional para a padronização da metodologia adequada.

No que se refere aos diferentes tipos de dispositivos de amostragem ativa, estudos elucidam que não existem apenas vantagens neste tipo de metodologia, demonstrando as características particulares de cada aparelho como possível fator limitante devido à influência nos resultados do ambiente amostrado (BARLETT *et al.*, 2002). Entretanto aponta-se como vantagem desse método à obtenção de resultados quantitativos gerados diretamente pela contagem das UFCs (NADAI, 2008). Isso significa que as colônias crescem diretamente das partículas aerotransportadas no meio de cultivo escolhido. Contudo, os aparelhos utilizados atualmente nestas metodologias possuem a limitação de detectar apenas 0,1 a 10% dos micro-organismos presentes no ar, sendo pouco precisos (DEGOBBI & GAMBALE, 2008). Além disso, métodos de contagem em placa das UFCs adquiridas fornecem um erro na avaliação de fungos reforçando a ideia de adoção de novos métodos de quantificação (VIEIRA, 2002). Frente a estes problemas, técnicas moleculares para identificação e quantificação de micro-organismos surgem como possível solução para quantificação de esporos dispersos no ar (PECCIA & HERNANDEZ, 2006). Em contra partida, adverte-se que esse método é limitado devido ao custo dispendioso, pois necessita de equipamentos caros e pessoal altamente qualificado (DEGOBBI & GAMBALE, 2008).

A microbiota fúngica anemófila compreende fungos filamentosos e leveduriformes, que, por oportunismo, provocam patologias no ser humano, a partir da dispersão dos seus esporos através do ar. A identificação dos micro-organismos coletados aparece como outro desafio. A despeito da extrema importância, esta tarefa se mostra difícil e trabalhosa sem a ajuda de um especialista. Após a obtenção de culturas puras, faz-se necessária a análise dos aspectos morfológicos e macroscópicos das colônias (MOBIN & SALMITO, 2006). Esta análise visa à observação da morfologia da colônia e aspectos microscópicos que fundamentam a identificação de fungos filamentosos. De acordo com o guia de detecção e identificação dos fungos de importância médica da ANVISA (2004), a análise da colônia visa a observar: cor, textura, superfície, pigmento difusível no meio de cultura frente e verso da placa (TABELA 7). Para análise das estruturas microscópicas pode ser visualizada através de microscopia clássica, eletrônica, fluorescência ou por varredura (CALDEIRA *et al.*, 2012). Para a visualização microscópica da disposição original dos conídios sobre as

hifas a técnica de microcultivo é recomendada por manter íntegras certas estruturas formadoras de conídios, proporcionando uma identificação mais adequada.

TABELA 7. Descrição das características macroscópicas apresentadas por fungos após crescimento em meio sólido. As três últimas características podem ser observadas somente em fungos filamentosos (*).

DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA MACROSCÓPICA:	
CARACTERÍSTICA	DESCRIÇÃO
Coloração	Branca, rósea, verde com bordas brancas, marrom, bege, etc.
Aspecto	Algodonoso, aveludado ou pulverulento (Filamentosos). Seco, cremoso ou mucoso (Leveduras).
Pigmento difuso no meio	Sim ou Não
Topografia *	Côncava, convexa ou plana.
Superfície da colônia*	Lisa, irregular, com grânulos, com pregas, etc.
Bordos da colônia*	Lisos, irregulares ou crescimento sobre toda placa.

FONTE: ANVISA 2004

2 JUSTIFICATIVA

De acordo com a bibliografia consultada, é cabível afirmar que qualquer ambiente interno que faz uso de ventilação artificial está propício a um maior acúmulo de poluentes e, conseqüentemente, ao aparecimento dos sintomas da SED. Como descrito, ambientes climatizados tendem ao acúmulo de poluentes em seu interior. Identifica-se então que, apesar dos esforços, a questão da QAI é complexa e a correta avaliação dos fatores de risco para a determinação dos agentes envolvidos é deficiente. Além da necessidade de maiores estudos na área, possibilitando o estabelecimento de metodologias validadas para avaliação do ar interior, deve haver uma conscientização de que sistemas de climatização podem ser importantes deflagradores de patologias diversas, enquanto não forem realizadas manutenções periódicas e implementação de taxas de renovação adequadas pelo sistema, pois estes podem acabar atuando como amplificadores de micro-organismos para o ambiente interior (DEGOBBI & GAMBALE, 2008). Esta necessidade vai de encontro à missão do INMETRO que visa prover confiança à sociedade brasileira nas medições através da metrologia e da avaliação da conformidade, promovendo a verificação das normas técnicas e legais, destinados à

melhoria da qualidade de produtos e serviços. A QAI é uma área de pesquisa emergente no Brasil, com inúmeras possibilidades de estudo. Além disso, as pesquisas brasileiras publicadas tem enfoque em ambientes sabidamente contaminados ou ambientes hospitalares evidenciando a necessidade da avaliação microbiológica de ambientes residenciais, escolares e áreas comuns climatizadas (BIRKUS & AQUINO, 1999). Com intuito de avaliar a eficácia das metodologias utilizadas para avaliação da QAI, foram selecionados para nosso estudo dois locais de naturezas distintas – geografia, edificação, tipo de atividade e quantidade de pessoas – onde um pode ser classificado como um ambiente pouco contaminado com ventilação natural e outro como um ambiente muito contaminado com renovação de ar exclusivamente por equipamentos condicionadores de ar.

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficiência das metodologias atuais existentes para análise da QAI em dois ambientes distintos, utilizando os fungos como marcadores epidemiológicos, visando à verificação das normas técnicas brasileiras específicas desta área.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a eficiência de amostragem das metodologias Passiva, Ativa e Direta para avaliar ambientes climatizados artificialmente selecionados.
- Quantificar a poluição biológica dos ambientes amostrados através da concentração de UFCs obtida pelas metodologias avaliadas.
- Avaliar a correlação entre os ambientes amostrados pelas diferentes técnicas através dos resultados obtidos.
- Identificar a microbiota fúngica e investigar a possibilidade de existência de possíveis patógenos presentes nos ambientes avaliados.
- Sugerir novos parâmetros que possam embasar adequadamente à normativa vigente.

4 METODOLOGIA

A metodologia para desenvolvimento deste trabalho foi realizada de acordo com alguns critérios estabelecidos pela Resolução N°176/00 da ANVISA sobre poluentes biológicos no interior de edificações. Esta RE foi atualizada pela RE n°09/03 e estabelece padrões referência is de qualidade do ar interior em ambientes climatizados artificialmente de uso público ou coletivo (item 1.4).

4.1 AMBIENTES SELECIONADOS E PONTOS DE COLETA

A RE n°09/03 determina que seus parâmetros sejam aplicados em ambientes climatizados de uso público e coletivo, sem considerar quaisquer diferenças entre a natureza das atividades, quantidades de usuários ou localidade, com ressalva apenas para instalações hospitalares. Sendo assim, enquadra dentro do mesmo escopo, edificações diversas, como shoppings, aeroportos, salas de aula, residências, etc. É sabido que, os contaminantes interiores, têm fontes diversas tais como o ar exterior, a atividade humana, a mobília, entre outros. Esse cenário conclui que, a composição, quantidade e natureza dos poluentes de um ambiente interior variam de acordo com a atividade exercida, edificação e localidade. Deste modo, os ambientes selecionados para estudo, possuem natureza de atividade e localidade distintas com intuito de evidenciar se os parâmetros estabelecidos pela RE n°09/03 alcançam tais heterogeneidades.

4.1.1 Ambiente climatizado sem ventilação natural

A amostragem de ambiente climatizado artificialmente sem ventilação natural foi realizada no Laboratório de Ultra Estrutura Celular Herta Meyer (LUCHM) do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), na sede da Ilha do Fundão. O campus é composto por diversos prédios alocados em um grande gramado e circundado pela Baía de Guanabara. O LUCHM está situado no subsolo no prédio do Centro de Ciências da Saúde (CCS) e foi

construído na década de 60 (FIGURA 1A e 1B). Devido a sua localização, o LUCHM recebe ventilação exclusivamente proporcionada por sistemas de ar artificial tipo *Split*, sem nenhuma iluminação natural, tendo uma porta para entrada e saída de pessoas e outra de emergência (FIGURA 1C). O laboratório é dividido em dois salões centrais e outras 19 salas menores anexadas (FIGURA 1D). Os salões principais são dedicados à pesquisa em bancadas e as salas em anexo são destinadas a equipamentos de diferentes naturezas ou atividades específicas, como cultivo de células, biotério, biologia molecular, microscopia, etc. Um dos salões principais foi selecionado para o estudo por ser o local onde os usuários do laboratório concentram a maior parte das suas atividades, permanecendo por longos períodos de tempo. Além disso, devido à condição restrita de renovação do ar interno, este salão possui atributos potenciais para ser um ambiente com altos níveis de concentração de poluentes interiores.

4.1.2 Ambiente climatizado com ventilação natural

O segundo local avaliado foi a sala do Presidente do INMETRO localizada na sede administrativa do Instituto de Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) localizada no Rio Comprido, RJ (FIGURA 2A). O prédio possui 8 andares climatizados artificialmente por condicionadores de ar tipo *Split* e todas as salas possuem janelas que, na maior parte do tempo, permanecem abertas fornecendo ventilação natural, proporcionando a renovação do ar interno (FIGURA 2B).

A área selecionada para o estudo consiste em uma superfície de 45m² revestida por carpete e mobília de escritório, circundadas por uma varanda voltada frente a uma pequena região arborizada (FIGURA 2A). As salas possuem condicionadores de ar do tipo *Split* e a estrutura do antigo sistema de ar condicionado central ainda permanece presente (FIGURA 2C). Apesar disso, a ventilação natural é utilizada como principal forma de renovação de ar e ventilação, sugerindo ser um ambiente com baixos níveis de poluentes interiores. Estas salas foram escolhidas como segundo local de amostragem devido à parceria deste trabalho com o INMETRO e por possuírem características de um ambiente possivelmente pouco contaminado.



FIGURA 1. Ambiente climatizado sem ventilação natural. (A) Imagem de satélite extraída do GoogleMaps da Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, onde fica situada a UFRJ. (B) Entrada do Centro de Ciências da Saúde, onde o IBCCF e o LUCHM ficam alocados. (C) Corredor do subsolo do CCS mostrando a porta de entrada do LUCHM. (D) Salão principal do LUCHM onde foram realizadas as amostragens.

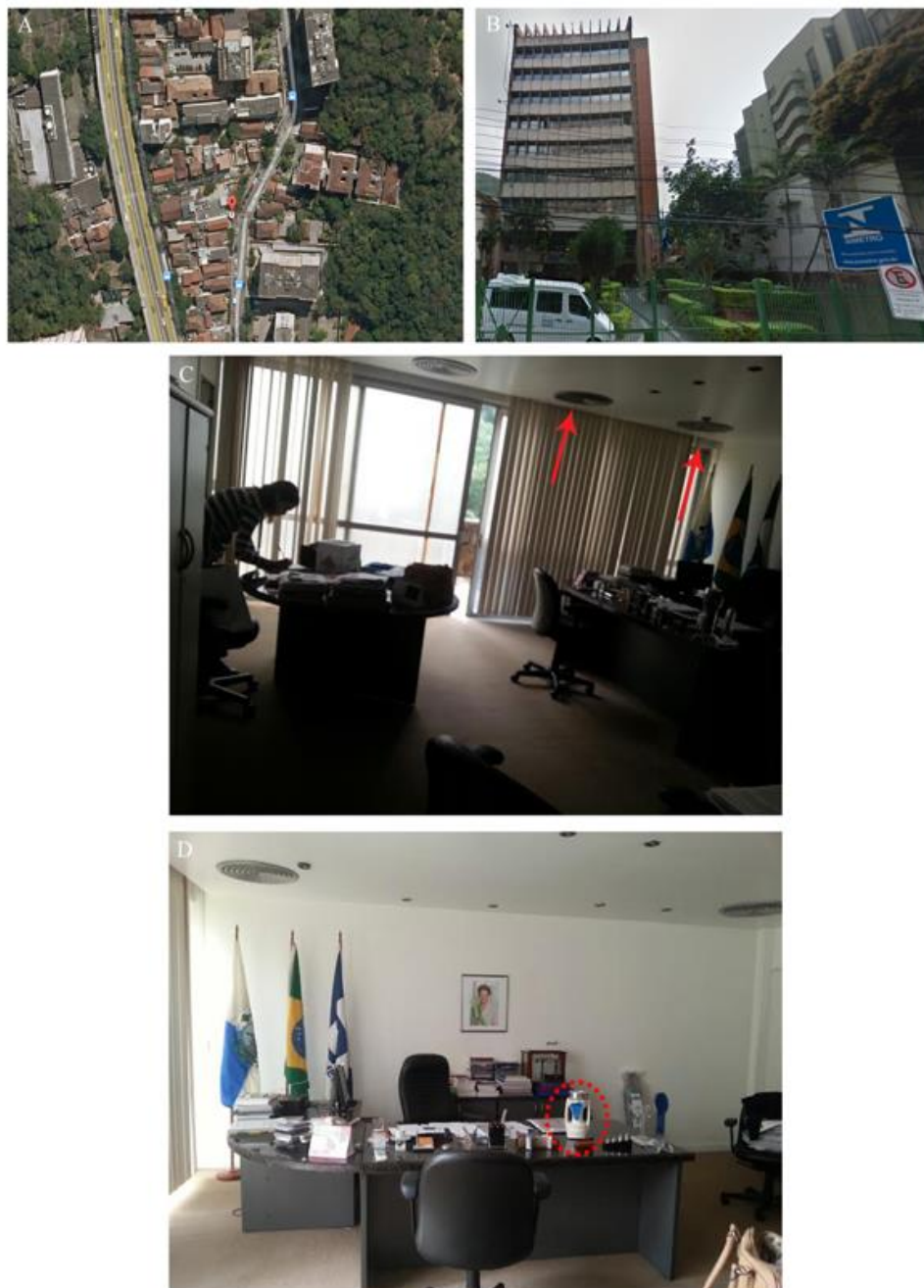


FIGURA 2. Ambiente climatizado com ventilação natural. (A) Mapa extraído do GoogleMaps com a localização da sede do INMETRO no Rio Comprido e seu entorno. O prédio fica em um quarteirão que possui área residencial e comercial voltado para uma pequena região arborizada. (B) Imagem do prédio da sede administrativa do Instituto de Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), localizado no Rio Comprido (GoogleMaps). (C) As setas em vermelho mostram a saída de ar do antigo sistema de ar condicionado central na sala do Presidente João Jornada. (D) O círculo em vermelho mostra a localização do amostrador de ar sobre a mesa Presidente durante a amostragem.

4.2 MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE AMOSTRAS

Os ambientes de interesse foram avaliados através de três tipos de amostragem: passiva, ativa e direta. Os critérios e estratégias de amostragem foram embasados na NT 001 que regulamenta a pesquisa, monitoramento e controle ambiental da possível colonização e multiplicação de fungos em ar ambiental interior (ANVISA, 2003).

4.2.1 Estratégia de Amostragem

A obtenção de amostras realizadas no interior dos ambientes escolhidos foi coletada a 1,50 m do solo, em ambas as metodologias, durante o período de 10 minutos. As amostragens utilizaram o mesmo meio de cultura e foram realizadas no mesmo dia sob as mesmas condições. A quantidade de pontos amostrados em cada ambiente foi estabelecida de acordo com a quantidade de condicionadores de ar presentes na área e/ou com base na metragem de área construída (TABELA 3). Apesar de não ser preconizado pela norma, em todas as amostragens, foram realizadas duplicatas.

4.2.1.1 Estratégia de amostragem empregada no ambiente climatizado sem ventilação natural.

A RE nº 09 sugere que em áreas com possíveis taxas elevadas de contaminantes internos sejam realizadas amostragens com tempo e volume inferiores a 10 minutos. O salão amostrado possui 67,42m² e dois condicionadores de ar tipo *Split*, sendo equivalente a um único ponto de amostragem de acordo com a metragem ou dois pontos de acordo com o número de condicionadores de ar. Entretanto, para garantir a eficiência da amostragem e mensuração real das concentrações de UFCs presentes no ar, este ambiente foi dividido de maneira uniforme, em três pontos, sendo mantidos 10 minutos como tempo de amostragem (FIGURA 3).



FIGURA 3. Imagens do ambiente climatizado sem ventilação natural onde as amostragens foram realizadas. (A) e (B) São imagens do salão principal do LUCHM onde são realizados os procedimentos de rotina dos funcionários e alunos.

