

Instituto Politécnico de Viseu

Escola Superior de Tecnologia e Gestão de Viseu



Instituto Politécnico de Viseu

Escola Superior de Tecnologia e Gestão de Viseu



[Dedico este trabalho em memória dos meus avós paternos]

“A persistência é o caminho do êxito.”
(Charles Chaplin)

RESUMO

O presente projeto de mestrado foi realizado na Escola Superior de Tecnologia e Gestão de Viseu (ESTGV), teve a duração de seis meses, compreendidos entre o dia 06 de fevereiro de 2017 e o dia 31 de julho de 2017, tendo como tema principal a “Avaliação Microbiológica em Materiais de Construção e do Potencial Risco em Ensaios Laboratoriais”.

Este estudo teve como principais objetivos avaliar primeiramente numa escala laboratorial a resistência de diferentes materiais de construção ao desenvolvimento de fungos e numa segunda parte do trabalho, avaliar o risco de exposição dos técnicos de um laboratório de investigação de um estabelecimento de ensino superior aos agentes biológicos e químicos. Deste modo, inicialmente realizaram-se um conjunto de testes laboratoriais utilizando diferentes materiais de construção (argamassas e gesso cartonado) e sujeitos à aplicação de distintos sistemas de pintura tendo em conta as suas características variadas (substrato, natureza, proteção fúngica, entre outras). Estes provetes de ensaio foram posteriormente inoculados com uma espécie fúngica característica de ambientes internos. Os ensaios decorreram numa câmara climática em condições ambientais controladas de temperatura e humidade relativa. A investigação incidiu na avaliação quantitativa e qualitativa da população fúngica ao longo do período de amostragens definido (6 meses). Durante o ensaio procedeu-se à avaliação dos substratos e sistemas de pintura aplicados nos provetes de ensaio. A identificação da espécie fúngica foi efetuada através de análises macroscópicas, microscópicas para estudo da sua morfologia entre outras características e através de testes bioquímicos. A caracterização do estado final de conservação dos provetes de ensaio foi fundamentada no ensaio de carbonatação com base na determinação do valor de pH e na aspersão do indicador fenolftaleína *in situ*. Em simultâneo, procedeu-se à medição dos Compostos Orgânicos Voláteis (COV) totais na câmara climática onde estavam a decorrer os testes. As amostragens microbiológicas ao ar interior e a medição dos parâmetros físicos e químicos ocorreram numa instituição de ensino superior, mais precisamente em espaços pertencentes a um laboratório de investigação académico. A avaliação da exposição aos agentes biológicos foi realizada com base em duas metodologias distintas, respetivamente amostragem ativa e passiva. A amostragem ativa realizada com recurso a uma bomba de extração do ar na avaliação da população de fungos e bactérias e a amostragem passiva na avaliação apenas da população de fungos. Esta última avaliação consistiu na colocação de caixas de Petri abertas com meio sólido para a sedimentação dos esporos fúngicos ou fragmentos presentes no ar ambiente, por ação da gravidade durante um certo período de tempo conhecido. A avaliação da exposição aos agentes químicos e medições de parâmetros físicos foi realizada aquando das amostragens biológicas e para os mesmos espaços, tendo sido efetuadas medições de parâmetros tais como a temperatura, humidade relativa do ar, o dióxido de carbono (CO₂) e os COV totais através de medições em contínuo realizadas por equipamentos de medição eletrónicos. Os resultados obtidos revelaram que tanto na avaliação quantitativa como na qualitativa as contagens máximas de fungos foram registadas nos provetes

de gesso cartonado em relação aos provetes de argamassa. Os substratos de gesso, revelaram-se pouco resistentes ao desenvolvimento de fungos, comparativamente aos provetes de argamassa. A aplicação de sistemas de pintura nos provetes de argamassa com níveis de proteção elevada numa das camadas, não permitiu concluir qual das tintas usadas como primário ou acabamento assegura a ausência de fungos. Os provetes constituídos pelo sistemas de pintura à base de cal e de tintas acrílicas demonstraram um desempenho desfavorável face ao desenvolvimento de fungos. Os testes realizados para a identificação da espécie fúngica indicaram que talvez estivéssemos perante a espécie *Penicillium brevicompactum*. O ensaio de carbonatação segundo os dois processos mencionados revelou que os provetes não apresentam qualquer indicio de carbonatação, e por fim a medição de COV no interior da camara climática revelou que não existe uma relação significativa entre os mesmos e o crescimento dos fungos. Os resultados relativos às amostragens passiva aos fungos e ativa às bactérias revelaram valores que se encontravam fora da gama de contagem definida por caixa. As concentrações resultantes da amostragem ativa aos fungos revelaram que os locais próximos da câmara climática são os que apresentam uma maior concentração fúngica coincidentes com temperaturas elevadas, mas humidades relativas baixas. Os valores medidos de temperatura e humidade relativa do ar não apresentam qualquer risco para a saúde e conforto térmico dos técnicos. As concentrações de Unidades Formadoras de Colónias (UFC) não se encontram dentro do limite legal estabelecido pela legislação nacional, deste modo nada se pode concluir sobre o risco que representam para os técnicos expostos às mesmas, teriam de ser realizadas novas avaliações. As medições em contínuo dos COV totais permitiram concluir que as suas concentrações medidas se encontram acima dos limites legais, sendo a exposição aos mesmos considerada de médio risco para os técnicos. Enquanto a monitorização das concentrações de CO₂ encontram-se dentro do limite legal estabelecido pela legislação, não comportando qualquer risco para os técnicos. Por fim, foram ainda propostas algumas medidas de prevenção relativas à ventilação dos espaços, sendo fundamental a realização de 5 renovações por hora de forma a diminuir o risco de exposição aos agentes monitorizados.

ABSTRACT

This project was carried out at the Escola Superior de Tecnologia e Gestão de Viseu (ESTGV), which lasted for six months, between February 6 of 2017 and July 31 of 2017, having as main theme the "Microbiological Evaluation in Construction Materials and the Potential Risk in Laboratory Tests".

The main objectives of this study were to evaluate, on a laboratory scale, the resistance of different building materials to the development of fungi and, in a second part, to evaluate the risk of exposure of technicians of a research laboratory of a higher education institution to biological agents and chemicals. In this way, a set of laboratory tests using different construction materials (mortars and plasterboard) and subjected to the application of different painting systems were carried out, taking into account their varied characteristics (substrate, nature, fungal protection, among others) . These test specimens were then inoculated with a fungal species characteristic of indoor environments. The experiments were conducted in a climatic chamber under controlled ambient conditions of temperature and relative humidity. The investigation focused on the quantitative and qualitative evaluation of the fungal population over the defined sampling period (6 months). During the test, the substrates and paint systems applied to the test specimens were evaluated. The identification of the fungal species was carried out through macroscopic, microscopic analyses to study its morphology among other characteristics and through biochemical tests. The characterization of the final state of preservation of the test specimens was based on the carbonation test based on the determination of the pH value and the sprinkling of the phenolphthalein indicator in situ. At the same time, the total Volatile Organic Compounds (VOC) were measured in the climatic chamber where the tests were taking place. Microbiological sampling of indoor air and the measurement of physical and chemical parameters occurred in a higher education institution, more precisely in spaces belonging to an academic research laboratory. The evaluation of exposure to biological agents was performed based on two different methodologies, respectively active and passive sampling. The active sampling using an air extraction pump in the evaluation of the population of fungi and bacteria and the passive sampling in the evaluation of the fungi population only. This last evaluation consisted of the placement of open Petri dishes with solid media for the sedimentation of fungal spores or fragments present in the ambient air, by gravity during a certain known period of time. The chemical exposure assessment and physical parameter measurements were carried out during biological samplings and for the same spaces, and parameters such as temperature, relative humidity, carbon dioxide (CO₂) and VOC through continuous measurements by electronic measuring equipment. The results showed that in both quantitative and qualitative evaluation, the maximum fungal counts were recorded on the gypsum test cards in relation to the mortar test pieces. The gypsum substrates showed little resistance to the development of fungi compared to mortar specimens. The application of paint systems to mortar specimens with high levels of protection in one of the layers did not allow to

conclude which of the paints used as primer or finish ensures the absence of fungi. The test pieces consisting of the lime-based and acrylic paint systems showed an unfavourable performance against the development of fungi. The tests carried out for the identification of the fungal species indicated that we might be before the species *Penicillium brevicompactum*. The carbonation test according to the two processes mentioned has shown that the samples do not show any indication of carbonation, and finally the measurement of VOC inside the climatic chamber has revealed that there is no significant relationship between them and the growth of fungi. Results from passive to fungal and bacterial active samplings revealed values that were outside the box count range. Concentrations resulting from active fungal sampling revealed that the locations close to the climatic chamber are those with a higher fungal concentration coincident with elevated temperatures but with relatively low humidities. The measured values of temperature and relative humidity do not pose any risk to the health and thermal comfort of the technicians. Concentrations of Colony forming Units (CFU) are not within the legal limit established by national legislation, thus nothing can be concluded about the risk they pose to the technicians exposed to them, further evaluations would have to be carried out. Continuous measurements of total VOC allowed the conclusion that their measured concentrations are above legal limits, and exposure to them is considered a medium risk for technicians. While the monitoring of CO₂ concentrations are within the legal limit established by the legislation, and do not pose any risk to the technicians. Finally, some preventive measures regarding ventilation of the spaces were also proposed, being essential to carry out 5 renovations per hour in order to reduce the risk of exposure to the agents monitored.

PALAVRAS CHAVE

Materiais de construção;
Agentes biológicos e químicos;
Riscos de exposição;
Ensaio laboratoriais.

KEY WORDS

Construction Materials;
Biological and chemical agents;
Exposure hazards;
Laboratory tests.

AGRADECIMENTOS

A elaboração deste projeto foi apenas possível graças ao apoio de várias pessoas que colaboraram nas diversas etapas do mesmo, às quais devo o meu agradecimento.

Gostaria de começar por agradecer de forma muito especial à minha orientadora a Professora Doutora Maria Elisabete Ferreira Silva docente do Departamento de Ambiente da ESTGV, por toda a disponibilidade e paciência, pelo enorme apoio e simpatia em todos os momentos, por toda a ajuda e orientação científica, sem os quais este trabalho não teria sido possível.

Aos Professores Isabel Brás e Ricardo Almeida, docentes respetivamente do Departamento de Ambiente e Departamento de Civil da ESTGV, por toda a disponibilidade e auxílio prestado na realização deste trabalho e pela parceria estabelecida entre ambos os Departamentos da ESTGV, importante para a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Bioengenharia do Departamento de Ambiente da ESTGV, pela disponibilização de todo o material e equipamentos necessários para desenvolver o presente trabalho.

Agradeço à empresa de tintas ROBBIALAC S.A e ao Laboratório de Física das Construções da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto (FEUP), em particular à Professora Eva Barreira e à Ana pela parceria, fundamental para alcançar os objetivos deste trabalho.

Ao Engenheiro Pedro Silva, Técnico Superior do Departamento de Ambiente da ESTGV, por toda a disponibilidade e assistência ao longo da realização da parte laboratorial.

Aos estagiários da Escola Profissional de Seia, Fábio Saraiva e Tiago Santos e às estagiárias da Escola Secundária de Tondela, Mariana Matos e Cátia Pereira por toda a ajuda que me prestaram na parte laboratorial deste trabalho.

Agradeço à minha família, principalmente aos meus pais por todo o carinho, educação e apoio que me deram, essencial para o desenvolvimento do meu trabalho e por estarem sempre ao meu lado durante esta caminhada.