4.2.2 Amostragem Ativa

A amostragem ativa foi realizada através do amostrador de ar por impactação linear *SAMPL'air PRO* (AES) (FIGURA 4B). Através deste aparelho o ar foi insuflado para seu interior passando por grades de aço (FIGURA 4A), sendo depositado em pontos definidos sob o meio de cultura contido na placa de Petri de 90mm (Prolab, RJ, Brasil). O meio utilizado foi o Batata Dextrose Ágar (BDA) (Hilmedia, RJ, Brasil) por ser um meio de cultura cientificamente validado para cultivo de fungos. Este meio foi suplementado com 50mg/L Penicilina/Streptomicina (P/S), para prevenir o crescimento indesejável de colônias bacterianas. Foi captado 100L/min de ar durante 10 minutos, em duplicata (ANVISA, 2003).

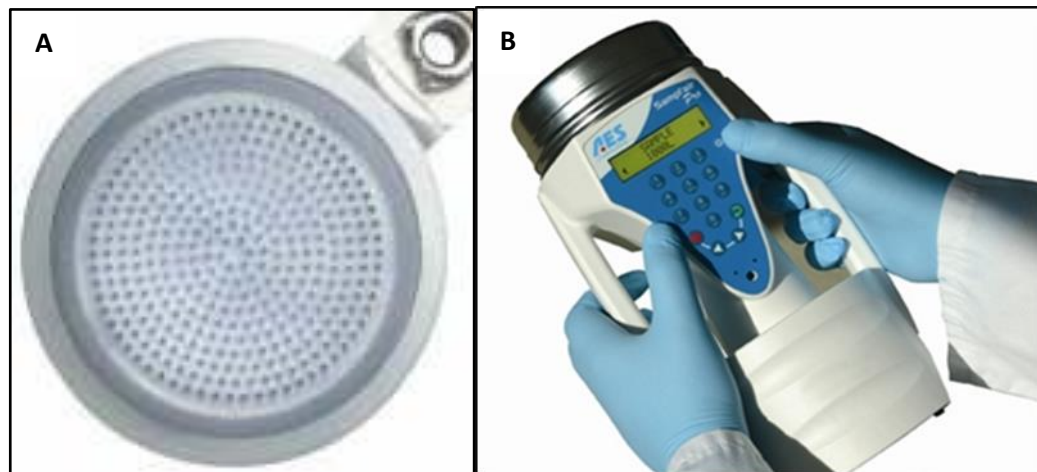


FIGURA 4. Imagens do tipo de amostrador de ar por utilizado. (A) Grades de aço que compõe o Amostrador. (B) Amostrador de ar por impactação linear *SAMPL'air PRO* utilizado nas amostragens ativas realizadas nos ambientes climatizados artificialmente (Fonte: Manual *SAMPL'air*®).

4.2.3 Amostragem passiva

Dentre os tipos de métodos passivos de avaliação do ar interior, a sedimentação espontânea foi escolhida como amostragem passiva por ser amplamente utilizada para avaliação do ar interior (CALDEIRA *et al*, 2001). Ela consiste na exposição de placas de Petri contendo meio de cultura, expostas por tempo determinado, no ambiente a ser avaliado. Duas placas de Petri contendo meio BDA (P/S) foram expostas durante 10 minutos em paralelo às amostragens ativas realizadas. Os pontos de amostragem passiva estabelecidos no ambiente com ventilação natural e no ambiente sem

ventilação natural foram os mesmos utilizados na amostragem ativa como descrito nos itens 4.2.1.1 e 4.2.1.2 anteriormente.

4.2.4 Amostragem Direta

Para complementar as amostragens realizadas nos ambientes selecionados, um terceiro tipo de amostragem foi realizado, a amostragem direta. Foram realizadas coletas diretas do filtro dos aparelhos de ar condicionado. Para obtenção das amostras, um Swab estéril embebido em 10 mL de NaCl 1M (Himedia, RJ, Brasil) também estéril foi utilizado. O Swab foi passado por toda a extensão do filtro a fim de coletar os possíveis esporos fixados nos condicionadores de ar no ambiente. Em seguida, o Swab foi introduzido em um tubo falcon (Prolab, RJ, Brasil) contendo 4 mL da mesma solução e homogeneizado com auxílio de um vórtex. Em ambiente estéril, alíquotas de 0,1 mL foram transferidas para placas duplicadas contendo o meio referência I descrito, sendo dispersas homogeneamente pela placa com auxílio de uma alça de Drigalsky para minimizar crescimentos sobrepostos.

4.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO

O meio BDA para cultivo dos isolados fúngicos foi previamente preparado de acordo com as instruções do fabricante, diluído em água Mili-Q e esterilizado por autoclave a 121°C por 20 minutos. Seguido da esterilização, ao atingir a temperatura de 50°C, foi adicionado 50mg/L (P/S), para prevenir o crescimento de bactérias. O meio foi distribuído em placas de Petri descartáveis e estéreis de 90 mm em cabine de segurança biológica. Após as coletas, as amostras obtidas foram cultivadas por 4 dias a 25°C para proporcionar o total crescimento dos fungos. A norma preconiza que as incubações sejam realizadas por períodos de 7 dias, entretanto, em placas mistas, fungos de crescimento rápido podem inviabilizar o crescimento e isolamento de outros, justificando a redução no tempo adotado.

4.4 QUANTIFICAÇÕES FÚNGICAS DOS ISOLADOS

A quantificação das células fúngicas obtidas foi realizada através de observação direta das unidades formadoras de colônia (UFCs), com auxílio da lupa digital. As contagens foram realizadas em todas as placas obtidas pelas diferentes amostragens.

4.5 ISOLAMENTO EM CULTIVO PURO DOS FUNGOS OBTIDOS

As culturas mistas obtidas pelas amostragens foram repicadas em placas de Petri de 90mm (Prolab, RJ, Brasil) contendo meio BDA. Cada colônia presente na placa de cultura mista foi repicada até o isolamento em cultivo puro. As incubações foram realizadas a 25°C por 7 dias, como preconizado pela norma.

4.6 TESTES PARA DETECÇÃO DE POSSÍVEIS PATÓGENOS HUMANOS

Para a identificação de possíveis patógenos humanos dentre os isolados, incubações a 37°C foram realizadas. Após a obtenção de culturas puras, as células fúngicas isoladas nos dois ambientes selecionados foram inoculadas em uma nova placa contendo o mesmo meio de cultura sendo incubadas em seguida por 7 dias, como preconizado pela norma.

4.7 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO CLÁSSICA DOS ISOLADOS FÚNGICOS

A identificação presumitiva das células fúngicas obtidas foram fundamentadas na observação de aspectos macroscópicos, por taxonomia clássica e sistemas automatizados.

4.7.1 Identificação dos fungos por Características Macroscópicas.

Fungos filamentosos apresentam colônias algodinosas, aveludadas ou pulverulentas, possuindo diversas topografias e colorações, sendo necessária a observação da frente e do verso da colônia. Leveduras formam colônias de aspecto pastoso ou cremoso podendo ter colorações diversas e foram repicadas por estriamento. A TABELA 7 detalha como as características macroscópicas observadas e como foram analisadas e descritas nas fichas de identificação (ANVISA, 2004).

4.7.2 Identificação dos fungos por Microscopia Óptica.

A técnica de microcultivo é indicada para fungos filamentosos, pois preserva a disposição original das estruturas fúngicas (FIGURA 5). Todo o processo de montagem foi realizado em cabine de segurança biológica com material previamente esterilizado por autoclavação. Para montagem, uma camada de gaze umedecida com água destilada estéril foi forrada no fundo de uma placa de Petri de vidro para servir de base de sustentação e fonte de umidade. Sobre ela, foi colocada uma lâmina de vidro contendo uma gota de meio de cultura (BDA) para o crescimento do fungo. A gota de meio possui uma topografia restringida, que promove o crescimento das estruturas fúngicas em um espaço limitado, diminuindo a tridimensionalidade durante a visualização microscópica. A partir de repique recente, o fungo foi inoculado na gota de meio e recoberto por uma lamínula de vidro.

Após o período de incubação, de 10 a 15 dias, a 25°C, a lamínula foi retirada da montagem e colocada sobre uma gota de azul de lactofenol (Fluka, MO, USA) em uma nova lâmina para visualização das estruturas de reprodução por Microscopia Óptica (LEICA DM5000B). A identificação microscópica dos fungos filamentosos foi baseada na observação das estruturas microscópicas onde foi analisada a diferença na forma das hifas, pigmentação, forma e disposição dos conídios no corpo de frutificação.

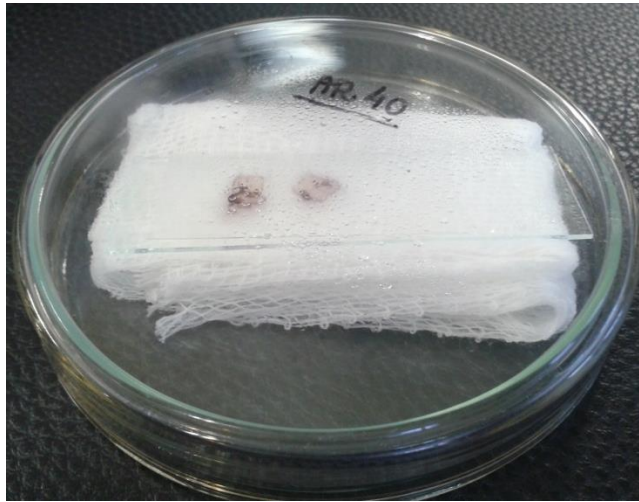


FIGURA 5. Montagem de microcultivo para análise microscópica de fungos filamentosos.

A morfologia de leveduras não possui grande diversidade, limitando a identificação sendo normalmente necessária a adoção de testes complementares para findar a identificação. A visualização microscópica foi restrita ao formato e brotamento das células fúngicas e a produção de possíveis estruturas como pseudo-hifas ou formação de cápsula polissacarídica. Para visualização dos brotamentos e forma das células por microscopia ótica uma alçada da colônia foi homogeneizada em 500 μ L de água destilada em um microtubo (Alfa, RJ, Brasil). Em uma lâmina de vidro uma gota de azul de lactofenol foi colocada e 10 μ L do homogeneizado adicionado a ela, sendo recoberto por uma lamínula e em seguida visualizada por Microscopia Ótica.

Para pesquisa de cápsula o meio BDA e o meio mínimo (3 g/L Glicose; 2,5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 4 g/L KH_2PO_4 ; 1 g/L Glicina) foram utilizados para cultivar as células alvo por 5 dias sob incubação de 30°C. O meio mínimo foi utilizado por favorecer a produção de cápsula (FONSECA *et al*, 2013). Uma alçada da colônia foi homogeneizada em 500 μ L de água destilada e uma alíquota de 10 μ L foi colocada em uma lâmina adicionalmente a uma gota de tinta nanquim. A visualização da cápsula por Microscopia Ótica ocorre devido à refringência da parede celular que contrasta com o fundo negro da tinta nanquim formando um halo branco ao redor da levedura (ANVISA, 2004).

A filamentação de leveduras foi visualizada por técnica de microcultivo assim como descrito para fungos filamentosos. Entretanto, o meio utilizado foi o ágar fubá

para favorecer a formação das pseudo-hifas. As leveduras foram semeadas e incubadas por até 72hs a 30°C.

4.7.3 Identificação das leveduras pelo Sistema automatizado VITEK® II.

Foi utilizado o sistema VITEK® II (Biomerieux) para identificação das leveduras (FIGURA 6). Este sistema consiste num equipamento de identificações microbianas baseado em testes de assimilação de fontes de Carbono e Nitrogênio (LOBATO, 2011). Para preparação das amostras, as leveduras foram cultivadas em meio BDA e incubadas a 30°C por 48 hs. A partir deste repique, uma alçada foi diluída em um tubo de vidro contendo 3 mL de solução salina 0,45% estéril sendo ajustada entre 1,8 a 2,5 na escala de McFarland. Para confirmação de que o inóculo está dentro desta faixa na escala, o tubo é homogeneizado em movimentos circulares e colocado em um colorímetro (PEREIRA, 2010).



FIGURA 6. Foto do Sistema VITEK® II utilizado nas identificações das leveduras (fonte: Biomerieux).

Em uma estante específica do equipamento VITEK II, os tubos são interligados à carta de identificação YST e colocados dentro do aparelho que transfere o inóculo para o cartão através de um sistema de vácuo iniciando a incubação/leitura do VITEK® II. O cartão YST para organismos tipo-levedura foi utilizado. Cada cartão possui 64 poços contendo substratos bioquímicos desidratados que serão assimilados ou não pela levedura em questão (<http://www.biomerieux.com.br>).

4.7.4 Identificação das leveduras pelo sistema visual API[®]20

O kit comercial API[®] 20 C AUX (Biomerieux) foi outro sistema utilizado para identificação, visto que algumas leveduras não foram identificadas pela técnica anterior. O protocolo de preparação das amostras foi o mesmo utilizado anteriormente mantendo o inóculo dentro da mesma faixa da escala de McFarland. É uma técnica simples, baseada em provas de assimilação de carboidratos, tendo um controle positivo e negativo para o crescimento/assimilação da levedura ao substrato em questão (FIGURA 7). A identificação é concluída consultando o sistema de identificação disponível na internet, o ApiWeb (<http://www.biomerieux.com.br>).



FIGURA 7. Imagem das provas de assimilação de carboidratos realizadas pelo kit comercial API[®] 20 C AUX (fonte: Biomerieux).

4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O Graphpad Prism[®] foi utilizado para realizar a análise estatística entre os pontos amostrados e entre os tipos de amostragens utilizadas (www.graphpad.com/scientific-software).

5 RESULTADOS

5.1 AMOSTRAS OBTIDAS DE ACORDO COM AS METODOLOGIAS UTILIZADAS

As amostragens realizadas nos ambientes selecionados, utilizando cada metodologia descrita, resultaram em placas de culturas mistas (FIGURA 8 e 9). As UFCs de cada placa obtida foram contadas e cada colônia presente foi repicada em uma nova placa contendo o mesmo meio. Este processo foi repetido até a obtenção de culturas puras. Como nomenclatura temporária, cada cepa recebeu a sigla AR seguida de um número para os isolados do ambiente sem ventilação natural e ARJ para os isolados do ambiente com ventilação natural (ANEXOS 2 e 3).

5.1.1 Ambiente climatizado sem ventilação natural (LUCHM)

No ambiente climatizado sem ventilação natural, através das placas de culturas mistas proveniente das amostragens foram obtidas 924 UFCs (FIGURA 8). Destas, 800 foram obtidas por amostragem ativa, 52 por amostragem passiva e 72 por amostragem direta, correspondendo a uma média de 181, 8,7 e 12 respectivamente (TABELA 8). Todos os isolados foram catalogados quanto ao tipo de amostragem e caracterizações morfológicas realizadas, ver ANEXO 2.

TABELA 8: Quantidade de unidades formadoras de colônias totais obtidas no ambiente climatizado sem ventilação natural. As colunas representam as duplicatas realizadas por cada amostragem.

PONTOS	ATIVA		PASSIVA		DIRETA	
A	99	52	5	1	33	2
B	137	174	6	8	22	13
C	157	181	18	14	1	1
Total	800		52		72	
Med±DP	181 ± 49,6		8,7 ± 6,2		12 ± 13,3	

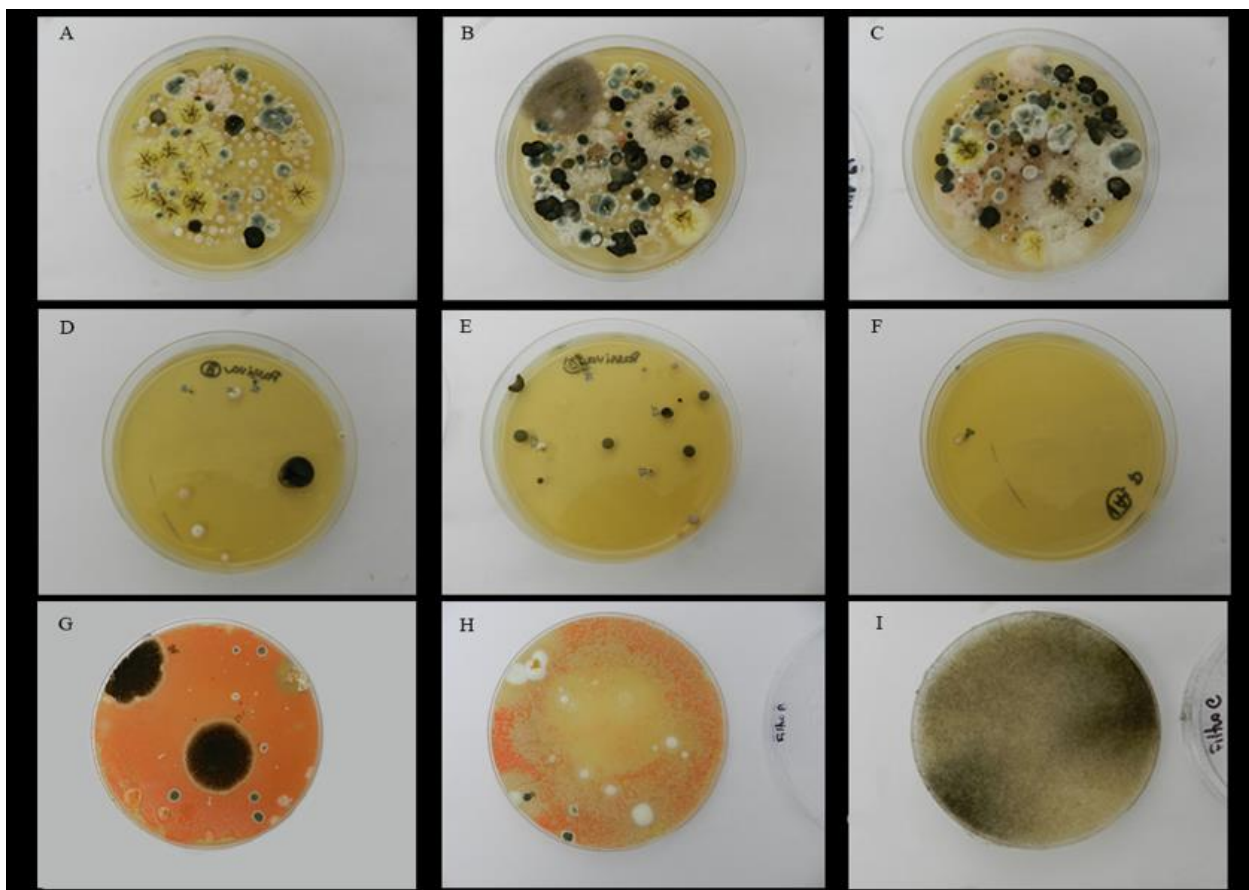


FIGURA 8. Culturas mistas obtidas pelos diferentes tipos de amostragens realizadas no ambiente climatizado sem ventilação natural. (A) (B) (C) Culturas mistas obtidas através da amostragem Ativa. (D) (E) (F) Culturas mistas obtidas através da amostragem Passiva. (G) (H) (I) Culturas mistas obtidas através da amostragem Direta.

5.1.2 Ambiente climatizado com ventilação natural (INMETRO)

Neste ambiente, a concentração das células fúngicas presentes no ar totalizou 137 UFCs pelas diferentes metodologias utilizadas (FIGURA 9). A diferença na quantidade de recuperação de conídios pelas metodologias foi bastante significativa, onde 124 UFCs coletadas através da amostragem ativa 13 UFCs através da passiva (TABELA 9).

TABELA 9: Quantidade de unidades formadoras de colônias totais obtidas no ambiente climatizado com ventilação natural. As colunas representam as triplicatas realizadas por cada amostragem.

	ATIVA	PASSIVA
UFCs	36	3
	6	4
	82	6
Total	124	13
Med ± DP	41,3 ± 38,3	4,3 ± 1,5

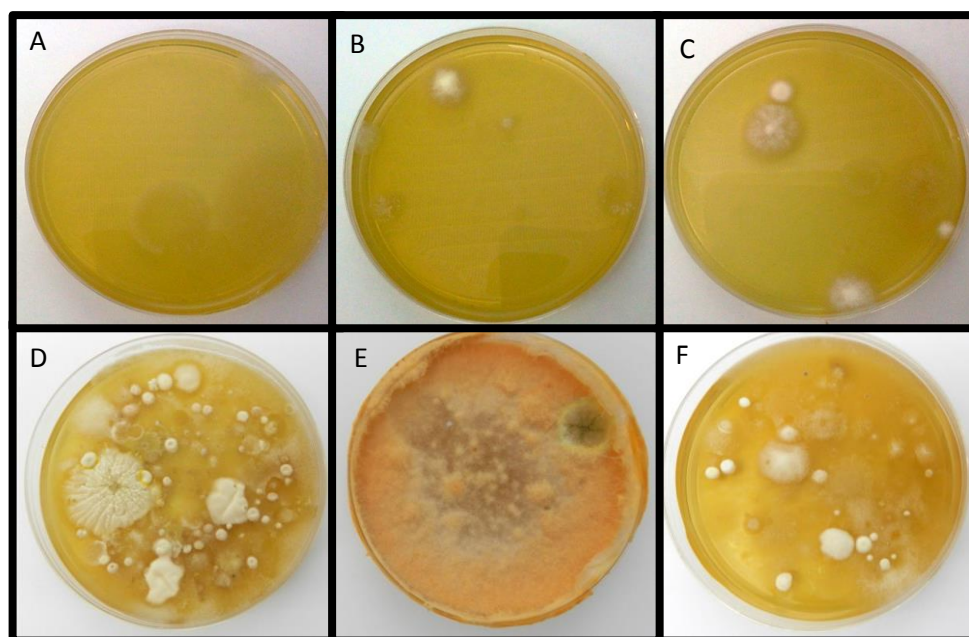


FIGURA 9. Culturas mistas obtidas pelos diferentes tipos de amostragens realizadas no ambiente climatizado com ventilação natural (placas de 90mm). (A) (B) (C) Culturas mistas obtidas através da amostragem Ativa. (D) (E) (F) Culturas mistas obtidas através da amostragem Passiva.

5.1.3 Amostragens Passivas

No ambiente climatizado sem ventilação natural, a amostragem passiva realizada mostrou-se pouco eficaz em quantificar as UFCs, contribuindo com apenas 2,8% do total coletado (FIGURA 10). Assim como na avaliação do ambiente sem ventilação natural, a amostragem passiva demonstrou ser uma técnica limitada para avaliar a real

quantidade de UFCs presentes em ambientes interiores pouco contaminados. No ambiente com aeração natural apenas 6,3% do total, foi coletado por este tipo de amostragem (FIGURA 10).

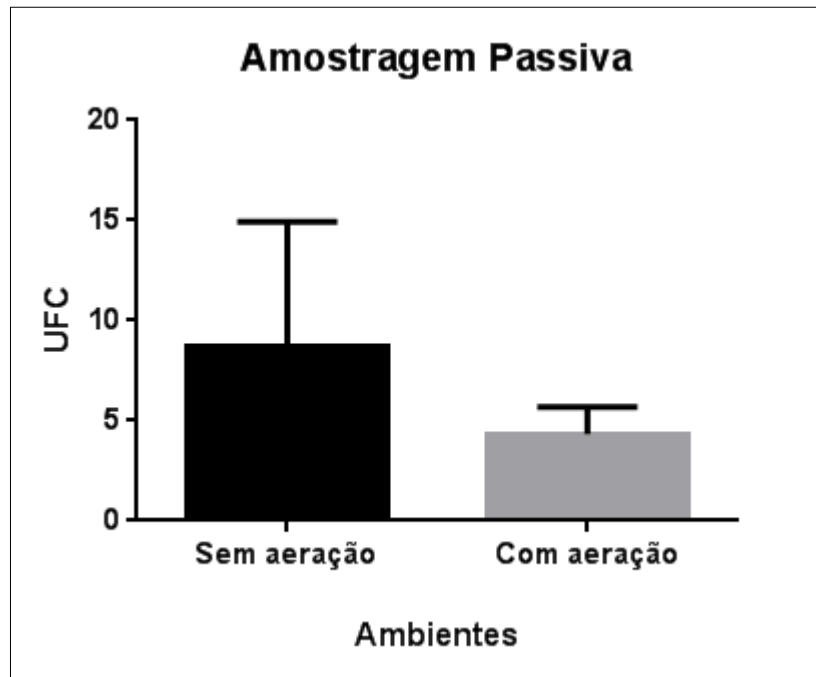


FIGURA 10. Gráfico comparativo entre as amostragens passivas realizadas. Comparação entre a quantidade de UFCs nos ambientes com e sem ventilação natural.

5.1.4 Amostragens Ativas

A amostragem ativa demonstrou uma eficiência superior às demais metodologias testadas obtendo 59% das UFCs adquiridas no ambiente sem ventilação natural. Essa porcentagem corresponde ao total de 800 UFCs coletadas (FIGURA 11). Assim como no primeiro ambiente avaliado, a amostragem ativa apresentou números mais significativos que a passiva, no ambiente com ventilação natural. Foram coletadas 137 UFCs, das quais 124 são provenientes da amostragem ativa, sendo equivalente a 60% do total de UFCs coletadas neste ambiente (FIGURA 11).

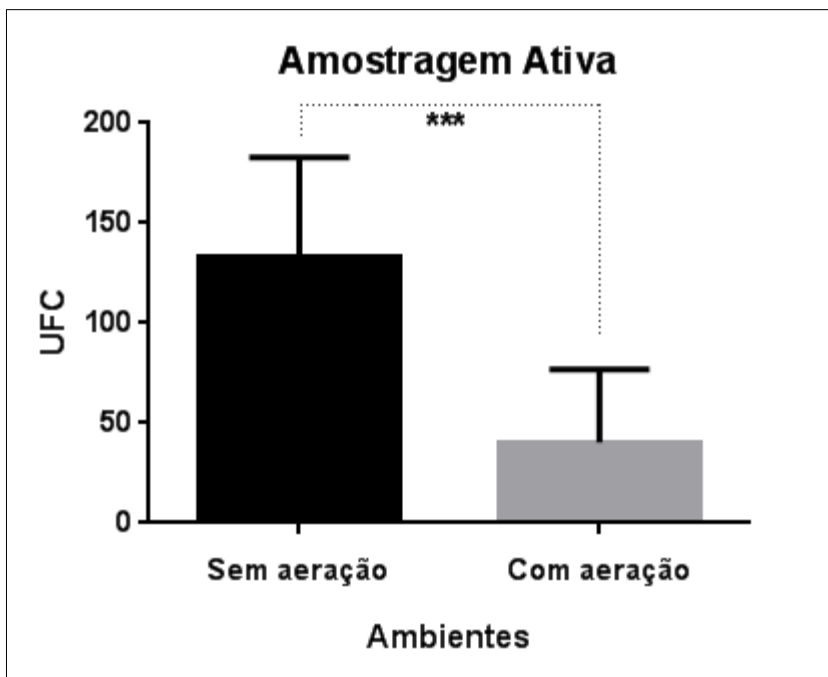


FIGURA 11. Gráfico comparativo entre as amostragens ativas realizadas. Comparação entre a quantidade de UFCs nos ambientes com e sem ventilação natural (p-valor= 0.1281 calculado por t-test).

5.1.5 Amostragem Direta

A amostragem direta foi a última metodologia empregada para avaliar a QAI. Este tipo de amostragem foi realizado apenas no ambiente sem ventilação natural, devido ao uso facultativo da climatização artificial no ambiente com ventilação natural.

Pela coleta Direta do Filtro foi obtido um total de 72 UFCs coletadas, no ambiente climatizado sem ventilação natural, correspondendo a 3,8% das UFCs. Esta metodologia obteve 70% das UFCs leveduriformes isoladas no ambiente, número possivelmente subestimado, devido a grande sobreposição de colônias como demonstra a Figura 12.

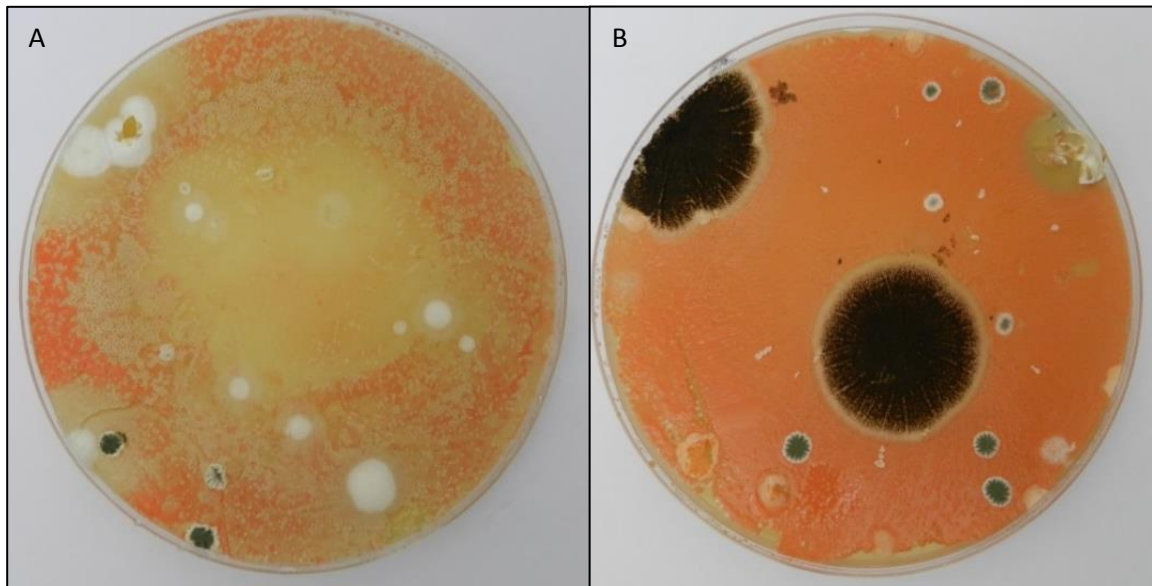


FIGURA 12. Placas de cultura mista obtidas pela amostragem direta (A e B). As placas evidenciam a grande quantidade de leveduras obtidas por esta metodologia no ambiente climatizado sem ventilação natural (UFRJ).

5.1.6 Correlação entre as amostragens

No ambiente sem ventilação natural, foram obtidas 924 UFCs ultrapassando o limite de 750 UFCs/m³ de ar estabelecido pela ANVISA (FIGURA 13). A alta concentração de UFCs neste ambiente sustenta o esperado, devido a total dependência de ventilação do ambiente aos condicionadores de ar. Quando comparadas com as amostragens passivas realizadas, a amostragem por amostrador de ar destacou-se tanto da quantidade de UFCs obtidas, bem como na diversidade fúngica coletada (FIGURA 14).

No ambiente climatizado com ventilação natural, tanto a diversidade morfológica quanto a concentração de UFCs presente no ar interior foram inferiores, quando comparadas ao ambiente sem ventilação natural (FIGURA 15). A ventilação proporciona uma maior frequência da renovação do ar interior, desfavorecendo a concentração de esporos fúngicos. O total de 137 UFCs respeita os limites de concentração de esporos estabelecidos pela ANVISA para ambientes climatizados artificialmente (FIGURA 13).

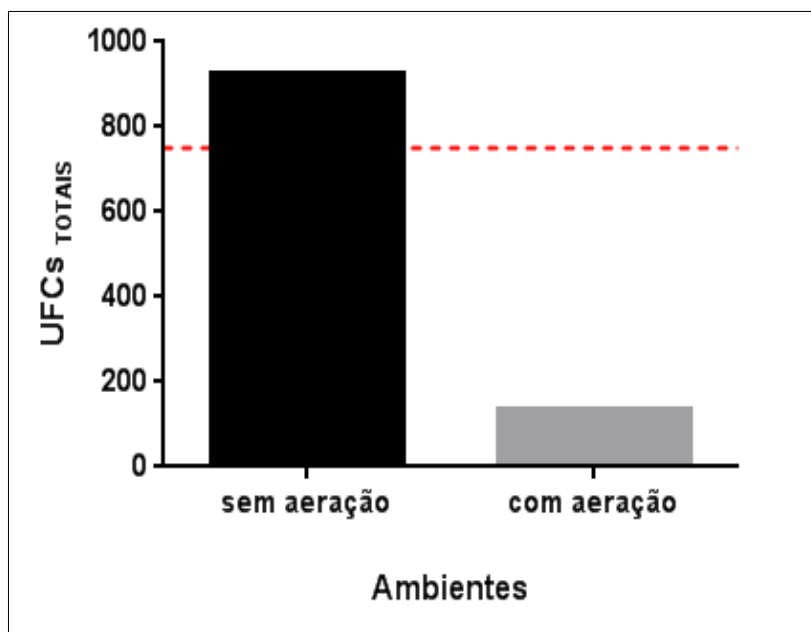


FIGURA 13. Comparativo entre as unidades formadoras de colônias totais obtidas nos ambientes amostrados. A linha pontilha em vermelho representa o limite de 750 UFCs/m³ de ar permitido pela ANVISA em um ambiente climatizado artificialmente.