Por fim, agradecer aos meus amigos, em particular à Cláudia Melo, Cláudia Cardoso, Mariana Ventura, Joana Duarte e à Yuliya Dulyanska por todo o apoio e motivação que me transmitiram no decorrer desta etapa.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE GERAL	xv
ÍNDICE DE FIGURAS	xviii
ÍNDICE DE TABELAS	xx
ÍNDICE DE GRÁFICOS	xxii
ABREVIATURAS E SIGLAS	xxiv
I. Introdução	1
I.1 Enquadramento do trabalho	1
I.2 Caracterização do trabalho	2
I.3 Estrutura do documento	3
II. Estado da arte.....	4
II.1 Desenvolvimento de fungos nos edifícios	4
II.1.1 Aspetos gerais dos fungos filamentosos	4
II.1.2 Géneros fúngicos comuns nos edifícios	6
II.1.3 Condições favoráveis ao crescimento de fungos	7
II.2 Qualidade do ar interior	9
II.2.1 Principais contaminantes do ar interior e efeitos na saúde	9
II.2.2 Enquadramento legal	10
II.3 Referências.....	13
III. Análise da resistência de diferentes materiais de construção ao desenvolvimento de fungos	17
III.1 Resumo.....	17
III.2 Introdução.....	18
III.3 Material e Métodos.....	20
III.3.1 Preparação dos provetes de ensaio	20
III.3.2 Preparação da suspensão de fungos	24
III.3.3 Desenvolvimento do ensaio	25
III.3.4 Identificação da espécie fúngica isolada	28
III.3.5 Análise estatística	29

III.4	Resultados e discussão.....	30
III.4.1	Avaliação quantitativa do crescimento da população fúngica	30
III.4.2	Avaliação qualitativa do crescimento fúngico	35
III.4.3	Influência dos diferentes substratos no crescimento fúngico.....	39
III.4.4	Influência dos sistemas de pintura no crescimento fúngico no crescimento fúngico	43
III.4.5	Análise dos COV totais na câmara climática.....	47
III.4.6	Avaliação da carbonatação.....	49
III.4.7	Identificação da espécie fúngica	50
III.5	Conclusão	54
III.6	Referências	56
IV.	Avaliação do risco de exposição de técnicos de laboratório a agentes biológicos e químicos.....	62
IV.1	Resumo	62
IV.2	Introdução.....	63
IV.3	Material e Métodos	64
IV.3.1	Caracterização do local de estudo.....	65
IV.3.2	Avaliação da exposição a agentes biológicos	66
IV.3.3	Avaliação da exposição a agentes químicos	68
IV.4	Resultados obtidos e discussão.....	68
IV.4.1	Análise da exposição aos agentes biológicos.....	68
IV.4.2	Análise da exposição aos agentes químicos.....	71
IV.4.3	Medidas de prevenção face à exposição aos agentes biológicos e químicos.....	73
IV.5	Conclusão	74
IV.6	Referências	75
V.	Conclusão geral.....	79
VI.	Desenvolvimentos futuros.....	81
VII.	Anexos	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura II.1: Ciclo de vida dos fungos filamentosos (adaptado de Guerra et al., 2012).....	5
Figura III.1: Preparação dos provetes de ensaio: a) recolha <i>in-situ</i> ; b) antes da aplicação da argamassa; c) após a aplicação das argamassas (P1 e P2).	21
Figura III.2: Esquema utilizado para a identificação dos elementos dos provetes: (a) provete de argamassa P1; (b) provete de gesso G1	22
Figura III.3: Delimitação das zonas: a) elemento de um provete; b) esquema com indicação da ordem das recolhas.....	24
Figura III.4: Visualização de UFC de fungos presentes na amostra.	25
Figura III.5: Disposição dos provetes de ensaio e meios de controlo para validação das condições ambientais no interior da câmara climática.....	26
Figura III.6: Registo fotográfico da réplica 1A, do elemento 1, provete P1 : (a) aos 56 dias; (b) aos 140 dias. Tracejado indica manchas de início de crescimento fúngico observado.	36
Figura III.7: Registo fotográfico da réplica 9C, do elemento 9, provete P2 : (a) aos 56 dias; (b) aos 140 dias. Tracejado indica manchas de início de crescimento fúngico observado.	36
Figura III.8: Registo fotográfico da réplica 17A, do elemento 17, provete G1: (a) aos 56 dias; (b) aos 140 dias. Tracejado indica manchas de início de crescimento fúngico observado....	37
Figura III.9: Registo fotográfico da réplica 18A, do elemento 18, provete G1: (a) aos 56 dias; (b) aos 140 dias. Tracejado indica manchas de início de crescimento fúngico observado ...	37
Figura III.10: Registo fotográfico da réplica 19A, do elemento 19, provete G2 : (a) aos 28 dias; (b) aos 140 dias. Tracejado indica manchas de início de crescimento fúngico observado ..	38
Figura III.11: Registo fotográfico da réplica 20A, do elemento 20, provete G2 : (a) aos 56 dias; (b) aos 140 dias. Tracejado indica manchas de início de crescimento fúngico observado ...	38
Figura III.12: Avaliação da carbonatação através da aspersão do indicador fenolftaleína <i>in situ</i> para o provete de ensaio P2.....	50
Figura III.13: Espécie fúngica utilizada nos ensaios.....	51
Figura III.14: Análise microscópica da espécie fúngica isolada.....	52
Figura IV.1: Planta do laboratório do Departamento de Engenharia Civil, em estudo [escala 1-200].	66
Figura IV.2: Montagem para a avaliação da exposição a agentes biológicos: (a) Método passivo; (b) Método ativo.	67

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I.1: Cronograma temporal das tarefas realizadas durante o projeto .	2
Tabela II.1: Lista dos principais poluentes, respetivas fontes e efeitos na saúde humana (APA, 2009).	9
Tabela II.2: Condições de referência para os poluentes microbiológicos da QAI em edifícios, segundo a legislação portuguesa (Portaria n.º 353-A, 2013).	11
Tabela II.3: Limiares de proteção e margens de tolerância para os poluentes físico-químicos (Portaria n.º 353-A, 2013).	13
Tabela III.1: Características das tintas com função de primário.	22
Tabela III.2: Características das tintas com função de acabamento.	22
Tabela III.3: Combinação de primário e acabamento para cada elemento principal dos provetes de ensaio.	23
Tabela III.4a: Evolução do número de UFC/cm ² , para o provete P1- face A.	31
Tabela III.4b: Evolução do número de UFC/cm ² , para o provete P1- face B.	31
Tabela III.5a: Evolução do número de UFC/cm ² , para o provete P2- face A.	32
Tabela III.5b: Evolução do número de UFC/cm ² , para o provete P2- face B.	33
Tabela III.6a: Evolução do número de UFC/cm ² , para o provete G1- face A.	33
Tabela III.6b: Evolução do número de UFC/cm ² , para o provete G1- face B.	34
Tabela III.7a: Evolução do número de UFC/cm ² , para o provete G2- face A.	34
Tabela III.7b: Evolução do número de UFC/cm ² , para o provete G2- face B.	34
Tabela III.8: Valores de pH de carbonatação registados aos 140 dias nos quatro provetes de ensaio.	49
Tabela III.9: Resultados dos testes bioquímicos efetuados.	52
Tabela IV.1: Informação sobre a amostragem da QAI para os diferentes dias de amostragem.	67
Tabela IV.2: Cálculo das renovações/hora para as salas que apresentaram um maior risco de exposição a agentes biológicos e químicos (Nunes, 2006).	74
Tabela VI.A1 – Cálculo das tipicidades para a matriz de 0 a 100 UFC/cm ² .	82
Tabela VI.A2 – Cálculo das tipicidades para a matriz de 100 a 1000 UFC/cm ² .	82
Tabela VI.A3 – Cálculo das tipicidades para a matriz de 1000 a 10000 UFC/cm ² .	83
Tabela VI.A4 – Cálculo das tipicidades para a matriz de >10000 UFC/cm ² .	83

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico III.1: Evolução do crescimento fúngico perante os substratos R1 e R2, para os conjuntos de elementos: 1+9 e 2+10.....	40
Gráfico III.2: Evolução do crescimento fúngico perante os substratos R1 e R2, para os conjuntos de elementos: 3+11, 4+12 e 5+13.	40
Gráfico III.3: Evolução do crescimento fúngico perante os substratos R1 e R2, para os conjuntos de elementos: 6+14, 7+15 e 8+16.	41
Gráfico III.4: Evolução do crescimento fúngico perante os substratos de gesso G1 e G2, para os conjuntos de elementos: 17+19 e 18+20.	42
Gráfico III.5: Crescimento fúngico para os elementos do provete P1 em função do tempo para avaliar a influência do sistema de pintura.	44
Gráfico III.6: Crescimento fúngico para os elementos do provete P2 em função do tempo para avaliar a influência do sistema de pintura.	45
Gráfico III.7: Medição de COV totais no interior da câmara climática, após 14 dias do início dos ensaios.	48
Gráfico IV.1: Variação da concentração de fungos, temperatura e humidade relativa ao longo do tempo de amostragem para os locais em estudo.	69
Gráfico IV.2: Variação da concentração de COV totais ao longo do tempo de amostragem para os locais em estudo.	72
Gráfico IV.3: Variação do CO ₂ ao longo do tempo de amostragem para os locais L1 e L2..	73

ABREVIATURAS E SIGLAS

AVAC	Aquecimento, Ventilação e Ar Condicionado
COV	Compostos Orgânicos Voláteis
ESTGV	Escola Superior de Tecnologia e Gestão de Viseu
Face A	Face inoculada
Face B	Face controlo (não inoculada)
FEUP	Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto
G1	Provede de gesso cartonado normal
G2	Provede de gesso cartonado hidrófugo
P1	Provede de argamassa de cal
P2	Provede de argamassa bastarda
PVC	do inglês “Pigment Volume Concentration”
QAI	Qualidade do Ar Interior
R1	Argamassa de cal
R2	Argamassa bastarda
RECS	Regulamento de Desempenho Energético dos Edifícios de Comércio e Serviços
REH	Regulamento do Desempenho Energético dos Edifícios de Habitação
SCE	Sistema de Certificação Energética de Edifícios
PCR	do inglês, “Polymerase Chain Reaction”
UFC	Unidades Formadoras de Colónias
UFC/cm ²	Unidades Formadoras de Colónias por centímetro quadrado (área amostrada)

I. Introdução

I.1 Enquadramento do trabalho

Durante a vida útil dos edifícios estes encontram-se sujeitos ao envelhecimento natural e a eventuais danos nos materiais de construção devido a diferentes processos químicos, físicos e biológicos que podem ocorrer (H. Viitanen et al., 2010). Atualmente, uma das patologias mais habituais nas superfícies interiores das paredes e dos tetos dos edifícios é o desenvolvimento de fungos filamentosos mais conhecidos por bolores. Fazia parte dos hábitos quotidianos das pessoas a necessidade de abrir janelas para proceder ao arejamento dos edifícios. Contudo, atualmente as preocupações com os consumos energéticos têm conduzido a um agravamento desta patologia, pois os edifícios cada vez são mais estanques, não se garantindo desta forma caudais de ventilação adequados para a renovação do ar interior. Deste modo, nos espaços interiores verifica-se um aumento da humidade do ar o que proporciona condições favoráveis para o desenvolvimento de microrganismos (Sedlbauer, 2001). A humidade é uma das principais causas de desenvolvimento de bolores nos edifícios e da degradação dos elementos de construção, nomeadamente através dos fenómenos de condensação. Frequentemente as condensações resultam de uma conceção inadequada da envolvente, associada ao incorreto tratamento das pontes térmicas, insuficiente isolamento térmico, ventilação reduzida e não homogénea dos espaços e aquecimento muitas vezes insuficiente ou inexistente (Pinto, Freitas, & Viegas, 2007). A utilização de determinados materiais como revestimento interior das paredes e tetos também pode contribuir para agravar o problema.

Vários estudos realizados pela comunidade científica indicam que o crescimento fúngico afeta não só a durabilidade e desempenho dos materiais, mas também tem um impacto significativo na saúde e bem-estar dos ocupantes. As infeções respiratórias (pneumonias e tuberculose), reações alérgicas (asma e rinite) e efeitos irritantes nos olhos, nariz e pele são apontados por vários autores como doenças e sintomas associados à contaminação do ar interior por esporos fúngicos e pelos seus metabólitos produzidos durante o seu estágio de vida (WHO, 2009).

A realização de trabalhos de investigação em laboratórios de ensino e instituições de investigação exigem ambientes com as condições mínimas de segurança, pois estes também se encontram expostos a um conjunto de riscos, entre eles os biológicos. Os riscos biológicos resultam da exposição dos profissionais a agentes infecciosos ou materiais biológicos perigosos que exercem efeitos nocivos sobre a sua saúde, como por exemplo as infeções e alergias causadas pela manipulação de uma grande diversidade de microrganismos, para além da exposição aos agentes químicos associados ao edifício e ao metabolismo principalmente de fungos e bactérias (Rim & Lim, 2014). Deste modo, os principais objetivos deste trabalho consistiram na avaliação a uma escala laboratorial da resistência de diferentes materiais de

construção ao desenvolvimento de fungos e simultaneamente avaliar o risco de exposição dos técnicos de um laboratório de investigação de um estabelecimento de ensino superior aos agentes biológicos e químicos.

I.2 Caraterização do trabalho

O presente projeto realizado na Escola Superior de Tecnologia e Gestão de Viseu (ESTGV), teve a duração de seis meses, compreendidos entre o dia 06 de fevereiro de 2017 e o dia 31 de julho de 2017. O tema principal do projeto foi a “Avaliação Microbiológica em Materiais de Construção e do Potencial Risco em Ensaios Laboratoriais”. O cronograma temporal de trabalhos deste projeto é apresentado na Tabela I.1, onde se encontram delineadas as consequentes fases e tarefas do mesmo.

Tabela I.1: Cronograma temporal das tarefas realizadas durante o projeto .