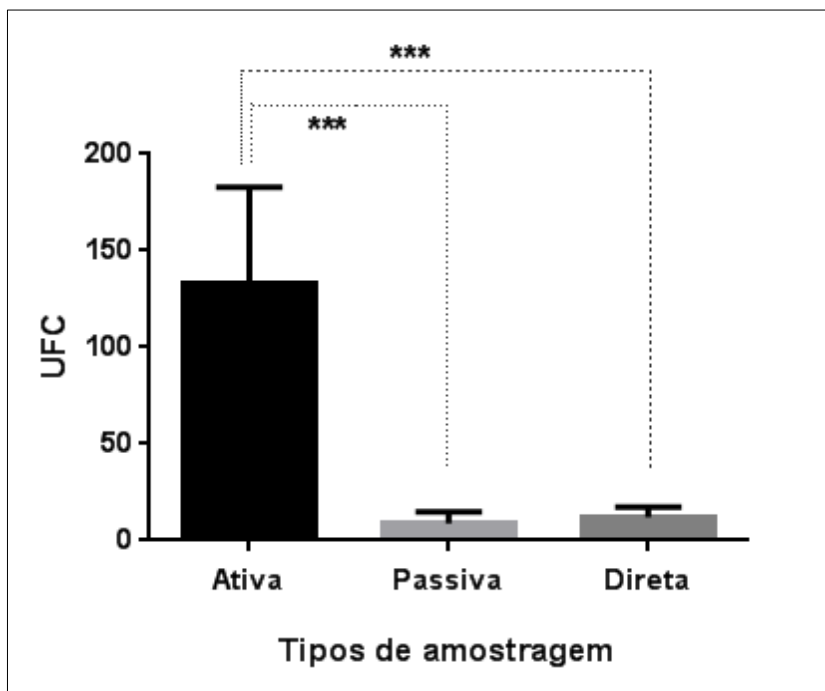


FIGURA 14. Gráfico comparativo entre as amostragens realizadas no ambiente sem ventilação natural. Comparação entre a quantidade de unidades formadoras de colônias obtidas por cada tipo de amostragem. *** Ativa x Passiva (p-valor=.0.0001; Direta x Passiva (p-valor=0.5906); Direta x Ativa (p-valor= 0.0002); Passiva x Direta (não significativa).

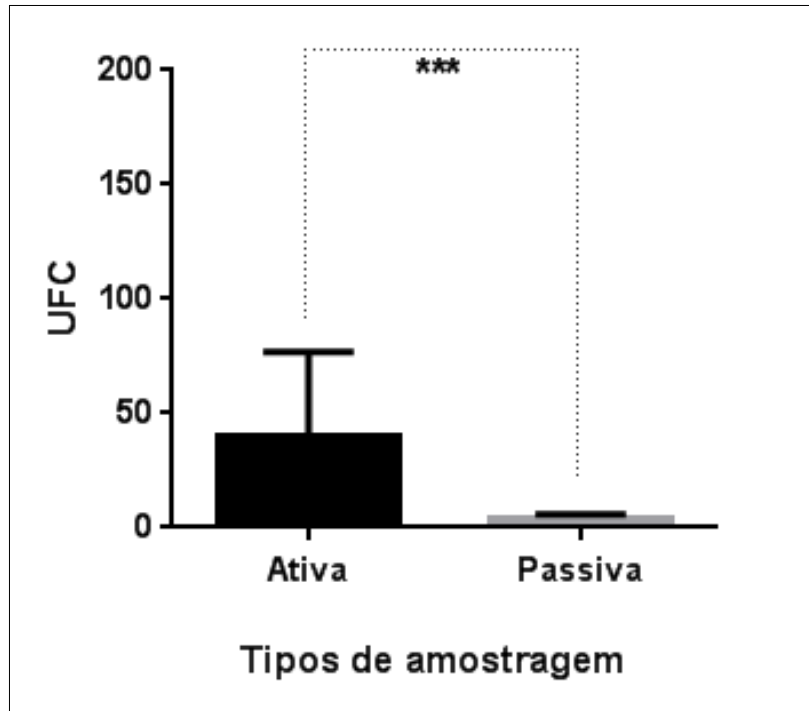


FIGURA 15. Gráfico comparativo entre as amostragens realizadas no ambiente com ventilação natural. Comparação entre a quantidade de unidades formadoras de colônias obtidas pelos dois tipos de amostragem. *** Passiva x Ativa (p-valor=0.0359)

5.2 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO CLÁSSICA DOS ISOLADOS FÚNGICOS

As identificações foram realizadas combinando as informações obtidas por cada técnica utilizada. Fichas cadastro foram elaboradas para armazenar todas as informações referentes a cada cepa adquirida, formando um compêndio de informações que facilitaram as identificações (ANEXO 2 e 3).

5.2.1 Caracterização dos isolados fúngicos no ambiente climatizado sem ventilação natural

Neste ambiente, foi obtido um total de 55 fungos diferentes morfológicamente através das amostragens testadas, sendo 46 filamentosos e 9 leveduras. Pela Amostragem Passiva, foram obtidas 52 UFCs, que depois de isoladas, resultaram em

16 identificações de fungos filamentosos e 1 identificação de levedura. Através da Amostragem Direta, 72 UFCs foram obtidas que, depois de isoladas, totalizaram em 7 identificações de fungos filamentosos e 5 identificações de leveduras. Apesar da baixa diversidade morfológica, este tipo de amostragem foi o mais eficaz em coletar as leveduras presentes no ambiente correspondendo a aproximadamente 70% das UFCs obtidas (FIGURA 12). Além da maior eficácia na recuperação de UFCs, Amostragem Ativa obteve a maior diversidade morfológica, para fungos filamentosos, dentre as metodologias avaliadas. As 800 UFCs corresponderam ao total de 3 identificações de leveduras e 24 identificações de filamentosos. Neste ambiente, algumas espécies identificadas foram isoladas por mais de uma metodologia, ver anexo 2.

5.2.1.1 Identificações por Características Macroscópicas

As características macroscópicas foram observadas e o registro fotográfico (Sony Cyber-Shot) foi realizado após 5 a 7 dias do isolamento de acordo com o crescimento do fungo. Cada cepa isolada em placa de Petri foi fotografada frente e verso, pois ambas as informações são necessárias para descrição da mesma. Fungos filamentosos e leveduras têm morfologias diferentes, portanto, as características observadas e forma de isolamento são distintas. Apesar dos aspectos observados serem subjetivos, pois dependem do julgamento do observador, a caracterização macroscópica é imprescindível para identificação clássica dos fungos. Em alguns casos, esses aspectos foram utilizados como critério de diferenciação entre fungos microscopicamente semelhantes (FIGURA 16).

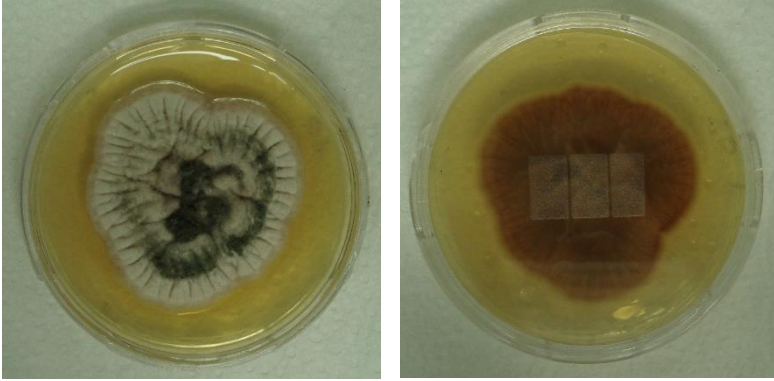
<p>Foto da placa:</p> 	<p>Descrição morfológica macroscópica:</p> <p>FILMENTOSO</p> <p>Frente da colônia Coloração: branco com centro verde Aspecto: aveludado Topografia: levemente convexa Superfície da colônia: irregular com muitas pregas Bordos: regulares</p> <p>Verso da colônia Coloração: amarela Aspecto: rugoso</p>
<p>Meio: Sabouraud (Hilmidia, RJ, Brasil) Libera pigmento difuso no meio: NÃO Crescimento a 37°C: NEGATIVO</p>	

FIGURA 16. Método utilizado para identificação macroscópica dos isolados contida nas fichas de identificação.

5.2.1.2 Identificação dos fungos por Microscopia Óptica.

A identificação das estruturas macroscópicas dos fungos filamentosos foi realizada devido à preservação das estruturas fúngicas, através da técnica de microcultivo (FIGURA 17). Entretanto, fungos não esporulados dificultam sua identificação em nível de gênero. No ambiente sem ventilação natural o gênero *Aspergillus* foi o mais significativo com 16 espécies distintas, seguido pelo gênero *Penicillium* com 7 isolados e *Rhizopus* com 2. Duas espécies de *Aspergillus* puderam ser identificadas em nível de espécie: *A. restrictus* e *A. niger*. Outros cinco gêneros foram obtidos com um único representante: *Mucor* sp., *Fusarium* sp, *Phialophora* sp., *Trichoderma* sp., *Scytalidium* sp. e *Exophiala* sp.. Um representante da Família *Dematiaceae* foi isolado, entretanto, através da visualização microscópica não foi possível a identificação em nível de gênero/espécie. *Hormonema dematioides* foi outra espécie isolada, além de 10 espécies de fungos não esporulados denominados *Mycelia sterilia*, e 3 espécies desconhecidas declaradas não identificadas.

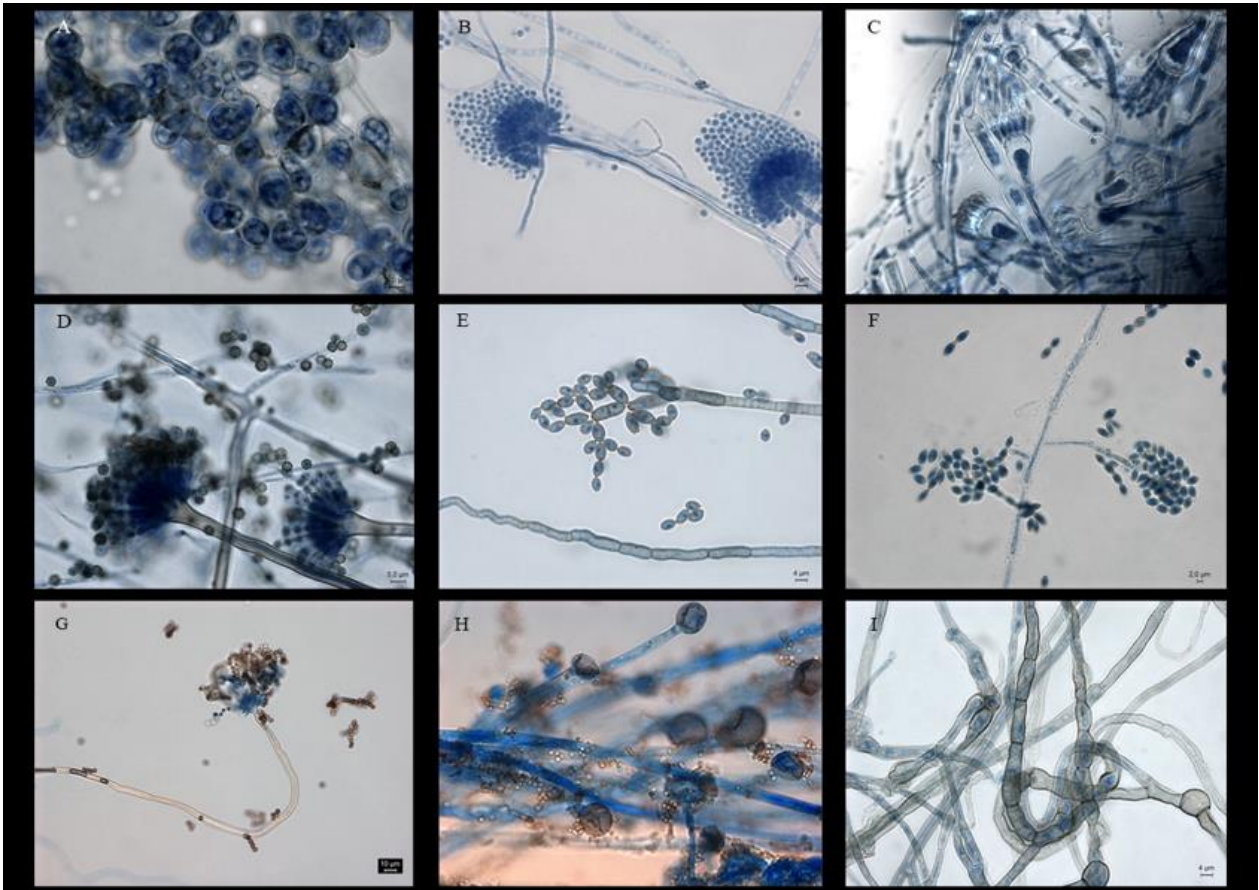


FIGURA 17. Estruturas fúngicas visualizadas por Microscopia Óptica (100x) obtidas dos fungos isolados no ambiente sem aeração natural. (A) *Mycelia sterilia*. (B) *Aspergillus* sp. (C) *Aspergillus* sp. (possível *A. restrictus*). (D) *Aspergillus* sp. (E) Fungo negro desconhecido / não identificado. (F) *Exophiala* sp. (G) *Aspergillus* sp. (H) *Rhizopus* sp. (I) *Mycelia sterilia*.

5.2.1.3 Identificação das leveduras pelo Sistema VITEK® II.

A morfologia das leveduras não agrega informações suficientes para identificação clássica, como no caso dos fungos filamentosos, sendo necessários testes complementares. As leveduras de ambos ambientes amostrados foram inicialmente testadas para identificações pelo VITEK. Este aparelho gera um relatório de dados, no qual consta o tipo de cartão utilizado, data, tempo de análise, grau de confiança da identificação e uma tabela contendo todos os detalhes bioquímicos testados (TABELA 10).

Pelo VITEK, das 16 leveduras testadas apenas 4 não foram identificadas, recebendo diagnóstico de organismo indefinido. Tal dificuldade foi prevista, visto que as amostras são ambientais e estes cartões YST para organismos tipo-levedura são originalmente voltados para área clínica. Sendo assim, testes complementares através do sistema API[®]20, testes de indução de cápsula e de filamentação de pseudo-hifas foram utilizados adicionalmente para concluir as identificações.

O gênero de leveduras *Rhodotorula* foi o mais abundante, havendo 8 representantes do gênero. Apenas uma delas foi identificada pelo VITEK em nível de espécie, *Rhodotorula minuta*, as demais foram identificadas apenas em nível de gênero, sendo definidas como *Rhodotorula sp.* Como as 8 leveduras identificadas como *Rhodotorula sp.* foram isoladas de um mesmo ambiente, elas foram subtraídas da contagem total de fungos constando como uma cepa única.

Os outros gêneros isolados neste ambiente foram *Cryptococcus* e *Candida*. Assim como o *Rhodotorula*, estes dois gêneros são comumente encontrados contaminando ambientes interiores (LOBATO, 2009). O VITEK conseguiu identificar uma cepa de *Cryptococcus albidus* e uma espécie de *Candida*, *Candida parapsilosis*. Testes de indução de pseudo-hifas foram realizados na cepa identificada como pertencente ao gênero *Candida* confirmando a presença dessas estruturas quando isoladas em meio Agar-Fubá.

TABELA 10. Detalhes bioquímicos dos testes realizados pelo VITEK II nas leveduras isoladas dos ambientes avaliados (Lista de siglas ANEXO 4).

RESULTADO	<i>Rhodotorula</i> sp.	<i>C. albidus</i>	<i>R. minuta</i>	Não identificado	<i>C.</i> <i>parapsilosis</i>	Não identificado	Não identificado	Não identificado	Não identificado	<i>Exophiala</i> sp.
LysA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TyrA	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
dGLUa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
dRAFa	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-
IRHAa	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
dTURa	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-
IGLTa	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
IPROa	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
IMLTa	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
BNAG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LACa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NAGA1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
XLTa	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+
dTREa	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-
dXYLa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2KGa	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
LeuA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ARBa	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
MAdGa	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
dMNEa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
dSORa	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
NO3a	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-
LATa	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+
NAGa	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
ARG	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
AMYa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
dCELa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
dMELa	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
SACa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
IARa	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ACEa	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
dGNTa	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+
ERYa	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+
dGALa	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
GGT	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+
dMLZa	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-
URE	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
dGATa	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+
CITa	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
GLYLa	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+
GENa	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
dMALa	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+
ISBEa	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+
AGLU	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
ESC	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
GRTas	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
Nº	AR 29	AR 98	AR 100	AR 115	AR 114	AR 71	AR 102	AR 65	AR 64	AR J 5

5.2.1.4 Identificação das leveduras pelo sistema API®20

Para as quatro leveduras que não obtiveram identificação satisfatória pelo VITEK, novos cultivos foram realizados para testes pelo sistema API®20. Este sistema possui uma série de substratos para assimilações onde os resultados foram comparados com o banco de identificação disponível na internet (ApiWeb) (TABELA 11). Os testes de indução de cápsula pelo cultivo em meio mínimo, visualizados por M.O. com nanquim, apresentaram uma discreta formação de cápsula nos 3 fungos identificados como pertencentes ao gênero *Cryptococcus*. Sendo eles: *Cryptococcus uniguttulatus*, *Cryptococcus laurentii* e *Cryptococcus sp.* Pelo ApiWeb, este último foi sugerido também como *Cryptococcus laurentii* com 52% de significância. *Rhodotorula muscilaginosa* foi quarta levedura identificada por este sistema. Uma das leveduras não identificada pelo VITEK também não obteve perfil bioquímico reconhecido pelo API®20 sendo declarada não identificada.

TABELA 11. Detalhes bioquímicos dos testes realizados pelo API® 20 nas leveduras isoladas dos ambientes avaliados (Lista de siglas ANEXO 4).

DETALHES BIOQUÍMICOS API®20																					
N°	GLU	GLY	2KG	ARA	XYL	ADO	XLT	GAL	INO	SOR	MDG	NAG	CEL	LAC	MAL	SAC	TER	MLZ	RAF	H/PH*	RESULTADO
AR 65	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	<i>R. muscilaginosa</i>
AR 71	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	<i>C. uniguttulatus</i>
AR 102	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	<i>C. laurentii</i>
AR 115	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	<i>Cryptococcus sp.</i>

5.2.2 Identificação dos isolados fúngicos do ambiente climatizado com ventilação natural

5.2.2.1 Identificações por Características Macroscópicas

As identificações macroscópicas seguiram os mesmos critérios estabelecidos no item 3.3.1.1 de Identificações por Características Macroscópicas como sugerido pela

ANVISA (2004). Neste ambiente, foram isolados 24 fungos morfologicamente distintos sendo 23 filamentosos e uma levedura.

5.2.2.2 Identificação dos fungos por Microscopia Óptica.

Neste ambiente, a identificação clássica foi baseada nos mesmos critérios descritos no item 3.3.1.2, fundamentadas nas estruturas microscópicas adjacentes às características macroscópicas descritas (FIGURA 18). Assim como no ambiente anteriormente descrito, fungos desconhecidos ou sem formação de conídios dificultam as identificações. Dos 23 filamentosos isolados, três gêneros foram iguais aos encontrados no ambiente sem ventilação natural: *Penicillium* sp., *Aspergillus* e *Fusarium* sp., todos com duas cepas. Além destes, foram isolados uma cepa do gênero *Paecilomyces* sp., 7 fungos sem formação de conídios (*Mycelia sterilia*) e 3 fungos desconhecidos.

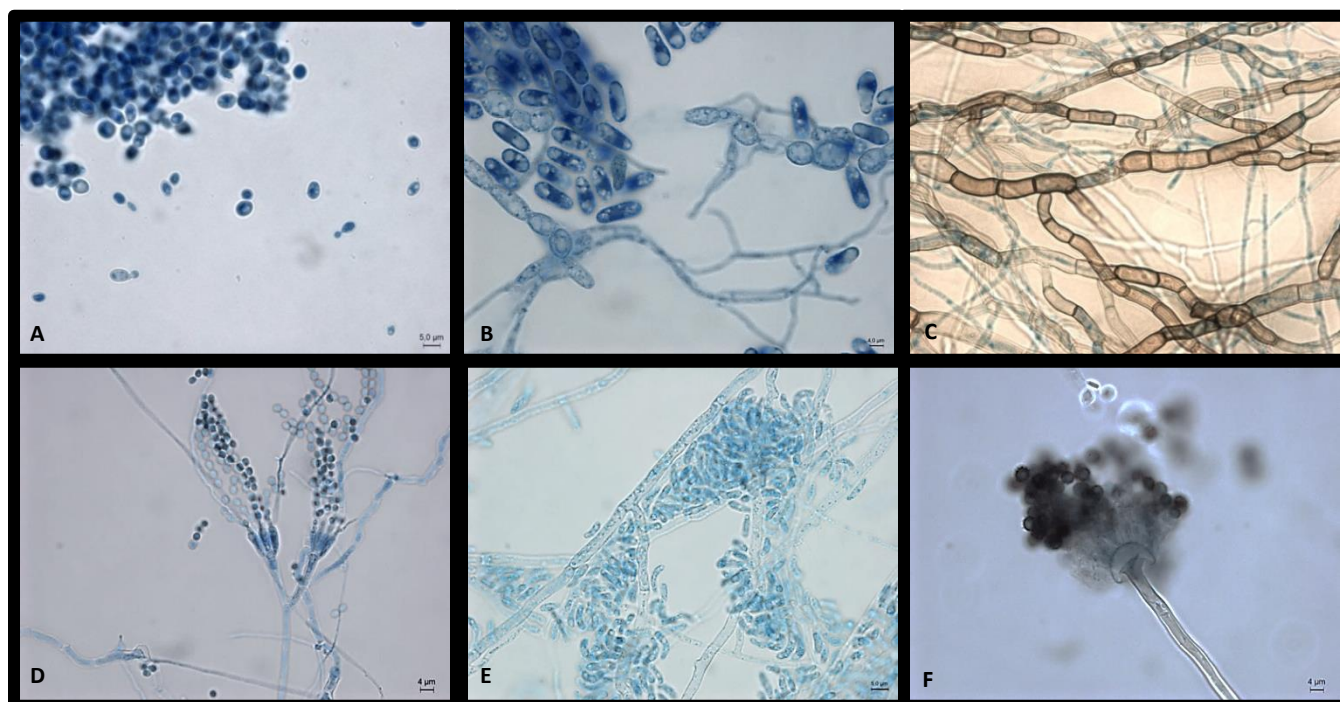


FIGURA 18. Estruturas fúngicas visualizadas por Microscopia Óptica (100x) obtidas dos fungos isolados no ambiente com aeração natural. (A) *Exophila* sp. (B) Fungo negro desconhecido / não identificado. (C) *Mycelia sterilia*. (D) *Paecilomyces* sp. (E) *Fusarium* sp. (F) *Aspergillus* sp.

5.2.2.3 Identificação das leveduras pelo Sistema VITEK[®] II.

No ambiente com ventilação natural apenas uma levedura foi isolada. Assim como as demais leveduras isoladas, ela foi testada primeiramente pelo sistema VITEK para identificação. Apesar de obtermos um padrão quanto a sua assimilação aos substratos testados, à identificação resultou como indefinida ou “fraca” para *Exophiala* sp. Adicionalmente, testes de identificação sistema pelo API[®]20 foram realizados obtendo um perfil bioquímico equivalente a *Exophiala* sp. finalizando assim a identificação (TABELA 10 e 11).

5.3 POSSÍVEIS PATÓGENOS HUMANOS

Em ambos os ambientes amostrados, todos os fungos adquiridos foram repicados até o isolamento. Em seguida, testes de crescimento a 37°C para verificar os possíveis potenciais patógenos foram em concomitância com as identificações.

5.3.1 Análise dos fungos com potencial patogênico do ambiente sem ventilação natural.

Neste ambiente, 18 cepas, correspondentes a 42% do total de fungos, responderam positivamente ao teste de crescimento a 37°C, após incubação de 5 dias. Grande parte dos fungos, como por exemplo, a *Rhodotorula mucilaginosa*, ainda que considerada não patogênica, é apontada em estudos como agente potencialmente danoso à saúde, especialmente em pessoas com imunidade comprometida. É associada à endocardite, peritonite e até mesmo meningite, além de agente causador primário oportunista de onicomiose (CUNHA *et al*, 2009; LOSS *et al*, 2011).

TABELA 12. Tabela dos fungos com possíveis potenciais patógenos isolados no ambiente climatizado sem ventilação natural.

FUNGO	TIPO DE AMOSTRAGEM	DANOS À SAÚDE HUMANA
<i>Penicillium</i> sp.	Ativa	Citado como agente potencialmente danoso a saúde de pessoas com imunidade comprometida como no caso de HIV sendo desencadeador de alergias e outras doenças do trato respiratório (QUADROS, 2008).
<i>Aspergillus</i> sp.	Ativa Filtro	A exposição a este fungo no meio ambiente pode provocar reações alérgicas em doentes hipersensíveis ou então aspergilose invasiva e doença disseminada em doentes com graves problemas de imunodepressão. A aspergilose invasiva ocorre numa ampla variedade de cenários clínicos, é variável nas suas manifestações, e ainda está associado com uma taxa de mortalidade muito elevada (CARVALHO, 2012).
<i>Familia Dematiaceae</i>	Ativa	Pode ocasionar micoses subcutâneas (cromoblastomicose, cromomicose doença de Pedroso e Lane ou doença de Fonseca), afetando a pele e o tecido subcutâneo, localizando-se nas extremidades inferiores e pé (TORRES <i>et al</i> , 2010).
<i>Scytalidium</i> sp.	Ativa	É considerado patógeno primário das unhas. A prevalência das infecções ungueais causadas por este fungo são mais comuns em adultos, principalmente mulheres (CURSI <i>et al</i> , 2011).
<i>Mucor</i> sp.	Ativa	Apesar de raras, este fungo pode causar infecções fatais (mucormicose) principalmente em pacientes com sistema imunológico comprometido (SANKAPAL & ABRAHAM, 2011).
Não identificado e <i>Mycelia sterilia</i>	Ativa	Não relatado
<i>Rhizopus</i> sp.	Passiva Ativa Filtro	Dependendo da espécie pode coadionar a mucormicose, infecção à pessoas imunocomprometidos devido a cetoacidose diabética, a neutropenia, a transplantação de órgãos , e / ou o aumento dos níveis séricos de ferro disponível podendo levar ao óbito (INBRAHIN <i>et al</i> , 2014) .
<i>Rhodotorula</i> sp.	Ativa	Este gênero é citado como patógeno oportunista tendo a capacidade de colonizar e infectar pacientes suscetíveis (WIRTH & GOLDANI, 2012).
<i>Rhodotorula minuta</i>	Filtro	Citada como agente potencialmente danoso à saúde, especialmente em pacientes imunossuprimidos, sendo associada endocardite, peritonite e até mesmo meningite (LOSS <i>et al</i> , 2011).
<i>Cryptococcus laurentii</i>	Filtro	Pode causar doença moderada a grave em pacientes humanos com imunidade comprometida (devido a infecção por VIH, quimioterapia, imunossupressão metabólica, etc.) (RODRIGUEZ & PINILLA, 2012).
<i>Candida parapsilosis</i>	Filtro	Apesar de <i>Candida albicans</i> ser a principal causa da candidíase, <i>Candida parapsilosis</i> é citada juntamente com outras espécies do gênero como patógeno humano sendo igualmente responsável por ocasionar micoses (SILVA <i>et al</i> , 2011).

5.3.2 Análise dos fungos com potencial patogênico do ambiente com ventilação natural.

No ambiente com ventilação natural, 7 fungos foram positivos quanto ao crescimento a 37°C sendo equivalentes a 30% do total (TABELA 13).

TABELA 13. Tabela dos fungos com possíveis potenciais patógenos isolados no ambiente climatizado com ventilação natural.

FUNGO	TIPO DE AMOSTRAGEM	DANOS À SAÚDE HUMANA
<i>Exophiala</i> sp.	Passiva	Espécies de <i>Exophiala</i> são conhecidas por serem capazes de causar doença sistêmica em humanos e frequentemente colonizar os pulmões de pacientes com fibrose cística (ZALAR <i>et al</i> , 2011).
<i>Mycelia sterilia</i>	Ativa	Não relatado
<i>Fusarium</i> sp.	Ativa	Espécies de <i>Fusarium</i> podem produzir uma variada gama de micotoxinas, muitos das quais têm impactos significativos sobre a saúde humana. Têm sido associado ao câncer de esôfago, câncer de fígado e defeitos do tubo neural como agente oportunista (SHEPHARD, 2012)
<i>Penicillium</i> sp.	Ativa	Citado como agente potencialmente danoso a saúde de pessoas com imunidade comprometida como no caso de HIV sendo desencadeador de alergias e outras doenças do trato respiratório (QUADROS, 2008).
<i>Aspergillus</i> sp.	Ativa	A exposição a este fungo no meio ambiente pode provocar reações alérgicas em doentes hipersensíveis ou então aspergilose invasiva e doença disseminada em doentes com graves problemas de imunodepressão. A aspergilose invasiva ocorre numa ampla variedade de cenários clínicos, é variável nas suas manifestações, e ainda está associado com uma taxa de mortalidade muito elevada (CARVALHO, 2012).

6 DISCUSSÃO

A qualidade do ar de interiores tornou-se um tema de pesquisa importante na área de saúde pública devido aos períodos prolongados que a população permanece em ambientes climatizados. Estudos com enfoque epidemiológico são imprescindíveis para prover a revisão e estabelecimento de novos métodos e normativas que assegurem a QAI e conseqüentemente o bem estar dos ocupantes de edificações.

6.1 APLICABILIDADE

De acordo com a RE nº09/03, seus critérios são destinados a “*Ambientes de interior climatizados, de uso coletivo, destinados a ocupações comuns (não especiais)*” (ANVISA, 2003). Esta aplicabilidade é muito generalista frente à variedade de ambientes existentes. A natureza das atividades bem como a concentração de pessoas precisa ser mais criteriosa para que as avaliações sejam realizadas com o rigor adequado, demonstrado o verdadeiro nível de concentração de poluentes biológicos dispersos no ar. Nossos resultados demonstram que a recuperação de conídios difere de acordo com o ambiente avaliado, ainda que ambos se enquadrem no escopo da norma. Constatou-se a necessidade do estabelecimento de critérios que considerem as atividades exercidas no ambiente avaliado, a rotatividade de pessoas e tempo de permanência. Ademais, alguns estudos relatam que a presença humana favorece a multiplicação de micro-organismos através de produtos oriundos da descamação da pele, saliva oriunda da fala, tosse e espirros além de interferir diretamente na avaliação do ambiente (BUTTNER & STETZENBACH, 1993; QUIAN *et al*, 2012).

6.2 PERIODICIDADE

A RE nº09/03 determina que a amostragem para avaliar a QAI de um ambiente deve ser semestral, entretanto não esclarece um horário de amostragem. O acúmulo de

poluentes durante o dia em ambientes interiores já foi descrito em alguns estudos (QUADROS, 2008). Visto que, a atividade humana influencia na recuperação de conídios, faz-se necessário que a norma preconize que a amostragem ocorra durante as atividades de rotina do ambiente avaliado para refletir corretamente o grau de poluição presente. A norma deveria afixar que as avaliações sejam realizadas no tempo médio que os ocupantes em um ambiente.

6.3 ESTRATÉGIA DE AMOSTRAGEM

A estratégia de amostragem deve *“Definir o número de amostras de ar interior, tomando por base a área construída climatizada dentro de uma mesma edificação e razão social”* (ANVISA, 2003). Apesar das especificações da norma, a estratégia de amostragem adotada nos ambientes avaliados foi diferenciada, onde no ambiente sem ventilação natural foram escolhidos três pontos de amostragem e no ambiente com aeração natural apenas um único ponto. Essas diferenças na estratégia foram embasadas na norma e nos resultados de trabalhos publicados na área, que comprovam a variação na concentração de fungos em vários pontos de um mesmo ambiente interior (MARTINS-DINIS *et al*, 2005).

6.3.1 Ambiente climatizado sem aeração natural

No ambiente climatizado sem aeração natural foram estabelecidos três pontos de amostragem realizados em duplicatas como demonstrado na tabela 7. Nossos resultados comprovam que há grande divergência tanto entre os pontos amostrados quanto entre as duplicatas realizadas. Isso resulta em implicações diretas na norma em dois cenários: a quantidade de amostras e metragem indicada. De acordo com a norma, nossa área de estudo poderia conter um único ponto de amostragem por ser inferior a 1.000m². Entretanto, se esse critério fosse respeitado, a concentração de UFCs do ambiente poderia ser subvalorada. Além disso, em todas as amostragens a

quantidade de UFCs recuperadas por cada duplicata foi divergente apontando outro ponto crítico da norma.

6.3.2 Ambiente climatizado com aeração natural

As discrepâncias apresentadas no ambiente sem ventilação natural também foram observadas no segundo ambiente avaliado. Por ser um ambiente teoricamente pouco contaminado estrelecemos apenas um ponto de coleta, como definido pela norma, mas realizados a amostragem em triplicata. Esta medida foi adotada com intuito de comprovar se apenas uma coleta seria indicada para avaliar um ambiente interno. A comparação das placas demonstrou uma diferença significativa entre os pontos confirmando a necessidade de, pelo menos, duplicadas durante as avaliações.

6.4 MÉTODO DE AMOSTRAGEM

A norma preconiza que o método de amostragem deve ser realizado por “*Amostrador de ar por impactação com acelerador linear*” (ANVISA, 2003). Apesar de a amostragem Ativa ser preconizada pela norma, metodologias Passivas e Diretas foram realizadas por serem métodos alternativos para avaliar a QAI. Nossos resultados corroboram com o esperado onde no ambiente avaliado sem aeração natural a concentração de conídios fúngicos foi mais elevada totalizando 924 UFCs. O ambiente com ventilação natural também correspondeu com o esperado demonstrando uma baixa concentração de conídios totalizando 137 UFCs. A comparação entre os ambientes evidenciou a importância da renovação do ar em ambientes interiores para diluir a concentração de poluentes biológicos.

6.4.1 Amostragem Passiva

A amostragem Passiva foi escolhida por ser uma metodologia simples e de baixo custo, amplamente utilizada para avaliar ambientes interiores inclusive em

estudos posteriores à publicação da norma (FLORES, 2010). Dentre os métodos utilizados, esta amostragem deteve números mais modestos, recuperando apenas 5,6% das UFCs presentes no ambiente sem aeração natural e 10% das UFCs do ambiente com aeração natural. Além da baixa concentração recuperada, esta metodologia não foi capaz de diferenciar um ambiente muito contaminado de um ambiente pouco contaminado podendo camuflar o grau de poluição presente no ambiente.