Tarefas	Fevereiro 2017	Março 2017	Abril 2017	Mai 2017	Junho 2017	Julho 2017
Pesquisa bibliográfica						
Análise da resistência de diferentes materiais de construção ao desenvolvimento de fungos						
Avaliação do risco de exposição de técnicos de laboratório a agentes biológicos e químicos						
Análise dos resultados e elaboração de proposta de melhorias						
Elaboração do relatório de projeto						

A pesquisa bibliográfica consistiu num levantamento da informação relativa ao estado da arte relativo ao tema em questão e no que concerne a aspetos legais relacionados. De seguida, realizaram-se um conjunto de testes laboratoriais utilizando diferentes materiais de construção, na avaliação da resistência dos mesmos ao desenvolvimento fúngico. Os provetes ensaiados foram inoculados, com meio líquido nutritivo rico numa espécie fúngica para posterior avaliação em termos de quantificação e inspeção visual, estudo da influência do substrato e dos

sistemas de pintura aplicados nos provetes, análise dos COV totais, avaliação da carbonatação e identificação da espécie fúngica inoculada nos provetes de ensaio.

O passo seguinte consistiu na avaliação do risco de exposição dos técnicos do Laboratório de Física das Construções (LFC) de uma instituição do ensino superior aos agentes biológicos e químicos. Realizaram-se amostragens microbiológicas ao ar interior de salas pertencentes ao LFC onde decorreram os testes laboratoriais para a análise de bactérias e fungos, bem como de parâmetros químicos como o CO₂, os COV totais e adicionalmente efetuaram-se medições da temperatura e humidade relativa desses espaços.

Por fim, realizou-se a análise e discussão dos resultados, para se proceder à elaboração do respetivo relatório do projeto.

I.3 Estrutura do documento

O presente documento encontra-se dividido em diferentes capítulos. No primeiro capítulo (I) realiza-se uma abordagem teórica do tema geral de modo a enquadrar os dois casos práticos em análise e efetua-se uma breve caracterização do projeto e respetivo planeamento dos trabalhos a executar. No segundo capítulo (II) realiza-se uma breve revisão bibliográfica que consistiu no levantamento da informação relativa ao estado da arte segundo o tema em questão e no que concerne aos aspetos legais relacionados. Uma vez que os temas abordados neste relatório têm diferentes especificidades, a apresentação dos estudos de caso segue o formato típico de um artigo, enquadrando um resumo, introdução, metodologia, discussão, conclusão e referências bibliográficas. Assim, no terceiro capítulo (III) realizaram-se um conjunto de testes laboratoriais utilizando diferentes materiais de construção na avaliação da resistência dos mesmos ao desenvolvimento fúngico. Os provetes ensaiados foram inoculados, com meio líquido nutritivo rico numa espécie fúngica para posterior avaliação em termos de quantificação, identificação, avaliação da influência do substrato e dos sistemas de pintura aplicados nos provetes, análise dos COV totais e avaliação da carbonatação dos provetes. No quarto capítulo (IV) procedeu-se à avaliação do risco de exposição dos técnicos do LFC de uma instituição do ensino superior aos agentes biológicos e químicos. Realizaram-se amostragens microbiológicas ao ar interior de salas pertencentes ao LFC onde decorreram os testes laboratoriais, para a análise de bactérias e fungos, bem como de parâmetros químicos como o CO₂, os COV totais e adicionalmente efetuaram-se medições de parâmetros físicos como a temperatura e a humidade relativa desses espaços. O quinto capítulo (V) é relativo à conclusão geral resultante dos estudos efetuados. O sexto capítulo (VI) apresenta alguns desenvolvimentos futuros associados aos trabalhos desenvolvidos. E por fim, o sétimo capítulo (VII) são os anexos relativos à análise estatística das características dos sistemas de pintura aplicados nos provetes de ensaio.

II. Estado da arte

II.1 Desenvolvimento de fungos nos edifícios

O desenvolvimento de fungos no interior dos edifícios não é um problema recente, mas pode ser considerado um fenómeno intermitente. As crescentes preocupações relacionadas com a eficiência energética dos edifícios têm conduzido à criação de ambientes internos mais herméticos, providenciando assim um meio favorável ao desenvolvimento dos fungos (Moon, 2005). Apesar da evolução dos materiais de construção utilizados, assim como das técnicas aplicadas em obra, um entre os principais fatores que proporciona o desenvolvimento desta patologia nos edifícios é a humidade ambiente. Além de proporcionar o desenvolvimento dos microrganismos, é responsável por diversos mecanismos de deterioração relacionados, quase sempre, à porosidade do material. Entre os materiais e produtos mais suscetíveis ao ataque dos fungos está a madeira, as tintas e os vernizes, estes dois últimos dependentes do tipo de constituintes (Pinheiro, 2003; Sedlbauer, 2001). Assim, surge a necessidade de minimizar e controlar este problema, garantindo as condições de salubridade exigidas a um edifício. Para tal, é necessário compreender o que são fungos e quais os fatores que potenciam o seu desenvolvimento.

II.1.1 Aspetos gerais dos fungos filamentosos

Os fungos são um grupo diverso e amplamente disseminado de organismos abrangendo os bolores, as leveduras e os cogumelos. Na Terra existem cerca de 1,5 milhões de espécies de fungos, das quais 100 000 espécies foram identificadas e uma fração de aproximadamente 200 espécies integram o microbioma de ambientes interiores (Samson, 2011).

O bolor que se desenvolve nas superfícies das edificações, manifesta-se através da ação de microrganismos conhecidos como fungos filamentosos. A maioria destes fungos é multicelular, formando uma rede de filamentos denominados por hifas. A sua presença no interior dos edifícios é notória através do aparecimento de manchas devido à libertação de pigmentos através dos esporos, ou à presença do micélio que é o único constituinte dos fungos filamentosos que se manifesta macroscopicamente (Guerra, Cunha, Silva, & Knop, 2012).

A maioria dos fungos filamentosos são quimiorganotróficos e aeróbios, alimentando-se por meio da secreção de enzimas extracelulares que digerem materiais poliméricos, como polissacarídeos ou proteínas em monômeros que são assimilados como fontes de carbono e energia (Madigan, Martinko, Bender, Buckley, & Stahl, 2016).

A Figura II.1, apresenta esquematicamente o ciclo de reprodução assexuada típico dos fungos filamentosos que consiste em quatro estágios: produção dos esporos, germinação dos esporos, o crescimento das hifas e a formação de unidades reprodutivas.

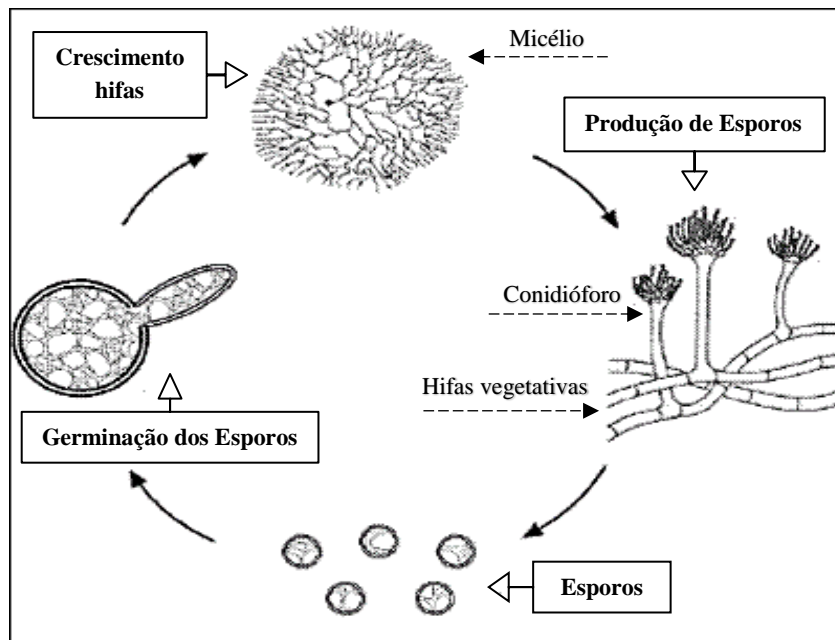


Figura II.1: Ciclo de vida dos fungos filamentosos (adaptado de Guerra et al., 2012).

Todo o processo reprodutivo por esporulação de um fungo tem início com a produção de células reprodutoras especializadas, os esporos vegetativos (ou conídios) que se encontram em cadeias sob a extremidade de uma estrutura filamentosa resistente o conidióforo. O tamanho do esporo fúngico normalmente varia entre 2 e 10 μm e apresenta uma velocidade média de sedimentação de apenas 0,1 cm/s . Estes são facilmente dispersos pelo ar, entrando facilmente nos edifícios através de portas, janelas e sistemas de ventilação. Os animais domésticos, as pessoas e os seus bens pessoais funcionam também como meios de transporte de matéria fúngica. No interior dos edifícios os esporos ou fragmentos fúngicos ao se fixarem num determinado substrato segundo condições ambientais favoráveis podem iniciar o estágio de germinação (Sedlbauer, 2001; Tortora, Funke, & Case, 2012).

Após o estágio de germinação dos esporos, verifica-se imediatamente o desenvolvimento das hifas em filamentos mais densos e alongados, que vão dar origem a um conjunto de ramificações entrelaçadas que constituem o micélio. Estas hifas vegetativas são responsáveis por libertar enzimas que fracionam a matéria orgânica presente no meio onde se fixam, por exemplo material de construção como a madeira, obtendo assim os nutrientes que necessitam por absorção direta para o seu crescimento (Giuseppe, 2013).

Segundo os estudos desenvolvidos por Sedlbauer (2001) e Viitanen et al. (2010), estes revelam que o ciclo de vida dos bolores encontra-se dependente dos nutrientes presentes no substrato e

da humidade necessária para o seu desenvolvimento. Logo, o controlo das condições ambientais nos edifícios é fundamental para prevenir o seu desenvolvimento e proliferação, conforme será enfatizado nos subcapítulos seguintes.

II.1.2 Géneros fúngicos comuns nos edifícios

O microbioma dos ambientes internos compreende um vasto número de grupos taxonómicos diferentes. Por exemplo, um pesquisa realizada em 1200 casas nos diferentes Estados Americanos revelou uma média de aproximadamente 2000 tipos de fungos presentes no interior das habitações (Barberán et al., 2015).

A abundância, a composição e a diversidade das comunidades microbianas encontradas no interior dos edifícios são o resultado das interações dinâmicas com o ar exterior, o próprio edifício (incluindo estratégias de ventilação, condições ambientais e materiais de construção), os ocupantes (humanos e animais) e suas atividades (Leung & Lee, 2016). Outro fator relevante que interfere com a comunidade microbiana externa e conseqüentemente na interna é a localização geográfica dos edifícios. Esta conduz a variações espaciais que podem resultar de diferenças no uso da terra e no tipo de vegetação existente que, por sua vez, hospedam diferentes comunidades microbianas que são arrastadas pelas massas de ar que passam, e a variação temporal associada às variáveis sazonais e climáticas (Jones & Harrison, 2004).

Assim, compatibilizando a informação, os fungos mais comuns no interior dos edifícios são os géneros *Cladosporium*, o *Penicillium* e o *Aspergillus*. O género *Cladosporium* são espécies de fungos comuns nas amostragens do ar interior nos edifícios, podendo se desenvolverem em diversos substratos entre eles os materiais de construção como as tintas, principalmente as tintas acrílicas (orgânicas), madeira, placas de gesso, entre outros materiais com características orgânicas (Schubert et al., 2007). Na maioria dos manuais são referidas as seguintes espécies como as que predominantemente se desenvolvem em espaços interiores como *Cladosporium cladosporioides*, *C. sphaerospermum*, *C. herbarum* e *C. macrocarpum* (Robert A. Samson & Olaf C.G. Adan, 2011). Estas espécies caracterizam-se por produzirem colónias de hifas septadas e escuras, com conidióforos laterais e terminais de diversos tamanhos. Estes podem apresentar uma coloração preta ou esverdeada clara, sendo levemente dilatados nas extremidades, o que conduz à produção de cadeias longas e ramificadas de conídios ovais de paredes lisas e finas, apresentando uma estrutura morfológica idêntica à de uma árvore (Menezes, Pérez, & Lima, 2017).

Por fim, os géneros *Penicillium* e *Aspergillus* são dos géneros fúngicos que apresentam uma maior diversidade de espécies no interior dos edifícios, verificando-se também a sua presença em materiais de construção e acabamentos constituídos por polímeros orgânicos naturais, tais como os mencionados anteriormente para o género *Cladosporium*. As espécies fúngicas mais

comuns em ambientes internos do género *Penicillium* são *Penicillium chrysogenum*, *P. brevicompactum*, *P. olsonii* e *P. glabrum* (Flannigan, Samson, & Miller, 2016). Este género apresenta conídios unicelulares, incolores ou em tons de verde com tamanhos e formas variáveis. Os conidióforos são simples ou agregados dando origem a estruturas com a forma de uma vassoura (Yang & Heinsohn, 2006). Por fim, as espécies fúngicas do género *Aspergillus* mais comuns em ambientes interiores encontram-se divididas em dois grupos as espécies patogénicas para os humanos (por exemplo, *A. fumigatus*, *A. terreus*) ou as produtoras de micotoxinas (por exemplo, *A. flavus*, *A. versicolor*) (Mousavi, Hedayati, Hedayati, Ilkit, & Syedmousavi, 2016). As suas colónias caracterizam-se por apresentarem coloração branca, amarela, castanha, preta ou em tons de verde, consistindo principalmente em um feltro denso de conidióforos eretos. O que distingue este género dos restantes são as suas estruturas reprodutoras assexuadas, por apresentarem na extremidade do conidióforo uma vesícula por onde são disseminados os conídios (Nielsen, 2002; Robert A. Samson & Olaf C.G. Adan, 2011).