6.4.2 Amostragem Ativa

A amostragem Ativa foi mais eficiente na recuperação de conídios presentes no ar de ambos ambientes selecionados para o estudo. Por este método foram recuperados 87% das UFCs presentes no ambiente climatizado sem aeração natural e no ambiente sem ventilação natural 90%. A eficiência na recuperação de conídios mostrou-se independente da concentração total dispersa no ambiente, entretanto, não possui alta reprodutibilidade. No ambiente climatizado sem aeração natural, por exemplo, duplicatas realizadas revelaram uma discrepância considerável onde uma das placas totalizou 52 UFCs e outra 181 UFCs. Como essas duplicatas foram realizadas em sequencia no mesmo dia, horário e ponto de coleta, pôde-se confirmar a falta de reprodutibilidade do método. O mesmo padrão foi observado no ambiente com ventilação natural. Apesar da eficiência evidenciada por este método, existe uma questão preocupante: a ausência de métodos apropriados para validar a capacidade deste tipo de amostragem. Faz-se necessário avaliar a confiabilidade dos resultados gerados por estes aparelhos com intuito de assegurar que seus resultados demonstrem corretamente a concentração de UFCs dispersa no ar.

6.4.3 Amostragem Direta

A amostragem Direta foi realizada a fim de comparar se os conídios que estariam sendo possivelmente dispersos pelo sistema de climatização seriam os mesmos recuperados pelas metodologias Passiva e Ativa. Esta metodologia evidenciou que a microbiota recuperada pela amostragem Ativa e Passiva não reflete toda a diversidade

fúngica que está presente no ambiente. Dentre as leveduras isoladas no ambiente sem ventilação natural, 70% foram coletadas por esta metodologia. Apesar das identificações resultarem em apenas 5 espécies diferentes, a quantidade de UFCs de leveduras recuperadas foi muito mais elevada. Este resultado é alarmante frente às inúmeras leveduras descritas na literatura como altamente prejudiciais a saúde humana que podem estar sendo dispersas pelos sistemas de climatização (LOSS *et al*, 2011; SILVA *et al*, 2011; RODRIGUEZ & PINILLA, 2012). Nossos resultados sugerem que a combinação de metodologias para avaliar a poluição biológica de um ambiente seria o mais indicado.

6.5 LIMITE DE UFCs

Com relação às concentrações de poluentes biológicos a RE preconiza que “o Valor Máximo Recomendável - VMR, para contaminação microbiológica deve ser ≤ 750 UFC/m³ de fungos no ambiente” (ANVISA, 2003). Este parece ser um limite de grande tolerância visto que a avaliação é realizada com apenas um tipo de micro-organismo. O VRM estabelecido deveria considerar que a presença de fungos, somada a outros poluentes biológicos possivelmente dispersos no ar, como bactérias, algas e ácaros, podem facilmente tornar um ambiente insalubre (DEGOBBI & GAMBALE, 2008). Outro ponto a ser considerado são os produtos liberados pelo metabolismo desses micro-organismos podem ocasionar. As micotoxinas são produtos secundários do metabolismo dos fungos que podem acarretar em uma variedade de doenças e síndromes sendo inclusive relacionadas à produção de tumores (PEREIRA E SANTOS, 2011).

6.6 TEMPO DE AMOSTRAGEM

De acordo com a RE “Em áreas altamente contaminadas, pode ser recomendável uma amostragem com tempo e volume menores” (ANVISA, 2003).

Entretanto a sobreposição de colônias pode dificultar a capacidade de distinguir a diferença e quantidade de colônias obtidas (BARTLETT *et al*, 2012). O tempo de amostragem preconizado pela RE é de 10 minutos. Entretanto, mesmo no ambiente com aeração natural, onde a concentração fúngica se enquadra dentro dos VRMs estabelecidos, a sobreposição foi observada. Em 1993, os estudos de Buttner & Steztenbach, já salientavam que o tempo de amostragem deve ser reduzido com intuito de minimizar a sobreposição de colônias. Este problema interfere diretamente na contagem quantificação das UFCs podendo contribuir para análises errôneas.

6.7 CULTIVO DOS ISOLADOS

É recomendado pela norma que o “*tempo mínimo de incubação de 7 dias a 25°C., permitindo o total crescimento dos fungos*” (ANVISA, 2003). Nossos resultados e a literatura mostram que fungos possuem diferenças de crescimento diferentes. Tal característica é utilizada na identificação de fungos e encontrada em um manual da própria ANVISA (Manual de detecção de fungos de importância médica, 2004). Fixar o crescimento dos fungos durante o período de incubação por 7 dias favorece a sobreposição de colônias bem como proporciona a fungos de crescimento rápido a oportunidade predominar toda a superfície da placa. Em nossos experimentos, diminuimos o tempo de incubação para 4 dias e ainda assim nos deparamos com este problema evidenciando mais um quesito a ser revisto na norma.

6.8 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS

Apesar da inexistência de critérios estabelecidos para identificação na norma, todos os isolados fúngicos obtidos nos ambientes selecionados foram submetidos à identificação. Leveduras e filamentosos, devido a sua morfologia distinta, foram identificados por métodos diferentes. Em filamentosos, a taxonomia clássica por visualização microscópica foi realizada por ser a mais recorrente na literatura. Para

leveduras, sistemas comerciais de identificação foram utilizados. A experiência adquirida neste aspecto, durante as identificações, evidenciou a importância de pessoas qualificadas para exercer esta tarefa no decorrer das avaliações da QAI. É imprescindível que os estabelecimentos criem um plano de ação, que envolva profissionais capacitados, devido à complexidade dos gêneros fúngicos anemófilos presentes em ambientes interiores.

6.8.1 Ambiente sem ventilação natural

No ambiente sem ventilação natural a diversidade morfológica alcançada foi de 45 filamentosos e 9 leveduras. Os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhizopus*, foram os mais abundantes e são frequentemente encontrados em ambientes interiores brasileiros. Outros dois gêneros isolados, *Mucor* e *Fusarium*, também são amplamente citados como contaminantes interiores. Estudos realizados em ambiente hospitalar no Rio Grande do Sul evidenciam os mesmos gêneros (LOBATO *et al*, 2009). Este mesmo estudo conclui que existe uma sazonalidade de fungos anemófilos presente nos interiores de acordo com as estações do ano. Esta é uma possibilidade para não encontrarmos os gêneros *Cladosporium* e *Alternaria* frequentemente citados como contaminantes interiores.

Outros gêneros isolados neste ambiente foram: *Phialophora*, *Trichoderma*, *Scytalidium*, *Exophiala*, um representante da Família *Dematiaceae* e o fungo *Hormonema dematioides*. Quadros (2008) ao avaliar a QAI em ambientes hospitalares de Santa Catarina descreve *Trichoderma* como o quarto gênero mais abundante. Este mesmo gênero foi encontrado em avaliações da QAI em uma Unidade de Saúde na Cidade de Francisco Beltrão (PR) e no interior de Bibliotecas, em Sorocaba (SP) (FLORES *et al*, 2010; PEÇANHA, 2011). A Família *Dematiaceae* é citada como contaminante de UTIs do Serviço Público de Saúde em Teresina (PI) (MOBIM & SALMITO, 2006). Os gêneros *Phialophora*, *Exophiala* e a espécie *Hormonema dematioides* não foram isolados em nenhum outro estudo brasileiro sobre a QAI na bibliográfica consultada. Devido à ausência de estudos na área, não foi possível concluir se estes fungos eram contaminantes exclusivos deste ambiente, se fazem

parte da microbiota anemófila local ou se sua presença está relacionada à sazonalidade.

Fungos que não formam conídios foram encontrados em quantidades significativas neste ambiente e sendo denominados como *Mycelia sterilia*. Este termo atualmente está em desuso, pois com o surgimento de ferramentas moleculares é possível concluir a identificação em nível espécie, mesmo sem morfologia característica. Entretanto, como não utilizamos esta ferramenta, o termo foi mantido. Com intuito de concluir as identificações, nestes casos, mais de uma preparação de microcultivo foi realizada, com tempos de incubação diferenciados. Apesar das tentativas, ausência de conídios permanecia sendo visualizada, o que sugere a necessidade de testes moleculares complementares. Este obstáculo é comumente enfrentado em pesquisas para QAI, como nas avaliações no interior de aeroportos e unidades de saúde (SLVEIRA, 2011; FLORES *et al*, 2010). Fungos desconhecidos também foram recuperados pelo ambiente também necessitando de testes adicionais por biologia molecular com intuito de fechar um perfil taxonômico.

Dentre as nove leveduras identificadas estão as espécies: *Rhodotorula sp.*, *Rhodotorula muscilaginosa*, *Rhodotorula minuta*, *Cryptococcus sp.*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus uniguttulatus*, *Cryptococcus laurentii*, *Candida parapsilosis* e uma levedura não identificada. As leveduras foram identificadas por dois sistemas comerciais, pois os perfis biológicos desses equipamentos são voltados para área clínica. Sendo assim, quando não foi possível alcançar um perfil equivalente a nenhuma espécie catalogada por um equipamento o sistema seguinte foi utilizado. Em uma das cepas, nenhum dos dois sistemas foi capaz de concluir a identificação necessitando de testes moleculares posteriores. Todos os gêneros de leveduras encontradas neste ambiente são comumente relacionados à contaminação de interiores (MARTINS-DINIS *et al*, 2005; LOBATO *et al*, 2009; FLORES *et al*, 2010).

6.8.2 Ambiente com ventilação natural

Neste ambiente, os fungos isolados corroboram com os descritos na literatura e com o primeiro ambiente avaliado: *Penicillium sp.*, *Aspergillus* e *Fusarium sp.*, *Mycelia*

sterilia e fungos desconhecidos. Além destes, foram isolados uma cepa do gênero *Paecilomyces* sp. e uma levedura do gênero *Exophiala* sp. Em nenhum dos estudos consultados esses dois fungos foram citados como contaminante de ambientes interiores.

6.9 POSSÍVEIS PATÓGENOS HUMANOS

O último tópico avaliado pertencente a RE nº 09/03 declara que “*É inaceitável a presença de fungos patogênicos e toxigênicos*” (ANVISA, 2003). Para detectar a possível patogenicidade dos isolados, todas as cepas foram incubadas a 37°C. Apesar desta não ser a única característica necessária para conferir patogenicidade a um micro-organismo, é um fator limitante para a sua multiplicação e desenvolvimento em humanos. Contudo, vale lembrar que cepas negativas quanto ao crescimento a 37°C podem afetar o bem estar de pessoas susceptíveis a alergias dependendo da concentração fúngica presente.

Alguns fungos anemófilos podem produzir micotoxinas (tóxicos provenientes do seu metabolismo) no ambiente interior. Estas micotoxinas são produzidas principalmente por espécies que pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, que são frequentemente isolados em análises de bioaerossóis de ambiente interior. São tóxicas para humanos e animais, quando ingeridas em pequenas quantidades. Também são classificadas como carcinogênicas, mutagênicas, teratogênicas, citotóxicas, neurotóxicas, nefrotóxicas, estrogênicas e imunossupressoras (SOARES *et al*, 2013). Apesar do amplo conhecimento difundido desses componentes na saúde, existe uma carência de estudos que avaliem sua influência e exposição aos ocupantes de ambientes interiores.

6.9.1 Ambiente sem ventilação natural

Dentre os 54 fungos isolados neste ambiente, 42% foram positivos nos crescimentos a 37°C. (*Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., Família *Dematiaceae*;

Scytalidium sp., *Mucor* sp., *Rhizopus* sp., *Rhodotorula* sp., *Rhodotorula minuta*, *Cryptococcus laurentii*, *Candida parapsilosis*, *Mycelia sterilia* e fungos desconhecidos). A maioria desses fungos é descritos como oportunistas causadores de micoses, infecções e até óbito no caso de pessoas com sistema imunológico debilitado (TABELA 11). Em nossos resultados, 31% dos fungos dos fungos isolados são *Mycelia sterilia* ou desconhecidos. Em termos de patogenicidade isto é muito preocupante, visto que uma parcela significativa de fungos presente em ambientes interiores não é identificada, fator que impossibilita a extensão da contaminação presente. Alguns deles foram positivos a 37°C o que potencializa a problemática, evidenciando a importância de mais estudos na área.

6.9.2 Ambiente com ventilação natural

Mesmo no ambiente com ventilação natural, tanto a quantidade de fungos positivos quanto ao crescimento a 37°C foi considerável, sendo equivalentes a 30% do total. Este percentual corresponde aos gêneros *Exophiala* sp., *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp. e fungos *Mycelia sterilia*. Sendo assim, corroboram com os mesmos obtidos no primeiro ambiente avaliado bem como com a bibliografia consultada.

6.10 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ANVISA tem como missão:

Promover e proteger a saúde da população e intervir nos riscos decorrentes da produção e do uso de produtos e serviços sujeitos à vigilância sanitária, em ação coordenada com os estados, os municípios e o Distrito Federal, de acordo com os princípios do Sistema Único de Saúde, para a melhoria da qualidade de vida da população brasileira.

Apesar do grande papel desempenhado por esta agência, que visa estabelecer critérios de acordo com a necessidade pública, suas diretrizes são embasadas nos estudos disponíveis na literatura de acordo com a temática em questão. Entretanto, a

despeito de poluentes biológicos em ambientes interiores esta tarefa torna-se potencialmente complicada no Brasil, devido à carência de estudos desenvolvidos nesta área.

A microbiota que compõe o ambiente interior, em regra, é proveniente o ambiente externo. E embora a população anemófila de interiores possua certa similaridade como demonstrado, sua composição sofrerá variações decorrentes da região demográfica, clima e grau de urbanização no qual a edificação avaliada esta alocada. Devido a grande extensão territorial e variação climática do nosso país os critérios para tais avaliações precisam considerar essas diferenças. Faz-se necessário a realização de estudos que elucidem as diferenças entre as naturezas das edificações avaliadas nos diferentes climas e regiões. Esta necessidade fica evidencia quando tentamos enquadrar nossa realidade com parâmetros estabelecimento em outros países. Em Portugal, por exemplo, a Agência Portuguesa do Ambiente possui um guia técnico para monitorar a QAI. Este guia cita como principais contaminantes biológicos do interior os gêneros *Alternaria* e *Cladosporium*. Apesar de relatados em alguns estudos brasileiros estes gêneros não estão no topo da lista de contaminantes frequentes. Este pequeno detalhe expõe que o embasamento para critérios contidos em normas brasileiras precisam ser sustentados por estudos realizados no nosso país. Apesar de legislações estrangeiras não se enquadrarem perfeitamente na realidade de nossos ambientes, a divergência em um dos parâmetros citados por esta norma foi alarmante. Os números de tolerância com relação à concentração fúngica presente no ar são muito mais rígidos. Pela Agência Portuguesa do Ambiente, são tolerados apenas 150 UFCs/m³ no interior de um ambiente, pela Conferência Americana de Higienistas Industriais e Governamentais, 250 UFCs/m³, pelo Conselho Nacional de Pesquisas Canadense 100 UFCs/m³ apenas para fungos anemófilos, comprovando novamente que nossos limites são de grande tolerância (CALDEIRA *et al*, 2012).

Dentro de todo cenário apresentado, fica evidenciado a necessidade da criação de normativas que proporcionem confiabilidade nas medições de bioaerossóis em interiores. Esta necessidade vai de encontro à missão do INMETRO que visa “verificar a observância das normas técnicas e legais, no que se refere às unidades de medida, métodos de medição, medidas materializadas, instrumentos de medição e produtos pré-

medidos”. Além disso, dentre suas competências esta “implantação e manutenção de uma cadeia de rastreabilidade dos padrões das unidades de medida no País, de forma a torná-las harmônicas internamente e compatíveis no plano internacional, visando, em nível primário, à sua aceitação universal e, em nível secundário, à sua utilização como suporte ao setor produtivo, com vistas à qualidade de bens e serviços”. Por estas capacidades este trabalho foi desenvolvido como base para estudos futuros visando fornecer dados que possam aprimorar as legislações brasileiras atuais e conseqüentemente assegurar a QAI.

As missões da ANVISA e INMETRO têm como prioridade a confiabilidade e bem estar da população brasileira. No entanto, existem poucas informações disponíveis sobre os tipos de poluentes e concentrações existentes em ambientes interiores que esclareçam a importância da QAI para a população. As principais estratégias que envolvem a QAI são legislação, códigos e normas, que não alcançam o público em geral. O conhecimento da população com relação à má qualidade do ar é restrita aos poluentes atmosféricos. O impacto da QAI na saúde dos ocupantes de um ambiente interior é muito alto devido ao tempo de permanência prolongado nestes ambientes. Existe uma série de doenças respiratórias crônicas que podem ser potencializadas pela contaminação biológica no interior dos ambientes. A asma, a rinite alérgica e a doença pulmonar obstrutiva crônica são citadas como as mais comuns. De acordo com o Ministério da Saúde (2010), essas doenças representam um dos maiores problemas de saúde em nível mundial. Só no Brasil, 25% da população sofre de rinite, a doença de maior prevalência entre as enfermidades respiratórias crônicas. Este quadro comprova a importância do esclarecimento da população com relação à QAI. Munidos de informação, será possível cobrar dos estabelecimentos públicos e privados, planos de manutenção dos condicionadores de ar, avaliações de contrações de poluentes, etc., assim como a prevenção do acúmulo de poluentes em suas próprias residências.

7 CONCLUSÕES

Nossos resultados apontam que vários parâmetros presentes na única legislação vigente no país, referente à avaliação da QAI, precisam ser revistos e aprimorados. Se aferirmos criteriosamente ambientes interiores de acordo com as indicações contidas na NT-001 para Bioaerossóis, os resultados desta avaliação podem não refletir a real concentração de poluentes biológicos ocasionando uma série de riscos aos seus ocupantes. De acordo com nossas avaliações realizadas em dois ambientes distintos, um ambiente teoricamente muito contaminado sem ventilação natural e um ambiente teoricamente pouco contaminado com ventilação natural, tornou-se evidente a necessidade de melhorias em vários critérios como a aplicabilidade da norma, periodicidade, tempo de cultivo e estratégia de amostragem.

Sendo assim, concluímos que vários parâmetros para poluentes biológicos, contidos na RE nº 09/03 precisam ser reavaliados pela ANVISA, com intuito de estabelecer critérios de avaliação mais rigorosos que assegurem a QAI. Adicionalmente, faz-se necessário o estabelecimento de critérios bioanalíticos que possam validar a metodologia utilizada atualmente possibilitando a comprovação da eficiência do método escolhido. Além disso, estudos mais refinados precisam ser realizados para avaliar a concentração de poluentes biológicos em ambientes interiores, analisando os diversos fatores que influenciam na QAI. Por fim, a importância da QAI e os impactos na saúde dos ocupantes de ambientes climatizados devem ser mais bem esclarecidos à população brasileira.

8 RECOMENDAÇÕES

Tendo em vista a discussão apresentada, na qual foram correlacionados os resultados obtidos e a legislação vigente, conclui-se que as seguintes recomendações são relevantes para elaboração de futura normativa:

- **Aplicabilidade** – refinamento no escopo de abrangência da norma, através da elaboração de uma classificação dos ambientes climatizados, considerando natureza da atividade desenvolvida e quantidade de pessoas da edificação em questão.
- **Periodicidade** – Detalhar a importância das amostragens serem realizadas durante o tempo médio de permanência dos ocupantes de uma edificação visto que os poluentes se acumulam durante o dia e atividade humana interfere consideravelmente na recuperação de esporos.
- **Estratégia de amostragem** – A quantidade de amostras deve ser realizada a cada 500m² (no mínimo) devido a heterogeneidade de dispersão de esporos em um mesmo ambiente. Além disso, cada ponto de amostragem deve ser realizado em duplicatas (no mínimo) devido à falta de repetitividade do método de amostragem.
- **Método de Amostragem** – Validação dos métodos ativos de amostragem, com intuito de assegurar que os resultados demonstrem corretamente a concentração de UFCs dispersa no interior dos ambientes.
- **Limite de UFCs** – Visto que a contagem é de UFCs totais, incluindo bactérias, o limite deve ser mais rigoroso. Com base em padrões internacionais, 350 UFCs/m³ seria um limite mais condizente com a realidade amostrada, considerando estudos de outros autores brasileiros.
- **Tempo de amostragem** – Com a realização de duplicatas o tempo de amostragem deveria se afixado em apenas 5 minutos com o intuito de diminuir a sobreposição de colônias. Ressaltando ainda que, em ambientes supostamente muito contaminados, a repetibilidade de amostragem deveria der acrescida.
- **Cultivo dos isolados** – O prazo de 7 dias deveria ser reduzido para 4 dias para contagem das UFCs no intuito de desfavorecer a perda colônias encobertas por fungos de crescimento rápido. Entretanto, vale ressaltar que a observação deveria ser estendida a fim de detectar o possível aparecimento de culturas de crescimento lento, sendo somadas as contagens já realizadas.

- **Presença de possíveis patógenos humanos** – Inclusão de critérios de identificação dos isolados, patogênicos ou não, a fim de elucidar o risco a saúde dos ocupantes, principalmente devido aos produtos metabólicos oriundos dos microrganismos.
- **Divulgação de informações sobre a QAI** – Elaboração de campanhas que divulguem os riscos sobre os poluentes interiores ao público em geral.

9 BIBLIOGRAFIA

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 15848:2010**. Disponível em: <http://www.abntcatalogo.com.br/norma.aspx?ID=59497>. Acessado em 26/09/2012.

ALMEIDA, S. R. **Apostila de Micologia Clínica**. Faculdade Ciências Farmacêuticas Universidade de São Paulo. Disponível em: <http://www.portalbrasil.net/downloads/micoses.pdf>. Acessado em 28/09/2012.

BARTLET, K. LEE, K. S. H. STEPHENS, G. BLACK, W. BRAUER, M. COPES, R. **Evaluating Indoor Air Quality: Test Standards for Bioaerosols**. School of Occupational and Environmental Hygiene. University of British Columbia. 2002.

BASTO, E. D. **Apostila de Qualidade do Ar interno**. Engenharia de Segurança do Trabalho. Itajaí. 2007.

BATISTA, C. A. T. Dissertação: **Poluição do Ar de Interiores: Uma Avaliação de Casos Relacionados à Climatização Artificial**. Faculdade de Engenharia - UFJF. Juiz de Fora. 2008.

BERNARDES, A. C. C. **Análise dos Métodos de Auditoria a Qualidade do Ar Interior – RSECE**. Universidade de Aveiro. Portugal, 2009.

BIOMERIEUX. **VITEK® 2 Compact**. Disponível em: http://www.biomerieux.com.br/servlet/srt/bio/brazil/dynPage?doc=BRZ_IND_BBC_PRD_G_PRD_NDY_4. Acessado em 10/04/2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Deteção e Identificação de Fungos de Importância Médica**. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/microbiologia/mod_7_2004.pdf. Acessado em 01/10/2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução n. 176 de 24 outubro de 2000**.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução n. 9 de 16 de janeiro de 2003**.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução n. 899 de 29 de maio de 2003**.

BRASINDOOR. Sociedade Brasileira de Meio Ambiente e Controle de Qualidade do Ar de Interiores. **Histórico, 2012**. Disponível em: <http://www.brasindoor.com.br/historico.php>. Acessado em 05/03/2014.

BRICKUS, L. S. R. NETO, F. R. A. **A Qualidade do Ar de Interiores e a Química**. LADETEC - Instituto de Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro. 1999.

BRIMBLECOME, P. **The Big Smoke**. 185 pp. Methuen, London, 1987.

BROOKS, B.O. DAVIS, W.F. **Understanding Indoor Air**. Air Infiltration and Ventilation Center. 1992, Disponível em <http://www.aivc.org/resource/understanding-indoor-air-quality>. Acessado em: 05/03/2014

BUTTNER, M. P. STETZENBACH, L. D. **Monitoring Airborne Fungal Spores in an Experimental Indoor Environment To Evaluate Sampling Methods and the Effects of Human Activity on Air Sampling**. Applied and Environmental Microbiology, J, p. 219-226. 1993.

CALDEIRA, C. PRESGRAVE, O. A. F. MORAES, A. M. L.; DELGADO, I. F. **Avaliação microbiológica da qualidade do ar de interiores: aspectos metodológicos e legais**. Universitas: Ciências da Saúde, v. 10, n. 1, p. 51-60. Brasília, 2012.

CARRER, P. KOTZIAS, D. RAMECKERS, E.M.A.L. SEPPANEN, O. BRONSWIJK, J.E.M.H. VIEIGI, G. FRANCHI, M. **Towards Healthy Air in Dwellings in Europe – The THADE Report**. 97 p. 2002.

CARVALHO, L. I. C. **Aspergillus e Aspergilose – desafios no combate da doença**. Universidade Fernando Pessoa. Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas. Porto, 2013

CHAO, H.J. MILTON, D.K. SCHWARTZ, J. BURGE, H. A. **Dustborne fungi in large office buildings**. Mycopathologia. 154: 93-106. 2011.

COMTOIS, P. MARCOUX, N. **Na indoor air model**. Aerobiologia, 15: 115-120. 1999.

CORTES, L. A. A. **Agentes Biológicos em Sistemas de Ar Condicionado**. Trabalho escrito para apresentação no XII Encontro Anual de Iniciação Científica. 2003.

CUNHA, M. M.; SANTOS, L. P.; DORNELAS-RIBEIRO, M.; VERMELHO, A. B.; ROZENTAL, S. **Identificação, suscetibilidade aos antifúngicos e microscopia eletrônica de varredura de uma estirpe queratinolítica de *Rhodotorula mucilaginosa*: um agente causador principal de onicomiose**. Immunol Med Microbiol, 55 (3): 396-403. 2009.

DEGOBBI, C. M. GAMBALE, W. **Síndrome dos Edifícios Doentes: Aspectos Microbiológicos, Qualidade do Ar em Ambientes Interiores e Legislação Brasileira**. Encarte Técnico da Revista Abrava, Parte 1, 2, 3 e 4. Ed. 260, 261, 262, 263. 2008.

EVANGELISTA, A. J. J. DINIZ, M. R. A. MEDEIROS, A. A. LIMA-NETO, R G. OLIVEIRA, P. C. Monografia. **Isolamento de fungos em equipamentos de ar condicionado instalados em biblioteca das Faculdades Integradas de Patos**. Universidade de Patos, FIP, Paraíba Brasil. 2012.

FLORES, L. H.; ONOFRE, S. B. **Determinação da presença de fungos anemófilos e Leveduras em unidade de saúde da cidade de Francisco Beltrão – PR**. SaBios: Revista de Saúde e Biologia, v.5, n.2, p.22-26. 2010.

FONSECA, F. L.; GUIMARÃES, A. J.; KMETZSCH, L.; DUTRA, FABIANNO, F. ; SILVA, F. D.; TABORDA, C. P.; ARAUJO, G. S.; FRASES, S.; STAATS, C. C.; BOZZA, M. T.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H.; NIMRICHTER, L.; CASADEVALL, A.; RODRIGUES, M. L.; **Binding of the wheat germ lectin to *Cryptococcus neoformans* chito oligomers affects multiple mechanisms required for fungal pathogenesis**. Fungal Genetics and Biology, v. 1, p. 1, 2013.

FRÉALLE, E. LESTREZ, C. SKIERLAK, T. MELBOUCY, D. GUERY, B. DURAND-JOLY. I. DELHAES, L. LOUKILI, N. **Fungal aero-decontamination efficacy of mobile air-treatment systems**. *Medical Mycology*, 49: 825–833. 2011.

GAUER, M. A. SZYMAANSKI, M. S. E. PIAN, L. B. SHIRMER, W. N. **A Poluição do ar em Ambientes Internos**. Resumo da VI Semana de Estudos de engenharia Ambiental. UNICENTRO. 2008.

GRAPHPAD PRISM. **Programa estatístico**. Disponível em: <http://www.graphpad.com/scientific-software>. Acessado em: 10/04/2014.

GUARRO, J. GENE´, J. STCHIGEL, A. M. **Developments in Fungal Taxonomy**. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 12, No. 3, p. 454–500. 1999.

HIGASKINO, C. E. K. FIGEL, I. C. YAMADA, M. P. A. **Dossiê Técnico: Qualidade Microbiológica do Ar de Ambientes Condicionados**. Instituto de Tecnologia do Paraná. 2007.

IBRAHIM, A. S.; SPELLBERG, B. WALSH, T. J. KONTOYIANNIS, D. P. **Pathogenesis of Mucormycosis**. *Clinical Infectious Diseases*, 54(S1):S16–22. 2012.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. **Qualidade do Ar em Estabelecimentos de Uso Público e Coletivo**. 2014. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/consumidor/produtos/qualidadedoAr.asp>. Acesso em 12 fev. de 2014.

KHAN, A. A. H. S. KARUPPAYIL, M. **Fungal pollution of indoor environments and its management**. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 19, 405–426. 2012.

LOBATO, R. C. Dissertação. **Leveduras e organismos leveduriformes isolados do sedimento das marismas do estuário da Lagoa dos Patos – RS**. Universidade Federal do Rio Grande, FURG. 2011.

LOBATO, R. C. VARGAS, V. S. SILVEIRA, E. S. **Sazonalidade e prevalência de fungos anemófilos em ambiente hospitalar no sul do Rio Grande do Sul, Brasil**. *Revista Farmacêutica de Ciência Médica de Sorocaba*. V. 11,n. 2,p. 21 - 28, 2009.

LOSS, S. H. ANTONIO, A. C. P. ROEHRIG, C. CASTRO, P. S. MACCARI, J. G. **Meningite e endocardite infecciosa causada por *Rhodotorula mucilaginosa* em paciente imunocompetente**. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*; 23(4):507-509. 2011.

MARTINS-DINIZ, J. N. SILVA, R. A. M. MIRANDA, E. T. MENDES-GIANNINI, M. J. S. **Monitoramento de Fungos Anemófilos e de Leveduras em Unidade Hospitalar**. *Revista Saúde Pública*, vol.39 n.3.. 2005.

MAYAN, O. **Qualidade do Ar Interior: Enquadramento e Problemática**. Edições Profissionais Sociedade Unipessoal. 2012.

MOBIN, M. SALMITO, M. A. **Microbiota fúngica dos condicionadores de ar nas unidades de terapia intensiva de Teresina, PI**. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39(6):556-555. 2006.

MORAES, P. M. **Qualidade do ar interno com ênfase na contração de aerodispersóides nos edifícios**. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. São Paulo- SP. 2006.

NADAI, B. L. Monografia: **A Importância da Ventilação do Desenvolvimento de Fungos no Ambiente**. União Dinâmica De Faculdades Cataratas. Foz do Iguaçu – PR. 2008.

NAPOLI, C. MARCOTRIGIANO, V. MONTAGNA, M. T. **Air sampling procedures to evaluate microbial contamination: a comparison between active and passive methods in operating theatres**. Biomedcentral - BCM. 12: 594. 2012.

NUNES, Z. G. MARTINS, A. S. ALTOE, A. L. F. NISHIKAWA, M. M. LEITE, M. O. AGUIAR, P. F. FRACALANZZA, S. E. L. **Indoor air microbiological evaluation of offices, hospitals, industries and shopping centers**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Vol. 100(4): 351-357, Rio de Janeiro, 2005.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS. **Critérios de Qualidade do Ar**. Genebra, Suíça, 1999.

PECCIA, J. HERNANDEZ, M. **Incorporating polymerase chain reaction-based identification, population characterization, and quantification of microorganisms into aerosol science: A review**. ELSELVIER, Atmospheric Environment 40, 3941–3961p. 2006.

PEREIRA, A. P. V. Dissertação. **Identificação Molecular de Candidoses invasivas no**

PEREIRA, K. C. P. SANTOS, C. F. **Micotoxinas e seu potencial carcinogênico. Ensaios e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, vol. 15, núm. 4, pp. 147-165. 2011,

PEREIRA, R.G.; REIS, D. AMBRÓSIO JÚNIOR, G.N. RADDI, M.S.G.; PEDIGONE, M.A.M.; MARTINS, C.H.G. **Bioaerossóis bacterianos em um hospital**. Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences. v. 26, n. 1, p. 77-81, 2005.

PONCE-CABALLERO, C. GAMBOA-MARRUFO, M. LÓPEZ-PACHECO, M. CERÓN-PALMA, I. **Métodos Convencionais vs. Métodos Moleculares. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa** Centro Hospitalar Cova da Beira, E.P.E., 2010.

PORTUGAL. Agência Portuguesa do Ambiente. **Qualidade do Ar em Espaços Interiores – Guia Técnico**. 2009.

PRECIOSO, J. LOPEZ, M.J. CALHEIROS, J. M. MACEDO, M. ARIZA, C. SANCHEZ, F. SCHIAFFI, A. FERNÁNDEZ, E. NEBOT, M. **Poluição do ar interior provocada pelo fumo do cigarro em locais públicos de Portugal**. Ver. Saúde Pública; 41(5):808-13. 2007.

PREFEITURA DO RIO DE JANEIRO. **Decreto Municipal nº 22496, de 18 de dezembro de 2002**. Disponível em http://www.ar-limpo.com.br/site/index.php?option=com_content&view=article&id=81:prefeitura-do-rio-de-janeiro-decreto-municipal-no-22496-de-18-de-dezembro-de-2002&catid=28. Acessado em 15/10/2012.