II.1.3 Condições favoráveis ao crescimento de fungos

Para que ocorra o desenvolvimento e proliferação dos fungos é necessário a combinação favorável de um conjunto de condições, sendo que estas variam de acordo com a espécie. Deste modo, os principais fatores que influenciam a extensão do crescimento fúngico e o seu metabolismo são a humidade relativa, a temperatura e o substrato (Polizzi et al., 2012).

A humidade relativa é um dos fatores mais determinantes para o crescimento dos fungos, pois não é apenas a germinação de esporos e o crescimento do micélio que dependem fortemente da humidade disponível, mas também a produção de micotoxinas e a obtenção de alimento requerem determinadas humidades. A humidade pode estar presente no ar sob a forma de vapor de água ou associada aos substratos e superfícies no estado líquido onde se fixam os fungos (Moon, 2005). Cada espécie pode ser caracterizada pela humidade relativa que requer para se desenvolver, sendo que esse valor pode ser ligeiramente diferente conforme a fase de crescimento em que o microrganismo se encontra. Consequentemente, os colonizadores primários que são xerofílicos capazes de crescer em ambientes com uma humidade relativa inferior a 80%, os colonizadores secundários que são os fungos que necessitam no mínimo de um teor de humidade entre os 80-90% inclusive e por fim os colonizadores terciários que são higrófilos, pois exigem mais de 90% de humidade (Nielsen, 2002). Para o desenvolvimento dos fungos no geral, exceto para os fungos xerófilos, a humidade relativa deve estar compreendida entre os 80% e 95%, sendo que em ambiente saturado (HR= 100%) é difícil a proliferação dos fungos, visto que poucos sobrevivem ao facto da água em estado líquido dissolver os nutrientes (Sedlbauer, 2001).

Segundo a literatura, os fungos podem se desenvolver dentro de uma gama de temperaturas que vão dos 0°C aos 55°C, verificando-se que estes são geralmente mais tolerantes ao frio, do que

ao calor (Sedlbauer, 2001). Dentro dessa gama, as condições de temperatura ideais para a maioria das espécies fúngicas varia entre os 20 °C e os 35 °C, pois fora desta faixa o seu desenvolvimento é muito mais lento (Black, 2006) . Uma vez que as temperaturas dentro do interior dos edifícios ou nas superfícies internas geralmente estão entre os 15°C e os 30°C, a temperatura nunca terá efeito letal sobre fungos. Tendo em conta a diversidade fúngica, estes também podem ser caracterizados por diferentes classes, dependendo da faixa de temperatura em que ocorre o seu crescimento. Deste modo, temos os psicrófilos que são fungos capazes de viver e se reproduzir a temperaturas baixas, sendo que a temperatura ótima de crescimento se situa entre os 0°C e os 20 °C, a temperatura máxima de crescimento em 20° C ou mais e a temperatura mínima de crescimento em 0°C ou menos. Os mesófilos são organismos fúngicos que se desenvolvem segundo condições de temperatura moderadas, nem muito altas nem muito baixas, entre os 20 °C e os 40°C. Ainda nesta gama dos mesófilos temos os mesófilos psicrófilos que crescem segundo temperaturas baixas (5-20 °C) e os mesófilos termotolerantes que crescem segundo temperaturas elevadas (40-50°C). Os fungos termófilos são capazes de crescer a temperaturas elevadas entre os 50°C e os 55°C (Flannigan et al., 2016).

Além da humidade e temperatura, o conteúdo de nutrientes do substrato em que cresce o fungo é também um fator importante. Os fungos na sua generalidade são quimiorganotróficos alimentando-se por meio da secreção de enzimas extracelulares que digerem materiais poliméricos, como polissacarídeos ou proteínas, em monómeros que são assimilados como fontes de carbono e energia (Madigan et al., 2016). Nos edifícios, os substratos que suportam o crescimento fúngico são na sua maioria materiais de construção orgânicos ou produzidos a partir de produtos orgânicos, tais como papel, cola, tintas, têxteis, tetos, mobiliário, paredes de gesso e telhas, entre outros. Os materiais de construção inorgânicos, como azulejos cerâmicos, aço, tijolos e betão, também podem suportar o crescimento dos fungos, pois são materiais porosos onde se fixam as poeiras oriundas do ar, acabando por contribuir para o desenvolvimento fúngico. Deste modo, embora os fungos possam se desenvolver em qualquer tipo de substrato, os materiais orgânicos como a madeira, o papel e o cartão favorecem o crescimento mais rápido e conseqüentemente maior o risco biológico (Black, 2006).

Fatores adicionais como os esporos fúngicos presentes no ambiente exterior também são um fator condicionante do número de fungos que se irão desenvolver e concentrar nos espaços interiores, devido à ampla diversidade existente no ar exterior. Um teor de oxigénio de pelo menos 0,14 a 0,25 % é fundamental nos ambientes interiores, tendo em conta que os fungos são maioritariamente aeróbios. O pH do substrato deve permanecer numa faixa de 3 a 9, pois a proliferação de fungos acontece preferencialmente em ambientes ácidos e neutros para a maioria das espécies, contudo os valores de pH entre 2 a 11 também são tolerados por alguns fungos. Por outro lado, a maioria dos fungos filamentosos não requer luz solar, pois não realizam fotossíntese, podendo se desenvolver em ambientes escuros (O.A.A, 2003; Sedlbauer, 2001).

II.2 Qualidade do ar interior

As questões no âmbito da Qualidade do Ar Interior (QAI) têm tido uma importância crescente na Europa e no resto do mundo, despertando o interesse da comunidade científica e da sociedade em geral, que durante muito tempo se preocuparam, essencialmente, com os efeitos da poluição exterior na saúde. Estima-se que passamos 90% do nosso tempo em ambientes fechados. O ar que se respira nos locais de trabalho, espaços públicos e mesmo em nossas casas pode não ser saudável. A qualidade do ar dos ambientes interiores é alterada pela interação de diferentes agentes tais como os físicos (temperatura, radiação solar, ruído, entre outros), químicos (compostos orgânicos e inorgânicos) e biológicos, produzindo diversos efeitos que alteram a QAI dos edifícios e, naturalmente afetam o estado de saúde dos seus ocupantes (Santos, 2010). O estudo destes efeitos é importante, implicando a realização de inspeções e análises de forma a aferir os índices da qualidade do ar que respiramos no interior dos edifícios.

II.2.1 Principais contaminantes do ar interior e efeitos na saúde

A QAI é influenciada por diversos fatores, assim os poluentes interiores mais comuns variam consoante as fontes que os emitem. Deste modo, fatores como a ocupação do edifício, o fim a que se destinam, as atividades nele desenvolvidas, as ações de manutenção do edifício, o tipo de ventilação e a limpeza dos sistemas de ventilação são fatores essenciais a ter em conta numa caracterização da QAI. Em termos globais, a exposição a poluentes do ar interior é mais significativa do que a exposição à poluição exterior (Hoskins, 2010). Os principais poluentes, que se podem encontrar no ar interior são os compostos orgânicos, compostos inorgânicos, matéria particulada, contaminantes biológicos e radiação (APA, 2009). Na Tabela II.1 encontra-se uma lista dos poluentes do ar interior e respetivos efeitos e consequências na saúde humana, bem como as principais fontes potenciadores da presença desses poluentes.

Tabela II.1: Lista dos principais poluentes, respetivas fontes e efeitos na saúde humana (APA, 2009).

Poluentes	Principais fontes	Efeitos na saúde
Partículas Suspensas no Ar	Fumo, entradas de ar, isolamento de tubagens, gotículas de água, carpetes, filtros de AVAC, limpezas, entre outros.	Irritação da pele e mucosas, doenças respiratórias.
Dióxido de carbono (CO₂)	Contaminação exterior, tabaco, ocupantes (respiração), entre outros.	Níveis superiores a 1000 ppm podem causar a dores de cabeça, irritação de olhos e garganta, fadiga, falta de ar, entre outros.
Monóxido de carbono (CO)	Contaminação exterior, combustão incompleta sem exaustão, ocupantes (respiração), tabaco, entre outros.	Forma a carboxiemoglobina que impede a captação de oxigénio, podendo levar à morte. Dores de cabeça, cansaço, náuseas. Efeitos no sistema nervoso central e no cardiovascular.

Ozono (O₃)	Fotocopiadoras, impressoras a laser, aparelhos de limpeza, reações fotoquímicas, desinfetantes da água, entre outros.	Acima de 0,12 ppm, pode provocar irritação de olhos, reações alérgicas, dores de cabeça, secura de boca e garganta, pressão no peito e tosses.
Formaldeído	Desinfetantes, isolantes, tintas, colas, adesivos, tabaco, material têxtil, mobiliário, resinas, entre outros.	É carcinogénico para os seres vivos. A sua elevada toxicidade produz irritação nos olhos, nariz, garganta e vias respiratórias, dores de cabeça, enjoos e fadiga.
Compostos Orgânicos Voláteis (COV)	Fotocopiadoras e impressoras, computadores, carpetes, mobiliário, produtos de limpeza, fumo tintas, adesivos, perfumes, laca, solventes, entre outros.	Olhos vermelhos, secura das mucosas do nariz e garganta, dores de cabeça, fadiga.
Bactérias		Febres, dores de cabeça, fadiga e dores musculares, efeitos irritantes nos olhos, nariz, garganta e pele.
<i>Legionella spp.</i>	Sistema AVAC, materiais de construção e decoração, alcatifa, pólen, zonas húmidas do edifício, penas, excrementos de insetos, ocupantes, água estagnada (<i>Legionella</i> e Fungos), ar insuflado, entre outros.	Infeção pulmonar (“doença do legionário”), febres altas.
Fungos		Febres, dores de cabeça, fadiga e dores musculares (a maior parte destes sintomas desaparece entre 10 e 20 horas depois da exposição), efeitos irritantes nos olhos, nariz, garganta e pele
Radão	Solo de zonas gravíticas, materiais de construção, rochas graníticas por baixo do edifício (a libertação de radão está condicionada pela permeabilidade e porosidade dos solos e rochas e também pela pressão atmosférica, temperatura e humidade).	Quando depositado nos pulmões pode gerar cancro.

II.2.2 Enquadramento legal

A QAI tem sido reconhecida mundialmente como um fator de risco para a saúde humana e alvo de questões frequentes por parte da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2009). A QAI é afetada pelos aerossóis existentes no ambiente, que podem ser de origem química, física e biológica. (Bernasconi et al., 2010).

Em Portugal, com a publicação da diretiva n.º 2010/31/EU, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 19 de maio de 2010, relativa ao desempenho energético dos edifícios, o regime estabelecido pela diretiva n.º 2002/91/CE foi reformulado através de novas disposições que vieram reforçar o quadro de promoção do desempenho energético nos edifícios, à luz das metas e dos desafios acordados pelos estados membros para 2020. Deste modo, surge o decreto-lei n.º 118/2013, de 20 de agosto, o qual fez uma revisão da legislação nacional ao incluir, num único diploma, o Sistema de Certificação Energética dos Edifícios (SCE), o Regulamento de Desempenho Energético dos Edifícios de Habitação (REH) e o Regulamento de Desempenho

Energético dos Edifícios de Comércio e Serviços (RECS), atendendo, simultaneamente, aos interesses inerentes à aplicabilidade integral e utilidade deste quadro legislativo, e aos interesses de simplificação e clareza na produção legislativa de carácter predominantemente técnico. Este decreto-lei transpôs a diretiva n.º 2010/31/UE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 19 de maio de 2010, relativa ao desempenho energético dos edifícios (APA, 2017).

Como base de apoio a este decreto-lei foi criada a portaria n.º 353-A/2013, de 4 de dezembro, a qual determina os valores mínimos de caudal de ar novo por espaço, bem como os limiares de proteção e as condições de referência para os poluentes do ar interior dos edifícios novos de comércio e serviços, sujeitos a grande intervenção e existentes e a respetiva metodologia de avaliação. Ao nível dos poluentes microbiológicos, esta portaria define condições de referência bastante apertadas comparativamente com os anteriores diplomas, que estipulavam uma concentração máxima de agente biológico (bactérias e fungos) de 500 UFC/m³ (Unidades Formadoras de Colónias por metro cúbico), enquanto a legislação atual estipula que a concentração é variável consoante o tipo de agente biológico (bactérias, fungos) a pesquisar no ar interior. Na Tabela II.2 estão indicadas as condições de referência para os poluentes microbiológicos no interior de edifícios.

Tabela II.2: Condições de referência para os poluentes microbiológicos da QAI em edifícios, segundo a legislação portuguesa (Portaria n.º 353-A, 2013).

Poluentes	Matriz	Unidade	Condições de referência
Bactérias	Ar	UFC/m ³	Concentração de bactérias no interior inferior à concentração no exterior, acrescida de 350 UFC/m ³ .
Fungos	Ar	UFC/m ³	Concentração de fungos no interior inferior à detetada no exterior.
<i>Legionella</i> spp.	Água	UFC/L	Concentração inferior a 100 UFC/L, exceto no caso da pesquisa em tanques de torres de arrefecimento em que deve verificar-se uma concentração inferior a 100 UFC/L.

Nos pontos de amostragem em que se verifiquem situações de não conformidade para um ou mais dos poluentes microbiológicos, deverá ser feita nova avaliação com base nos seguintes critérios específicos:

- a) No caso das bactérias, e nas situações em que a concentração de bactérias totais no interior exceder em 350 (UFC/m³) o valor medido no exterior e, simultaneamente, a concentração de dióxido de carbono (CO₂) for inferior a 1800 (mg/m³), deve ser determinada a razão entre as bactérias Gram negativas (-) e as bactérias totais, considerando-se que o edifício cumpre com as condições de referência para as bactérias se essa razão for inferior ou igual a 0,5.

- b) No caso dos fungos, o edifício poderá ser considerado conforme se se verificarem simultaneamente as duas condições seguintes:
 - (i) Ausência de crescimento visível de fungos em qualquer superfície;
 - (ii) Cumprimento das condições específicas de conformidade mediante análise da composição da amostra às espécies e misturas de espécies presentes e respetivas concentrações;

Contudo a portaria 353-A/2013, de 4 de dezembro, não ressalva os aspetos direcionados à perigosidade do agente biológico (bactérias) como a concentração obtida no ar interior, apenas refere que a concentração de bactérias viáveis (comensais, patogénicas oportunistas e patogénicas) encontradas nas colheitas ambientais deve ser inferior à concentração no exterior, acrescida de 350 UFC/m³. Não se tratando de legislação mais específica, abarca todos os compartimentos como iguais, o que na realidade não deve ser aplicável, pois cada compartimento deverá ter especificações específicas tendo em atenção a tipologia de ambiente. Relativamente aos fungos, a portaria 353-A/2013 estabeleceu neste documento legal, respetivamente no ponto 4.2 e tabela I.12 do mesmo, as condições específicas de conformidade de fungos, indicando quais as espécies mais patogénicas e menos patogénicas para as pessoas que permanecem no compartimento a ser estudado dependendo das espécies encontradas nas colheitas de ar interior comparativamente com a concentração.

Relativamente aos poluentes físico-químicos existem condições específicas, que devem estar presentes e as quais devem ser respeitadas aquando da avaliação da QAI. Os limiares de proteção para os poluentes físico-químicos a considerar são os previstos na Tabela II.3, conjugadas com a seguinte informação:

- a) As concentrações em µg/m³ e mg/m³ referem-se à temperatura de 20° C e à pressão de 1 atm (101,325kPa);
- b) Os limiares de proteção indicados dizem respeito a uma média de 8 horas;
- c) As margens de tolerância previstas são aplicáveis a edifícios existentes e edifícios novos sem sistemas mecânicos de ventilação;
- d) A análise de radão é obrigatória em edifícios construídos em zonas graníticas, nomeadamente nos distritos de Braga, Vila Real, Porto, Guarda, Viseu e Castelo Branco.

Tabela II.3: Limiares de proteção e margens de tolerância para os poluentes físico-químicos (Portaria n.º 353-A, 2013).

Poluentes	Unidade	Limiar de proteção	Margem de tolerância (MT) [%]
Partículas em suspensão (fração PM ₁₀)	[µg/m ³]	50	
Partículas em suspensão (fração PM _{2,5})	[µg/m ³]	25	100
Compostos Orgânicos Voláteis Totais (COV)	[µg/m ³]	600	100
Monóxido de carbono (CO)	[mg/m ³]	10	100
	[ppmv]	9	
Formaldeído (CH ₂ O)	[mg/m ³]	100	-
	[ppmv]	0,08	
Dióxido de carbono (CO ₂)	[mg/m ³]	2250	30
	[ppmv]	1250	
Radão	[Bq/m ³]	400	-

No geral, denota-se que os riscos biológicos, apesar das metodologias e dos padrões referenciais existentes para a exposição dos profissionais de diversas áreas a este risco, ainda existem algumas lacunas comparativamente à exposição aos riscos químicos.

II.3 Referências

- APA, Agência Portuguesa do Ambiente. (2017). Obtido 25 de Novembro de 2017, de URL:<<https://www.apambiente.pt/index.php?ref=16&subref=82&sub2ref=319&sub3ref=339>>.
- Barberán, A., Dunn, R. R., Reich, B. J., Pacifici, K., Laber, E. B., Menninger, H. L., Fierer, N. (2015). The ecology of microscopic life in household dust. *Proc. R. Soc. B*, 282 (1814), 20151139. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.1139>.
- Bernasconi, C., Rodolfi, M., Picco, A. m., Grisoli, P., Dacarro, C., & Rembges, D. (2010). Pyrogenic activity of air to characterize bioaerosol exposure in public buildings: a pilot study. *Letters in Applied Microbiology*, 50(6), 571–577. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02831.x>.
- Black, C. D. (2006). *Mould resistance of full scale wood frame wall assemblies*. (Tese de Mestrado). University of Waterloo, Canada. Obtido de URL:<<http://www.collectionscanada.gc.ca/obj/s4/f2/dsk3/OWTU/TC-OWTU-875.pdf>>.

- Decreto-lei n.º 118/2013.(2013). Assegurar e promover a melhoria do desempenho energético dos edifícios. *Diário da República* I.ª Série. N.º 159 (13-08-20), 4988-5005.
- Diretiva 2002/91/EU.(2002).Desempenho Energético dos Edifícios. *Jornal Oficial da União Europeia* (16-12-2002),L1/65-L1/71.
- Diretiva 2010/31/EU.(2010).Desempenho Energético dos Edifícios (reformulação).*Jornal Oficial da União Europeia* (18-06-10), L153/13-L153/35.
- Flannigan, B., Samson, R. A., & Miller, J. D. (2016). *Microorganisms in Home and Indoor Work Environments: diversity, health impacts, investigation and control*.CRC Press.
- Giuseppe, E. D. (2013). *Nearly Zero Energy Buildings and Proliferation of Microorganisms*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-02356-4_6
- Guerra, F. L., Cunha, E. G. da, Silva, A. C. S. B. da, & Knop, S. (2012). Análise das condições favoráveis à formação de bolor em edificação histórica de Pelotas, RS, Brasil. *Ambiente Construído*, 12(4), 7–23. <https://doi.org/10.1590/S1678-86212012000400002>.
- Hoskins, J. A. (2010). Health Effects Due to Indoor Air Pollution. Em *Survival and Sustainability* (pp. 665–676). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-95991-5_61.
- Jones, A. M., & Harrison, R. M. (2004). The effects of meteorological factors on atmospheric bioaerosol concentrations - a review. *Science of The Total Environment*, 326(1), 151–180. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2003.11.021>.
- Leung, M. H. Y., & Lee, P. K. H. (2016). The roles of the outdoors and occupants in contributing to a potential pan-microbiome of the built environment: a review. *Microbiome*, 4(1), 21. <https://doi.org/10.1186/s40168-016-0165-2>.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. (2016). *Microbiologia de Brock* (14ª ed.).(PDF). Porto Alegre: Artemed.
- Menezes, C., Pérez, A. L., & Lima, E. (2017). Cladosporium spp: morfologia, infecções e espécies patogênicas. *Acta Brasiliensis*, 1(1), 23–27. <https://doi.org/https://doi.org/10.22571/Actabra1120176>.
- Moon, H. J. (2005). *Assessing mould risks in buildings under uncertainty* (PhD Thesis). Georgia Institute of Technology.

- Mousavi, B., Hedayati, M., Hedayati, N., Ilkit, M., & Syedmousavi, S. (2016). Aspergillus species in indoor environments and their possible occupational and public health hazards. *Current Medical Mycology*, 2(1), 36–42. <https://doi.org/10.18869/acadpub.cmm.2.1.36>
- Nielsen, K. F. (2002). *Mould growth on building materials: secondary metabolites, mycotoxins and biomarkers*. (Tese de Doutoramento). Technical University of Denmark. Obtido de URL:<https://sbi.dk/Assets/Mould-growth-on-building-materials/2006-01-12_6153316360.pdf>.
- O.A.A, Ontario Association of Architects. (2003). Mould control practice guide. (PDF). Obtido de URL:<http://www.oaa.on.ca/images/docs/1305205581_E2_OAA_MPG_A-D.pdf>.
- Pinheiro, S. (2003). *Registro fonte: Impacto da colonização do fungo Cladosporium Sphaerospermum sobre a argamassa do concreto* (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória. Obtido de URL:<<http://livros01.livrosgratis.com.br/cp133901.pdf>>.
- Pinto, M., Freitas, V., & Viegas, J. (2007). Qualidade do ar interior em edifícios de habitação . Obtido de URL:<http://repositorio.ipv.pt/bitstream/10400.19/549/1/Engenharia%20e%20Vida_2007_MPinto.pdf>.
- Polizzi, V., Adams, A., De Saeger, S., Van Peteghem, C., Moretti, A., & De Kimpe, N. (2012). Influence of various growth parameters on fungal growth and volatile metabolite production by indoor molds. *The Science of the Total Environment*, 414, 277–286. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.10.035>.
- Portaria n.º353-A/2013.(2013).Regulamento do Desempenho energético dos edifícios de Comércio e Serviços. *Diário da República*, I.ª série.N.º 235 (04-12-2013),6644-(2)-6644(9).
- Rim, K.-T., & Lim, C.-H. (2014). Biologically hazardous agents at work and efforts to protect workers health: a review of recent reports. *Safety and Health at Work*, 5(2), 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.shaw.2014.03.006>.
- Robert A. Samson, & Olaf C.G. Adan (Eds.). (2011). *Fundamentals of mold growth in indoor environments and strategies for healthy living*. Wageningen Academic Publishers. <https://doi.org/10.3920/978-90-8686-722-6>.

- Samson, R. (2011). Ecology and general characteristics of indoor fungi. Em *Fundamentals of mold growth in indoor environments and strategies for healthy living* (pp. 101–116). Wageningen Academic Publishers, Wageningen. https://doi.org/10.3920/978-90-8686-722-6_5.
- Samson, R., & Frisvad, J. (2004). Penicillium subgenus Penicillium: new taxonomic schemes, mycotoxins and other extrolites. *Studies in Mycology*, 49, 1–260.
- Santos, J. (2010). *Avaliação da qualidade do ar interior em jardins-de-infância* (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto. Obtido de URL:<<https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/58949/1/000144993.pdf>>.
- Schubert, K., Groenewald, J. Z., Braun, U., Dijksterhuis, J., Starink, M., Hill, C. F., Crous, P. W. (2007). Biodiversity in the Cladosporium herbarum complex (Davidiellaceae, Capnodiales), with standardisation of methods for Cladosporium taxonomy and diagnostics. *Studies in Mycology*, 58, 105–156. <https://doi.org/10.3114/sim.2007.58.05>.
- Sedlbauer, K. (2001). *Prediction of mould fungus formation on the surface of and inside building components* (PhD Thesis). Fraunhofer Institute for Building Physics, Stuttgart University. Obtido de URL:<https://www.ibp.fraunhofer.de/content/dam/ibp/en/documents/ks_dissertation_etcm1021-30729.pdf>.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2012). *Microbiologia* (10^a ed.). Porto Alegre: Artmed.
- Viitanen, Hannu, Vinha, J., Salminen, K., Ojanen, T., Peuhkuri, R., Paaianen, L., & Lähdesmäki, K. (2010). Moisture and Bio-deterioration Risk of Building Materials and Structures. *Journal of Building Physics*, 33(3), 201–224. <https://doi.org/10.1177/1744259109343511>.
- WHO, World Health Organization. (2009). WHO guidelines for indoor air quality: dampness and mould.(PDF). WHO Regional Office for Europe. Obtido de URL:<<http://www.who.int/indoorair/publications/7989289041683/en/>>.
- Yang, S. Y., & Heinsohn, P. A. (2006). *Sampling and analysis of indoor microorganisms*.(PDF).John Wiley & Sons, Inc. Obtido de URL:<https://www.buecher.de/shop/umweltchemie/sampling-and-analysis-of-indoor-microorganisms-ebook-pdf/yang-chin-s--heinsohn-patricia-a-/products_products/detail/prod_id/37290420/>.