QUADROS, M. E. Dissertação: **Qualidade do Ar em Ambientes Internos e Hospitalares: Parâmetros Físico-Químicos e Microbiológicos**. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC. 2008.

- QUADROS, M. E. LISBOA, H. M. OLIVEIRA, V. L. SHIMER, W. N. **Qualidade do Ar em Ambientes Internos Hospitalares: Estudo de caso e análise crítica dos padrões atuais.** Artigo técnico, Eng. Sanit Ambient, v.13, n.3, 431-438. 2009a.
- QUADROS, M. E. LISBOA, H. M. OLIVEIRA, V. L. SHIMER, W. N. **Qualidade do Ar Interno em Ambientes Hospitalares.** Revista de tecnologia. Fortaleza, v 30, n. 1, p. 38-52. 2009b.
- QUADROS, M. E. LISBOA, H. M. **Qualidade do ar Interno.** Controle da Poluição atmosférica. Capítulo IX. 2010.
- QUIAN, J. HOSPODSKY, D. YAMAMOTO, N. NAZAROFF, W. W. PECCIA, J. **Size-resolved emission rates of airborne bacteria and fungi in an occupied classroom.** Indoor Air, 22: 339–351. 2012.
- QUINTAL-FRANCO, C. GIÁCOMAN-VALLEJOS, G. LORÍA-ARCILA, J. H. **Seasonal variation of airborne fungal propagules indoor and outdoor of domestic environments in Mérida, Mexico.** *Atmósfera* 26(3), 369-377. 2013.
- ROBLES, M. G. AUSEJO, F. U. CAVERO, J. C. **Manual de Procedimientos y Técnicas de Laboratorio para la Identificación de los Principales Hongos Oportunistas Causantes de Micosis Humanas.** Instituto Nacional de Salud. Lima, 2007.
- RODRÍGUEZ, D. A. PINILLA, A.P. **Infección asociada a catéter central por *Cryptococcus laurentii* en niño críticamente enfermo: a propósito de un caso y revisión del tema.** *Asociación Colombiana de Infectología.* 16(1): 72-74, 2012.
- SANKAPAL S. R.; ABRAHAM J. **Antibody response in central nervous system to the antigenic preparation of *Mucor* and *Aspergillus*.** *Jundishapur Journal of Microbiology*, 4(4): 223-228. 2011.
- SHEPHARD, G. S. **Fusarium Mycotoxins And Human Health.** *Plant Breeding and Seed Science*, vl. 64. 2011.
- SHIRMER, W. N. PIAN, L. B. SZYMAANSKI, M. S. E. GAUER, M. A. Revisão: **A poluição do Ar em Ambientes Internos e a Síndrome dos Edifícios Doentes.** Departamento do Engenharia ambiental, Universidade Estadual do Centro-oeste, PR. 2008.
- SILVA, S., NEGRI, M, HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; DAVID W.WILLIAMS, D. W. AZEREDO, J. ***Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance.** *Microbiology Reviews.* 36 (2012) 288–305. 2011.
- SILVEIRA, M. G. TESE: **Avaliação da Qualidade do Ar em um Grande Aeroporto na Cidade Do Rio De Janeiro.** Rio de Janeiro, FIOCRUZ, ENSP, CESTEJ. 2001.
- SINGH, J. **Toxic Moulds and Indoor Air Quality.** *Regional Studies and Policy, Indoor Built Environ.* 14;3-4:229–234. 2005.
- SOARES, C.; ABRUNHOSA, L.; VENÂNCIO, A. **Fungos produtores de micotoxinas: impacto na segurança alimentar.** Portuguese Society for Microbiology Magazine. Disponível em: <http://magazinespm.wordpress.com/2013/07/30/fungos-produtores-de-micotoxinas>. Acessado em: 04/04/2014.

STELING, T. D. COLLETT, C. RUMEL, D. **A epidemiologia dos “edifícios doentes”**. Revista Saúde Pública. 25: 56-63. São Paulo. 1991.

TEIXEIRA, D. B. BRIONÍZIO, J. D. PEREIRA, L. J. R. MAINIER, F. B. **Síndrome dos Edifícios Doentes em Recintos com Ventilação e Climatização Artificiais: Revisão de Literatura**. Disponível em: http://repositorios.inmetro.gov.br/bitstream/10926/347/1/2005_TeixeiraBrionizioPereira.pdf. Acessado em 09/10/2012.

TEODORO, G. R. BUZZO, C. M. PRADO, I. A. C. KHOURI, S. **Levantamento Epidemiológico de Fungos Anemófilos em Ambientes Climatizados e Sistemas Condicionadores de Ar**. Trabalho submetido do VIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e IV Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba. 2008.

TORRES, E. BERISTAIN, J. G. LIEVANOS, Z.; ARENAS, R. **Carcinoma epidermoide como complicação letal de lesões crônicas de cromoblastomicose**. Anais Brasileiros de Dermatologia. 85(2):267-70. 2010.

VIEIRA, A. S. ANDRADE, F. A. SOUSA, P. M. QUEIRÓS, A. **Microbiologia do Ar Interior**. Engenharia do Ambiente, Universidade de Fernando Pessoa. 2008.

VIEIRA, F. C. S. SCALA Jr., N. L. NAHAS, E. **Erro na contagem de fungos pelo método “pour plate”**. Revista Ceres, 49 (283): 335-340. 2002.

WHO Regional Publications - World Health Organization Regional Office for Europe Copenhagen. **Indoor Air Quality:biological contaminants**. European Series No. 31. 1988.

WIRTH, F. GOLDANI, L. G. **Epidemiology of Rhodotorula : An Emerging Pathogen**. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases, 465717. 2012.

ZALAR, P.; NOVAK, M.; DE HOOG, G. S.; GUNDE-CIMERMAN, N. **Dishwashers - A man-made ecological niche accommodating human opportunistic fungal pathogens**. Elsevier. Fungal Biology, 115. 2011.

10 ANEXOS

ANEXO 1

RESOLUÇÃO N°09/03 DA AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA).

ANEXO 2

TABELA DOS FUNGOS ISOLADOS NO AMBIENTE SEM AERAÇÃO ARTIFICIAL.

FICHAS DOS FUNGOS ISOLADOS NO AMBIENTE SEM AERAÇÃO ARTIFICIAL.

ANEXO 3

TABELA DOS FUNGOS ISOLADOS NO AMBIENTE COM AERAÇÃO ARTIFICIAL.

FICHAS DOS FUNGOS ISOLADOS NO AMBIENTE COM AERAÇÃO ARTIFICIAL.

ANEXO 4

TABELA DE SIGLAS DO SISTEMA VITEK E API 20

ANEXO 1

**RESOLUÇÃO N°09/03 DA AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA
SANITÁRIA (ANVISA).**

ANEXO 2

**TABELA DOS FUNGOS ISOLADOS NO AMBIENTE SEM AERAÇÃO
ARTIFICIAL.**

**FICHAS DOS FUNGOS ISOLADOS NO AMBIENTE SEM AERAÇÃO
ARTIFICIAL.**

AR	AMOSTRAGEM	LOCAL	MORFOLOGIA	GÊNERO/ESPÉCIE
1	passiva	UFRJ	Filam.	<i>Aspergillus</i> sp.
3	passiva	UFRJ	Filam.	<i>Mycelia sterilia</i>
4	passiva	UFRJ	Filam.	<i>Aspergillus</i> sp.
6	passiva	UFRJ	Filam.	<i>Aspergillus</i> sp.
7	passiva	UFRJ	Filam.	<i>Aspergillus</i> sp. (<i>A. restrictus</i>)
8	passiva	UFRJ	Filam.	<i>Aspergillus</i> sp.
9	passiva	UFRJ	Filam.	<i>Aspergillus</i> sp.
16	passiva	UFRJ	Filam.	<i>Phialophora</i> sp.
17	passiva	UFRJ	Filam.	<i>Aspergillus</i> sp.
20	passiva	UFRJ	Filam.	fungo imperfeito não identificado
27	ativa	UFRJ	Filam.	<i>Penicillium</i> sp.
29	ativa	UFRJ	Leved.	<i>Rhodotorula</i> sp.
30	ativa	UFRJ	Filam.	<i>Mycelia sterilia</i>
34	ativa	UFRJ	Filam.	<i>Trichoderma</i> sp.
40	ativa	UFRJ	Filam.	<i>Fusarium</i> sp.
41	ativa	UFRJ	Filam.	fungo imperfeito não identificado
47	ativa	UFRJ	Filam.	<i>Aspergillus</i> sp. (<i>A. niger</i>)
48	ativa	UFRJ	Filam.	<i>Aspergillus</i> sp.
49	ativa	UFRJ	Filam.	Família <i>Dematiaceae</i>
50	ativa	UFRJ	Filam.	<i>Aspergillus</i> sp.
58	ativa	UFRJ	Filam.	<i>Mycelia sterilia</i>
62	ativa	UFRJ	Filam.	<i>Hormonema dematioides</i>
63	ativa	UFRJ	Filam.	<i>Aspergillus</i> sp.
64	ativa	UFRJ	Leved.	Não identificado
65	ativa	UFRJ	Leved.	<i>Rhodotorula muscilaginosa</i>
66	ativa	UFRJ	Filam.	fungo imperfeito não identificado
68	ativa	UFRJ	Filam.	<i>Exophiala</i> sp.
71	passiva	UFRJ	Leved.	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i>
72	ativa	UFRJ	Filam.	<i>Penicillium</i> sp.
84	passiva	UFRJ	Filam.	<i>Penicillium</i> sp.
86	passiva	UFRJ	Filam.	<i>Penicillium</i> sp.
87	filtro	UFRJ	Leved.	<i>Rhodotorula</i> sp.
89	filtro	UFRJ	Filam.	<i>Mycelia sterilia</i>
93	filtro	UFRJ	Filam.	<i>Aspergillus</i> sp.
98	filtro	UFRJ	Leved.	<i>Cryptococcus albidus</i>
100	filtro	UFRJ	Leved.	<i>Rhodotorula minuta</i>
102	filtro	UFRJ	Leved.	<i>Cryptococcus laurentii</i>
113	filtro	UFRJ	Filam.	<i>Mycelia sterilia</i>
114	filtro	UFRJ	Leved.	<i>Candida parapsilosis</i>
115	filtro	UFRJ	Leved.	<i>Cryptococcus</i> sp.

A	Pass/ativa	UFRJ	Filam.	<i>Penicillium</i>
B	passiva	UFRJ	Filam.	<i>Mycelia sterilia</i>
D	Pass/ativa	UFRJ	Filam.	<i>Mycelia sterilia</i>
E	passiva	UFRJ	Filam.	<i>Aspergillus sp.</i>
F	ativa	UFRJ	Filam.	<i>Mycelia sterilia</i>
G	ativa	UFRJ	Filam.	<i>Aspergillus sp.</i>
H	ativa	UFRJ	Filam.	<i>Mycelia sterilia</i>
I	ativa	UFRJ	Filam.	<i>Mucor sp., possível Mucor hiemalis</i>
J	ativa	UFRJ	Filam.	<i>Mycelia sterilia</i>
L	Pass/ativa	UFRJ	Filam.	<i>Rhizopus sp.</i>
M	ativa	UFRJ	Filam.	<i>Aspergillus sp.</i>
N	filtro	UFRJ	Filam.	<i>Penicillium sp.</i>
O	filtro	UFRJ	Filam.	<i>Rhizopus sp.</i>
P	passiva	UFRJ	Filam.	<i>Aspergillus sp.</i>
Q	ativa	UFRJ	Filam.	<i>Penicillium sp.</i>

ANEXO 3

**TABELA DOS FUNGOS ISOLADOS NO AMBIENTE COM AERAÇÃO
ARTIFICIAL.**

**FICHAS DOS FUNGOS ISOLADOS NO AMBIENTE COM AERAÇÃO
ARTIFICIAL.**

ARJ	AMOSTRAGEM	LOCAL	MORFOLOGIA	GÊNERO/ESPÉCIE
1	Passiva	INMETRO	Filamentoso	<i>Mycelia sterilia</i>
2	Passiva	INMETRO	Filamentoso	<i>Fusarium sp.</i>
3	Passiva	INMETRO	Filamentoso	<i>Mycelia sterilia</i>
5	Passiva	INMETRO	Levedura	<i>Exophiala sp.</i>
6	Passiva	INMETRO	Filamentoso	<i>Mycelia sterilia</i>
8	Passiva	INMETRO	Filamentoso	<i>fungo imperfeito não identificado</i>
9	Passiva	INMETRO	Filamentoso	<i>Mycelia sterilia</i>
10	Passiva	INMETRO	Filamentoso	<i>(fungo imperfeito, não identificado)</i>
11	Passiva	INMETRO	Filamentoso	<i>Mycelia sterilia</i>
14	Ativa	INMETRO	Filamentoso	<i>Penicillium sp.</i>
15	Ativa	INMETRO	Filamentoso	<i>Aspergillus sp.</i>
17	Ativa	INMETRO	Filamentoso	<i>Mycelia sterilia</i>
18	Ativa	INMETRO	Filamentoso	<i>Mycelia sterilia</i>
19	Ativa	INMETRO	Filamentoso	<i>Mycelia sterilia</i>
20	Ativa	INMETRO	Filamentoso	<i>Penicillium sp.</i>
22	Ativa	INMETRO	Filamentoso	<i>Mycelia sterilia</i>
23	Ativa	INMETRO	Filamentoso	<i>Paecilomyces sp.</i>
24	Ativa	INMETRO	Filamentoso	<i>Mycelia sterilia</i>
25	Ativa	INMETRO	Filamentoso	<i>Fusarium sp.</i>
26	Ativa	INMETRO	Filamentoso	<i>Penicillium sp.</i>
28	Ativa	INMETRO	Filamentoso	<i>Aspergillus sp.</i>
29	Ativa	INMETRO	Filamentoso	<i>Penicillium sp.</i>
30	Ativa	INMETRO	Filamentoso	<i>Mycelia sterilia</i>
31	Ativa	INMETRO	Filamentoso	<i>Aspergillus sp.</i>

ANEXO 4

TABELA DE SIGLAS DO SISTEMA VITEK E API 20

SIGLAS DO CARTÃO YST VITEK II	
LysA	L-Lysine-AMIDASE
TyrA	Tyrosine ARYLAMIDASE
dGLUa	D-GLUCOSE assimilation
dRAFa	D-RAFFINOSE assimilation
IRHAa	L-RHAMNOSE assimilation
dTURa	D-TURANOSE assimilation
IGLTa	L-GLUTAMATE assimilation
IProa	L-PROLINE assimilation
IMLTa	L-MALATE assimilation
BNAG	BETA-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE
LACa	LACTOSE assimilation
NAGA1	PNP-N-ACETYL-BD-galactosaminidase
XLTa	XYLITOL assimilation
dTREa	D-TREHLOSE assimilation
dXYLa	D-XILOSE assimilation
2KGa	2-KETO-D-GLUCONATE assimilation
LeuA	Leucine-ARYLAMIDASE
ARBa	ARBUTINE assimilation
MAdGa	METHYL-A-D-GLUCOPYRANOSIDE assimilation
dMNEa	D-MANNOSE assimilation
dSORa	D-SORBITOL assimilation
NO3a	NITRATE assimilation
LATa	DL-LACTATE assimilation
NAGa	N-ACETIL-GLUCOSAMINE assimilation
ARG	ARGININE GP
AMYa	AMYGDALINE assimilation
dCELa	D-CELOBIOSE assimilation
dMELa	D-MELIBIOSE assimilation
SACa	SACCHAROSE/SUCROSE assimilation
IARa	L-ARABINOSE assimilation
ACEa	ACETATE assimilation
dGNTa	D-GLUCONATE assimilation
ERYa	ERYTHRITOL assimilation
dGALa	D-GALACTOSE assimilation
GGT	GAMMA-GLUTAMIL-TRANSFERASE
dMLZa	D-MELEZITOSE assimilation
URE	UREASE
dGATa	D-GALACTURONATE assimilation
CITa	CITRATE assimilation
GLYLa	GLYCEROL assimilation
GENa	GENTIOBIOSE assimilation
dMALa	D-MALTOSE assimilation
ISBEa	L-SORBOSE assimilation
AGLU	ALPHA-GLUCOSIDASE
ESC	ESCULIN hydrolyse
GRTas	GLUCORONATE assimilation

SIGLAS DO SISTEMA API 20	
GLU	D-GLUcose
GLY	GLYcerol
2KG	cálcio 2-ceto-Gluconato
ARA	L-ARAbinose
XYL	D-XILose
ADO	ADONitol
XLT	XILitol
GAL	D-GALactose
INO	INOsitol
SOR	D-SORbitol
MDG	Metil- α D-Glucopiranosidio
NAG	N-Acetil-Glucosamina
CEL	D-CELobiose
LAC	D-LACtose
MAL	D-MALtose
SAC	D-SACarose
TER	D-TREalose
MLZ	D-MeLeZitose
RAF	D-RAFinose