III. Análise da resistência de diferentes materiais de construção ao desenvolvimento de fungos

III.1 Resumo

O conhecimento das características dos materiais que constituem um edifício, das condições ambientais internas e dos mecanismos de deterioração a que estão sujeitos durante a sua vida útil (entre eles a suscetibilidade à biodeterioração), são de fundamental importância para a execução de estudos que visem a eficiência e a durabilidade das construções. Neste sentido, o presente trabalho foi efetuado com o principal objetivo de avaliar numa escala laboratorial a resistência de diferentes materiais de construção ao desenvolvimento fúngico. Adicionalmente, pretendeu-se identificar a espécie fúngica usada para a inoculação dos provetes de ensaio e avaliar o estado final de conservação dos materiais usados. Para tal, realizou-se um conjunto de testes laboratoriais utilizando diferentes materiais de construção, com aplicação de distintos sistemas de pintura tendo em conta as suas características variadas (substrato, natureza, proteção fúngica, entre outras). Estes provetes de ensaio foram posteriormente inoculados com uma espécie fúngica característica de ambientes internos. Os provetes de ensaio foram construídos a partir de uma estrutura de madeira extraída de uma parede de tabique de um edifício interior, tendo sido aplicadas distintas argamassas a cada provete, argamassa de cal composta por uma mistura de cal e areia (1:3) e argamassa bastarda com um traço de cimento:cal:areia na proporção de 1:3:12. Por fim, foram feitos dois provetes de gesso cartonado, um deles com gesso cartonado normal e o outro com gesso cartonado com características hidrófugas. Estes foram construídos por três camadas devidamente agrupadas do respetivo gesso. Os ensaios decorreram numa câmara climática em condições ambientais controladas de temperatura e humidade relativa. A investigação incidiu na avaliação quantitativa e qualitativa da população fúngica ao longo do período de amostragens definido (6 meses). Durante a análise qualitativa procedeu-se à avaliação dos substratos e sistemas de pintura aplicados nos provetes de ensaio. A identificação da espécie fúngica foi efetuada através de análises macroscópicas, microscópicas para estudo da sua morfologia entre outras características e através de testes bioquímicos. A caracterização do estado final de conservação dos provetes de ensaio foi fundamentada no ensaio de carbonatação com base na determinação do valor pH e na aspersão do indicador fenolftaleína *in situ*. Em simultâneo, procedeu-se à medição dos COV totais na câmara climática onde decorreram os testes. Os resultados obtidos revelaram que tanto na avaliação quantitativa como na qualitativa as contagens máximas de fungos foram registadas nos provetes de gesso cartonado em relação aos provetes de argamassa. As zonas de colheita condicionaram as contagens quantitativas de fungos, principalmente para os provetes de argamassa. Na análise da influência dos diferentes substratos que compunham

os quatro provetes de ensaio verificou-se que os substratos de gesso são menos resistentes à proliferação fúngica do que os provetes de argamassa. Os sistemas de pintura à base de cal apresentaram o desempenho mais desfavorável relativamente à inibição do crescimento fúngico, assim como os sistemas de pintura acrílicos aplicados nas placas de gesso cartonado. Os testes realizados para a identificação da espécie fúngica indicaram que talvez estivéssemos perante a espécie *Penicillium brevicompactum*. O ensaio de carbonatação segundo os dois processos mencionados revelou que os provetes não apresentam qualquer indicio de carbonatação, e por fim a medição de COV totais no interior da câmara climática revelou que não existe uma relação significativa entre os mesmos e o crescimento dos fungos.

III.2 Introdução

As estruturas e os ambientes de construção fornecem microclimas especializados e nichos ecológicos nos seus ecossistemas a uma escala espacial que leva ao crescimento e à proliferação de uma grande variedade de microrganismos fúngicos, sendo este fenómeno considerado como uma das patologias mais notórias no interior dos edifícios (Kumar & Verma, 2010). Apesar, das melhorias observadas ao nível da construção nos últimos anos, a incidência desta patologia continua a aumentar. As causas apontadas são relativas a problemas nas construções, tais como, o aumento da estanquidade do ar, devido à implementação inadequada de sistemas de ventilação e a aplicação de materiais de isolamento de baixa qualidade, aos quais estão associadas preocupações ao nível do desempenho energético dos edifícios (Adams et al., 2016; Sedlbauer, 2001).

O crescimento de fungos filamentosos, mais conhecidos por bolores em materiais de construção é um fenómeno complexo, que envolve uma combinação favorável de diversos fatores ambientais, tais como a temperatura, a presença de nutrientes e a humidade relativa do ar, sendo este um dos parâmetros que desempenha um papel primordial no seu desenvolvimento. Existem outros parâmetros que também influenciam o desenvolvimento dos fungos, embora de uma forma menos significativa como o oxigénio, o valor do pH, a luz, as interações bióticas e o tempo de exposição (Moon, 2005; Prussin & Marr, 2015).

Investigações recentes, demonstram que o desenvolvimento dos fungos depende também da bioreceptividade dos materiais. Esta propriedade dos materiais é variável e está relacionada com diversos fatores como, por exemplo, a rugosidade das superfícies, pela porosidade anterior à colonização microbiana e pela natureza mineralógica do material. Concluindo-se, que os materiais mais resistentes ao ataque dos microrganismos são os que apresentam menos matéria orgânica na sua composição, elevada dureza, superfícies polidas e baixa porosidade (Hoang, Kinney, Corsi, & Szaniszlo, 2010; Pinheiro, 2003).

Associado ao potencial bioreceptivo de um material temos o mecanismo de biodeterioração dos materiais de construção, decorrente da ação dos fungos, entre outros microrganismos. As

consequências resultantes deste processo são o efeito visual antiestético, ocasionado pela modificação da superfície do material, a ação dos produtos resultantes do metabolismo microbiano (ácidos orgânicos e inorgânicos, sais e formação de biofilmes), a libertação de gases (COV, entre outros), a penetração dos seus filamentos (como as hifas) na estrutura cristalina do material, que conduzem a alterações nas propriedades físico-químicas e mecânicas dos mesmos. A biodeterioração pode ser observada no betão, e noutros materiais de construção como a madeira, o metal, a pedra e os revestimentos de argamassas e tintas. Deste modo, podemos afirmar que a biodeterioração dos materiais de construção não ocorre de uma forma isolada, mas depende da interação das condições ambientais, da natureza do material utilizado e da comunidade microbiológica presente (Letícia & Brazolin, 2012; Pinheiro, 2003; Polizzi et al., 2012; Sanchez-Silva M. & Rosowsky David V., 2008; Sterflinger & Piñar, 2013).

Outro dos principais mecanismos de degradação dos materiais de construção civil e principalmente do betão é a carbonatação. Este fenómeno ocorre quando o dióxido de carbono (CO₂) atmosférico penetra na estrutura porosa do material por difusão, levando à ocorrência de uma série de reações físicas e químicas. Estas conduzem à formação de vários produtos de reação, entre eles o carbonato de cálcio (CaCO₃) (Simas, 2007). A atividade fúngica também contribui para o desencadear do processo de carbonatação, através da sua fixação na superfície ou nos espaços intersticiais da matriz de materiais como o betão (Cwalina, 2008). Os principais efeitos resultantes do processo de carbonatação sobretudo para o betão são a retração e a corrosão das armaduras nas estruturas de betão armado, devido entre outros fatores, à diminuição do pH da água dos poros (Kulakowski, 2002; Pinheiro, 2003).

As indústrias associadas à área da construção civil perante esta situação e querendo garantir a qualidade dos seus produtos, têm vindo a desenvolver aditivos antifúngicos que são frequentemente utilizados para prevenir, evitar e tratar o desenvolvimento fúngico (Horn, Jann, & Wilke, 2003; Sedlbauer, 2001). No entanto, os aditivos antifúngicos apresentam uma eficácia a curto prazo, pois ao serem adicionados em elevadas concentrações na composição química dos produtos mais usualmente utilizados neste setor, como por exemplo, as tintas e os vernizes, os microrganismos começam a desenvolver resistência aos mesmos (Letícia & Brazolin, 2012). Por outro lado, os potenciais problemas de saúde associados à sua elevada toxicidade, acabam também por condicionar a popularidade destes aditivos antifúngicos indicados para ambientes interiores. Desta forma, as estratégias que têm vindo a ser adotadas é a seleção de materiais naturalmente resistentes ao crescimento de fungos e a supressão das condições ambientais que podem desencadear o crescimento de uma determinada espécie fúngica (Rowan, Johnstone, McLean, Anderson, & Clarke, 1999).

O microbioma de ambientes internos em edifícios compreende um grande número de diferentes grupos taxonómicos de fungos. Segundo a literatura, existem na natureza cerca de 100 000 espécies de fungos, das quais 200 dessas espécies desenvolvem-se no interior de edifícios (Samson, 2011). Os géneros fúngicos mais comuns nestes ambientes são o *Cladosporium*, o

Penicillium e o *Aspergillus* (Leung & Lee, 2016). Estes fungos são caracterizados e identificados com base nas suas diversidades morfológicas e capacidades metabólicas durante os vários estágios do seu desenvolvimento e na descrição de características culturais e reprodutivas (Alcântara, Cunha, & Almeida, 2001). Desta forma, o principal objetivo deste trabalho é avaliar numa escala laboratorial a resistência de diferentes materiais de construção ao desenvolvimento fúngico. Adicionalmente, pretendeu-se avaliar o grau de carbonatação dos provetes de ensaio, bem como efetuar a identificação da espécie utilizada nos testes.

III.3 Material e Métodos

O desenvolvimento do trabalho experimental para atingir os objetivos definidos envolveu a colaboração de várias entidades, como a Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto (FEUP), o Departamento de Ambiente e de Civil da ESTGV e a empresa de tintas Robbialac, SA. A metodologia envolveu diferentes fases que tiveram início com a preparação dos provetes de ensaio, de seguida a preparação da suspensão de fungos e logo após, efetuaram-se 6 campanhas periódicas de registo fotográfico e quantificação da população de fungos e no final a avaliação final do grau de carbonatação dos provetes. Paralelamente, procedeu-se à identificação da espécie fúngica isolada, com base em análises macroscópicas e microscópicas às culturas, para além de um conjunto de testes bioquímicos. As tarefas necessárias à execução dos ensaios tais como, a preparação da câmara climática, a construção dos provetes, o registo fotográfico, a medição de parâmetros químicos (COV), as amostragens para a quantificação da população de fungos e o ensaio de carbonatação concretizaram-se nas instalações de um laboratório afeto ao Departamento de Civil da FEUP. As restantes tarefas associadas à área da microbiologia foram executadas na ESTGV, mais concretamente no Laboratório de Bioengenharia, associado ao Departamento de Ambiente.

É de salientar ainda que, parte da metodologia desenvolvida no âmbito deste trabalho já foi objeto de apresentação na CREPAT 2017 – Congresso da Reabilitação do Património, realizado na Universidade de Aveiro (Barreira et al., 2017).

III.3.1 Preparação dos provetes de ensaio

Neste trabalho desenvolveram-se quatro tipos de provetes de ensaios: argamassa – P1 e P2 e gesso – G1 e G2. A preparação dos provetes de ensaio de argamassa foi efetuada a partir duma parede interior de tabique pertencente a um edifício do centro histórico da cidade de Viseu. Nesse edifício, foi extraída uma amostra de parede, a partir da qual se construíram estes provetes. Apenas a estrutura de madeira do tabique foi aproveitada, tendo-se aplicado argamassas distintas a cada provete: argamassa de cal (R1) aplicada na construção da parede P1, com uma mistura de cal e areia (1:3), e argamassa bastarda (R2) aplicada na elaboração da

parede P2, com um traço de cimento:cal:areia na proporção de 1:3:12. A Figura III.1 mostra os respectivos provetes de ensaio, antes e após a aplicação da argamassa.

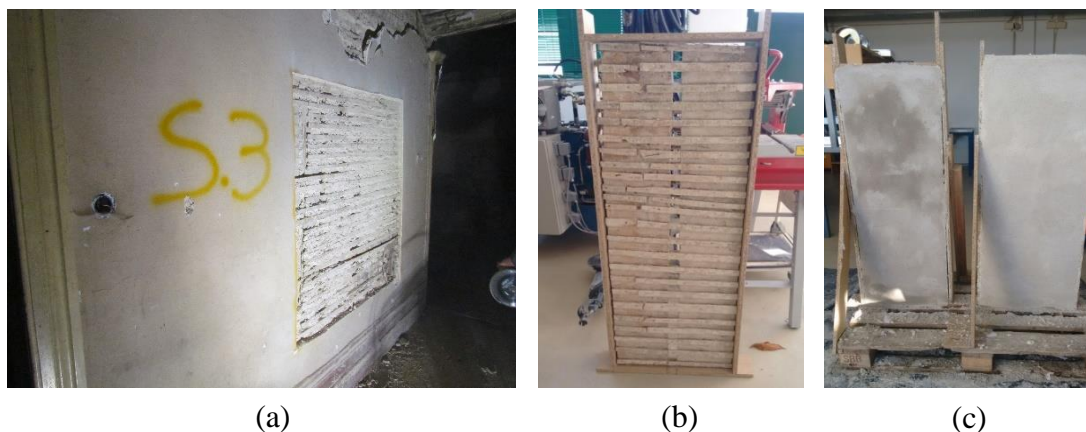


Figura III.1: Preparação dos provetes de ensaio: a) recolha *in-situ*; b) antes da aplicação da argamassa; c) após a aplicação das argamassas (P1 e P2).

De forma a abranger neste estudo outros materiais de construção foram feitos dois provetes de gesso cartonado, um deles com gesso cartonado normal (G1) e o outro com gesso cartonado com características hidrófugas (G2). Estes foram construídos por três camadas devidamente agrupadas do respetivo gesso.

Após, a construção dos 4 provetes de ensaio foram efetuados cortes verticais (V) e horizontais (H), nas duas faces de cada provete, de forma a limitar a área dos elementos constituintes de cada provete que representam diferentes sistemas de pintura, definidos como elementos principais. Pelo que, os cortes verticais definem os diferentes elementos principais e os cortes horizontais as respetivas réplicas (triplicado). Os cortes realizados nos provetes apresentavam 3cm de profundidade e 2mm de espessura, onde foram embutidas chapas metálicas apenas nas faces a inocular, tendo como função impedir a proliferação dos fungos pelas faces adjacentes. Nas faces dos provetes P1 e P2 foram criadas malhas ortogonais de 8x3 (V:H), ou seja, no total das duas faces temos 16 elementos como principais (16x3,V:H), o que perfaz um total de 48 elementos constituintes de ambas as faces e 96 englobando as réplicas das faces adjacentes de ambos os provetes. Nos provetes de gesso cartonado G1 e G2 as malhas criadas foram de 2x3 (V:H) por forma a dividir cada uma das faces em 2 elementos principais, ou seja, no total temos 4 elementos principais nos dois provetes (4x3,V:H). Sendo que no total temos 12 elementos constituintes das duas faces dos provetes e 24 juntando as réplicas das faces adjacentes de ambos os provetes de ensaio. A cada um dos elementos constituintes dos quatro provetes foi atribuído um código composto por um número sequencial (1 a 20), correspondente aos cortes verticais da malha (elementos principais), e uma letra (A,B,C), que corresponde às linhas dos cortes horizontais (réplicas de cada elemento). No total foram analisados 120 elementos. A Figura III.2 , apresenta o esquema utilizado para a identificação dos elementos constituintes de

III-Análise da resistência de diferentes materiais de construção ao desenvolvimento de fungos

um dos provetes de ensaio de argamassa (P1) e de gesso (G1), e respetivas dimensões (em metros).

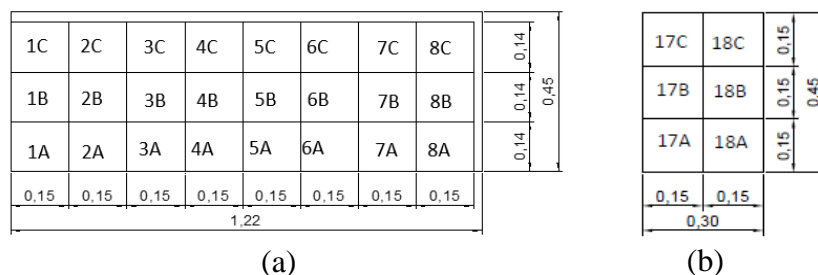


Figura III.2: Esquema utilizado para a identificação dos elementos dos provetes: (a) provete de argamassa P1; (b) provete de gesso G1 .

A aplicação dos sistemas de pintura nos provetes de ensaio foi executada de acordo com os procedimentos recomendados pelo fabricante de tintas Robbialac, SA. Todas as tintas selecionadas apresentam classe A+ na qualidade do ar interior e ao nível da sua composição físico-química, verifica-se a utilização de matérias-primas mais sustentáveis. A pintura dos provetes de ensaio foi efetuada em duas camadas, em primeiro a aplicação do primário e de seguida a aplicação do acabamento. Como primário foram selecionadas quatro tipos de tintas (A a C), e cinco tintas (E a I) foram testadas como acabamento, estando as suas características especificadas nas Tabelas III.1 e III.2, respetivamente.

Tabela III.1: Características das tintas com função de primário.

Designação	Tinta A	Tinta B	Tinta C	Tinta D
Aplicação	Primário			
Substrato	Cal	Reboco	Reboco	Reboco
Natureza	Acrílica	Silicato de potássio	Acrílica	Acrílica
pH	>12	>12	8-9	8-9
Proteção fúngica	Baixa	Baixa	Média	Média

Tabela III.2: Características das tintas com função de acabamento.

Designação	Tinta E	Tinta F	Tinta G	Tinta H	Tinta I
Aplicação	Acabamento liso				
Substrato	Cal	Reboco	Reboco	Reboco	Reboco
Natureza	Cal apagada	Silicato de potássio	Vinílica	Estireno - acrílica	Estireno - acrílica
pH	>12	>12	8-9	8-9	8-9
Proteção fúngica	Baixa	Média	Média	Média	Alta
Brilho	Mate	Mate	Acetinado	Mate	Acetinado
PVC (%)	50-80	50-80	20-30	70-80	25-35

III-Análise da resistência de diferentes materiais de construção ao desenvolvimento de fungos

Permeabilidade ao vapor de água	Alta	Alta	Média	Alta	Média
--	------	------	-------	------	-------

De forma a obter sistemas de pintura distintos realizaram-se combinações entre os primários e os acabamentos, que foram aplicados nas duas faces de cada provete. Nos provetes P1 e P2 foram aplicados oito sistemas de pintura distintos, enquanto nos provetes de gesso G1 e G2 testaram-se dois esquemas de pintura. A Tabela III.3 exibe as respetivas combinações entre as tintas primário e o acabamento utilizadas nos diferentes provetes de ensaio: os elementos de 1 a 8 são referentes ao provete P1; os elementos de 9 a 16 são alusivos ao provete P2; os elementos 17 e 18 relativos ao provete de gesso cartonado normal (G1) e os elementos 19 e 20 ao gesso cartonado hidrófugo (G2).

Tabela III.3: Combinação de primário e acabamento para cada elemento principal dos provetes de ensaio.

Provetes	Elementos	Substrato	Primário	Acabamento	Espessura de película seca de tinta, total (µm)
P1	1	Argamassa de cal (R1)	Tinta A	Tinta E	121
	2		Tinta B	Tinta F	112
	3		Tinta C	Tinta G	63
	4		Tinta C	Tinta H	64
	5		Tinta C	Tinta I	63
	6		Tinta D	Tinta G	63
	7		Tinta D	Tinta H	64
	8		Tinta D	Tinta I	63
P2	9	Argamassa bastarda (R2)	Tinta A	Tinta E	121
	10		Tinta B	Tinta F	112
	11		Tinta C	Tinta G	63
	12		Tinta C	Tinta H	64
	13		Tinta C	Tinta I	63
	14		Tinta D	Tinta G	63
	15		Tinta D	Tinta H	64
	16		Tinta D	Tinta I	63
G1	17	Gesso cartonado normal (G1)	Tinta D	Tinta H	64
	18	Gesso cartonado hidrófugo (G2)	Tinta D	Tinta I	63
G2	19	Gesso cartonado normal (G1)	Tinta D	Tinta H	64
	20	Gesso cartonado hidrófugo (G2)	Tinta D	Tinta I	63

Após a aplicação dos diferentes sistemas de pintura nos provetes de ensaio, e de acordo com as etapas da metodologia, os elementos constituintes (elementos principais e respetivas réplicas) de cada provete de ensaio foram ainda subdivididos em sete zonas, seis para a colheita das amostras necessárias à contagem dos fungos (com uma área de amostragem de 20 cm²) e uma zona central para o registo fotográfico. Estas divisões foram efetuadas, em ambas as faces dos provetes a inocular (designadas, face A e face B), sendo que a face B serviu de controlo, pelo

que não foi inoculada com a suspensão de fungos. Para os elementos constituintes dos respetivos provetes de ensaio, foram definidas designações para os elementos da face A - elemento 1, 2, 3, (...), enquanto os elementos correspondentes à face B são referidos como elemento 1_0, 2_0, 3_0, (...). A Figura III.3 apresenta um elemento de um provete com as marcações e o esquema com a ordem estabelecida para cada momento de amostragem definido.

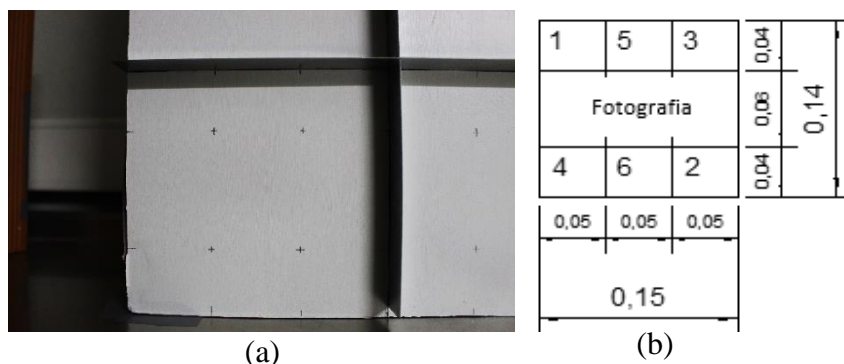


Figura III.3: Delimitação das zonas: a) elemento de um provete; b) esquema com indicação da ordem das recolhas.

Após a fase de preparação dos provetes, seguiu-se a preparação duma suspensão de fungos para a respetiva inoculação, de modo a garantir as condições de contaminação definidas para o ensaio.

III.3.2 Preparação da suspensão de fungos

Para concretizar o objetivo proposto no presente trabalho, foi necessário preparar uma suspensão contendo fungos para se proceder à inoculação dos provetes de ensaio. Para tal, desenvolveram-se as seguintes fases: amostragem e isolamento duma espécie de fungos comum no interior dos edifícios, crescimento e suspensão. A espécie de fungos escolhida foi recolhida no interior dum edifício de habitação, através do método da zaragatoa (contendo solução neutralizante), numa área de tamanho conhecido (quadrado de 10x10cm) (Abelho, 2013; Rosa, 2013). No Laboratório de Bioengenharia da ESTGV, procedeu-se à agitação das amostras durante 30 minutos, por forma a proceder-se à devida homogeneização do meio líquido e para a ressuspensão dos fungos presentes na zaragatoa. Posteriormente, foi feita a inoculação do meio sólido Sabouraud Chloramphenicol Agar (Bioakar) com 0,5 mL de amostra. As caixas de Petri foram incubadas a uma temperatura de 27° C, durante 7 dias numa incubadora (ISCO-FTD250), ou até ao aparecimento de colónias individualizadas. Estas condições de incubação foram utilizadas ao longo de todo o trabalho experimental. De seguida, procedeu-se ao isolamento das colónias individualizadas (Figura III.4), a partir das quais foi preparada a suspensão de fungos.



Figura III.4: Visualização de UFC de fungos presentes na amostra.

A preparação da suspensão de fungos para inoculação nos provetes de ensaio foi realizada com base na norma americana - (MIL-STD-810G, 2008) e segundo o método 508.6, dirigido a ensaios com fungos em diferentes tipos de materiais. A preparação desta suspensão fúngica teve início com a preparação de uma solução aquosa rica em nutrientes, tendo-se potenciado o crescimento das subculturas anteriormente obtidas recorrendo a sucessivos ciclos de inoculação, incubação e contagem das UFC (Unidades Formadoras de Colónias) presentes no meio líquido nutritivo, pelo método de sementeira por espalhamento. Este procedimento permitiu a obtenção da suspensão de esporos com a concentração final desejada de 10^6 UFC/mL considerado o mínimo desejável para este tipo de ensaios (Johansson, Wamming, Bok, & Edlund, 2013).

III.3.3 Desenvolvimento do ensaio

O desenvolvimento do ensaio propriamente dito englobou a incubação dos 4 provetes de ensaios em condições ambientais ideais, posteriormente a contagem periódica da população de fungos e por fim a avaliação do grau de carbonatação dos provetes.

Após a secagem das tintas, os provetes de ensaio inoculados (face A) e sem inoculação (face B) foram colocados em ambiente controlado, numa câmara climática com uma área de $1,92 \text{ m}^2$. Assim, definiram-se as condições de temperatura de 22°C e uma humidade relativa de 90% (MIL-STD-810G, 2008). O ensaio teve início no dia 7 de fevereiro de 2017 e prolongou-se por um período de 6 meses. A norma em causa exige, no início do ensaio a colocação de tiras de algodão próximas aos provetes de ensaio, por forma a se assegurar a validação das condições ambientais propícias ao desenvolvimento dos fungos no interior da câmara de ensaio (Figura III.5).



Figura III.5: Disposição dos provetes de ensaio e meios de controlo para validação das condições ambientais no interior da câmara climática.

Depois da colocação dos provetes de ensaio no interior da câmara climática e dos respetivos meios de controlo, efetuou-se a pulverização dos mesmos com a suspensão de fungos preparada anteriormente (*vide* ponto III.3.2), utilizando-se um borrifador estéril. Após, 5 dias de ensaio já era visível o desenvolvimento de fungos nos meios de controlo, pelo que as condições de ensaio foram validadas.

III.3.3.1 Avaliação do crescimento fúngico

A avaliação do desenvolvimento fúngico foi realizada segundo duas metodologias: (i) contagem do número de UFC pelo método da sementeira por espalhamento; (ii) avaliação qualitativa por inspeção visual e através de registo fotográfico. Para a contagem de UFC dos fungos foram definidos seis momentos de recolha de amostras, nomeadamente aos 14, 28, 56, 84, 112 e 140 dias, contados após a inoculação dos provetes. Adicionalmente, foi efetuada a mediação dos COV totais no interior da câmara de ensaio como forma indireta de avaliação do crescimento fúngico.

No que respeita à aplicação da metodologia de contagem das UFC pelo método da sementeira por espalhamento o procedimento é similar ao descrito anteriormente no ponto III.3.2. As colheitas de amostras nos provetes de ensaio foram realizadas no interior da câmara climática, recorrendo a zaragatoas. Antes da entrada na mesma do técnico, foram tomadas as devidas precauções de segurança desde a colocação de luvas, máscara e óculos. Em cada um dos seis momentos de amostragem foram recolhidas no total 120 amostras, correspondentes aos elementos constituintes das duas faces dos quatro provetes de ensaio e recorrendo ao esquema definido anteriormente (*vide* ponto III.3.1, Figura III.3). O esquema de amostragens definido previamente foi essencial, pois permitiu que não se efetuassem recolhas de amostras nas mesmas zonas ao longo do plano de trabalhos definido. No decorrer do trabalho experimental foi necessário proceder a diferentes diluições (10x, 50x, 100x, 1000x e 10 000x), para que desta

forma se cumprisse com a condição de se obter entre 20 a 200 UFC por caixa (Abelho, 2013; ASTM.D5465-93, 2004). Repetindo-se conseqüentemente o ciclo de inoculação, incubação e contagem das UFC. Posteriormente, os resultados médios das réplicas para o mesmo elemento foram expressos em número de UFC por centímetro quadrado (UFC/cm^2), de acordo com a área amostrada. Nas contagens por caixa em que não se cumpria com gama anteriormente referida, foram atribuídas designações específicas para as mesmas tais como, L.I (Limite Inferior) e L.S (Limite Superior) que correspondem respetivamente, às contagens inferiores a $50 \text{ UFC}/\text{cm}^2$ e superiores a $500 \text{ UFC}/\text{cm}^2$.

A inspeção visual e o registo fotográfico dos provetes de ensaio na câmara climática também foi fundamental para avaliar o desenvolvimento dos fungos. O registo fotográfico foi realizado nos mesmos momentos de realização das amostragens, definidos anteriormente. Devido às limitações de espaço da câmara climática, apenas se fotografaram as faces inoculadas (faces A) de cada um dos provetes P1 e P2. À exceção dos provetes de gesso cartonado G1 e G2 que eram retirados do interior da câmara climática para uma bancada no exterior, e fotografadas ambas as faces (face A e face B). Para além deste registo, também foi efetuado ao longo das amostragens a medição de COV totais na câmara climática. Em cada período de amostragem foram realizadas duas medições contínuas de COV totais, utilizando um equipamento composto por um conjunto de sensores que permitem a deteção de uma vasta gama de COV (Phocheck TIGER).

III.3.3.2 Avaliação da carbonatação

A avaliação da carbonatação envolveu dois testes: medição do pH e a adição de fenolftaleína *in-situ*. No que respeita à análise do pH procedeu-se à recolha de aproximadamente 50 g de amostra, de cada um dos elementos constituintes das faces inoculadas dos provetes em estudo, atingindo uma profundidade de aproximadamente 15 cm. No total foram recolhidas 60 amostras em pó/fragmentos. O pH foi medido numa suspensão usando uma razão de 1:2 (amostra: água destilada) e após agitação durante 2 h (Räsänen & Penttala, 2004). As medições de pH foram feitas por potenciometria utilizando um medidor portátil (Hach-HQ30D). Adicionalmente, a avaliação da carbonatação também foi feita através da aspersion do indicador ácido-base-fenolftaleína nas faces dos provetes de ensaio e nas zonas de amostragem utilizadas para a análise do pH (Lee, Kim, Lee, & Cho, 2012).

III.3.4 Identificação da espécie fúngica isolada

A caracterização da espécie fúngica isolada usada para a inoculação dos provetes de ensaio, realizou-se a partir da observação das características morfológicas macroscópicas e microscópicas das culturas, bem como pela realização de um conjunto de testes bioquímicos.

III.3.4.1 Análise das características morfológicas macroscópicas

O exame direto das culturas serviu para determinar as principais características macroscópicas das colônias como: a morfologia da colônia (por exemplo, filamentosa, irregular, entre outras), a elevação da colônia que consiste na descrição da vista lateral de uma colônia (por exemplo, achatada, elevada, entre outras), a margem/borda de uma colônia (por exemplo, inteira, ondulada, entre outras), o diâmetro da colônia (pequenas colônias são referidas como puntiformes), superfície da colônia (por exemplo, lisa, cintilante, entre outras), produção e cor dos conídeos (por exemplo, verde, azul, entre outras) e a cor do seu reverso (por exemplo, creme, castanho, entre outras) (Alum & Isaacs, 2016; Machado, 2006; Sinogas, Alho, & Brito, 2003).

III.3.4.2 Análise das características microscópicas

A identificação das características morfológicas das colônias também foi realizada recorrendo a um microscópio ótico composto (Novex Holland), a partir do qual foi possível a observação das principais estruturas morfológicas e reprodutoras dos fungos. Para esta observação foi aplicado o procedimento de preparação de culturas em câmara húmida. Resumidamente, este procedimento consiste em efetuar uma preparação a fresco da colônia, a qual é colocada sobre papel de filtro humedecido com água destilada e incubada durante 7 dias a uma temperatura de 27°C (Alcântara et al., 2001). Término o período de incubação, foi adicionada uma gota do indicador azul de metilo à preparação para observação ao microscópio.

III.3.4.3 Testes bioquímicos

Concretizando a identificação da espécie isolada foram realizados um conjunto de testes bioquímicos, no sentido de estudar o respetivo comportamento a diferentes temperaturas, diferentes pH, na presença de substâncias inibidoras, as preferências metabólicas ao nível da assimilação de diferentes fontes de carbono e azoto, bem como a atividade enzimática hidrolítica de uma variedade de substratos. Todos os testes realizados envolvem a avaliação do crescimento dos fungos, tal como descrito seguidamente.

- ◆ Influência da temperatura - A capacidade de crescimento dos fungos a 4°C, 37°C e 40°C, durante 14 dias foi testada em tubo de ensaio com meio sólido inclinado (Sabouraud Chloramphenicol Agar) (Bridge, 1985).

- ◆ Influência do pH - A capacidade de crescimento dos fungos a diferentes pH, respetivamente pH=2, pH=10 e pH=12 foi testada em tubo de ensaio com meio sólido inclinado (Sabouraud Chloramphenicol Agar). No teste a pH=2, o meio foi suplementado com ácido cítrico (10,5 g/L) e ajustado com ácido clorídrico (HCl 1M). Na preparação dos meios com pH=10 e pH=12, estes foram suplementados com glicina (3,75 g/L) e hidrogenofosfato de dipotássio (0,2g/L) e ajustados com hidróxido de sódio (NaOH 1M) (Bridge, 1985).
- ◆ Comportamento na presença de substâncias inibidoras - O crescimento de fungos na presença de substâncias inibidoras como azida de sódio (Naa), sulfato de cobre (CuS), sulfato de zinco (ZnS) e o cristal de violeta (Cvt) foram testados em tubo de ensaio com meio sólido inclinado (Sabouraud Chloramphenicol Agar) (Bridge, 1985). Foram adicionados ao meio de cultura, as substâncias inibidoras respetivamente: Naa=0,1 g/L; CuS = 0,5 g/L; ZnS=3 g/L e Cvt = 0,05 g/L e 0,01 g/L (Bridge, 1985).
- ◆ Preferências metabólicas de fontes de carbono e azoto – O crescimento de fungos em meios com diferentes fontes de carbono e azoto foi testado em meio sólido e líquido. As fontes de carbono testadas foram a lactose e o ácido cítrico, no que respeita às fontes de azoto utilizaram-se o nitrito de sódio e um controlo positivo – a glucose. As espécies fúngicas isoladas foram semeadas num meio de cultura líquido cuja composição foi: nitrato de sódio (2g/L); fosfato dipotássio (1g/L), sulfato de magnésio (0,5g/L); cloreto de potássio (0,5g/L); extrato de levedura (0,5g/L); sulfato ferro (0,01g/L). Paralelamente, o crescimento foi igualmente testado usando meio sólido, com uma concentração de agar de 20g/L (Bridge, 1985).
- ◆ Atividade enzimática hidrolítica - o crescimento dos fungos foi analisado usando diversos substratos tais como amido, gelatina e caseína. A hidrólise do amido serviu como fonte de carbono e foi testado em meio sólido (Borrego, Lavin, Perdomo, Gómez de Saravia, & Guiamet, 2012). Com o objetivo de determinar a capacidade dos fungos em excretar uma enzima hidrolítica extracelular capaz de degradar a gelatina (gelatinase), usou-se o meio sólido Nutrient Gelatin (Fluka) (Abrusci et al., 2005).O teste da hidrólise da caseína para avaliar a presença da caseínase capaz de degradar a caseína realizou-se em meio Milk Agar (Fluka) (Borrego et al., 2012).

III.3.5 Análise estatística

Durante a avaliação qualitativa dos fungos também foi realizada uma análise estatística através do cálculo no programa ANCAR das tipicidades, ou seja, foram avaliadas as características mais importantes do sistema de pintura aplicado nos provetes de ensaio. Para tal, foram

selecionadas um conjunto de características relativas às tintas primárias e de acabamento, tais como substrato, natureza, pH, proteção fúngica, brilho, PVC e permeabilidade ao vapor de água (*vide* ponto III.3.1, Tabelas III.1 e III.2) e a variável referente às contagens em UFC/cm² relativo aos elementos principais que constituem os quatro provetes de ensaio. Os 20 elementos principais constituintes dos provetes (m células) foram divididos em quatro matrizes resultantes da divisão por classes do número de UFC/cm², respetivamente de 0 a 100, 100 a 1000, 1000 a 10000 e >10000 UFC/cm² (*vide* Anexo A). Em cada célula (elementos principais), observaram-se n atributos/características referentes ao sistema de pintura, ou seja, as características das tintas primárias e de acabamento foram traduzidas para códigos binários, ternários e quaternários. A célula j (j=1,2,...,m) ficou caracterizada por um conjunto dos n vetores constituindo a matriz n x m de dados, D. A tipicidade ti (Equação.1) da característica i definiu-se como o módulo do vetor – linha de ordem i na matriz produto P=DxD*, onde D* é a transposta de D (Godinho & Simões, 1994). Se for pij o elemento geral de P (i,j=1,2,...,n), logo:

$$ti = \frac{1}{m} \sqrt{\sum_{j=i}^n pij^2} \quad (1)$$

III.4 Resultados e discussão

III.4.1 Avaliação quantitativa do crescimento da população fúngica

A evolução do crescimento da população fúngica foi acompanhada pela contagem das UFC/cm², num período de 5 meses. As Tabelas III.4a e III.4b apresentam a variação do número de colónias fúngicas, para o provete P1, ao longo dos seis momentos de amostragem. O perfil evolutivo do crescimento da população é muito variável mediante o elemento e a face em estudo, não se detetando um padrão no crescimento. Aos 14 dias de ensaio (primeira recolha), dos elementos que compõe as faces A e B do provete P1, apenas o elemento 1 e o elemento 7 apresentavam colónias fúngicas. Na segunda recolha (aos 28 dias, do início do ensaio) em ambas as faces (A e B) do provete, houve um aumento no número de elementos com presença fúngica, totalizando-se onze elementos afetados pela contaminação. Destes elementos, o que teve maior destaque foi o elemento 1 da face B, por ter sido detetado um maior número de colónias fúngicas (73 UFC/cm²). A partir dos 56 dias de ensaio (terceira recolha), todos os elementos apresentavam desenvolvimento fúngico, salientando-se cinco deles com uma contaminação superior a 50 UFC/cm² (1, 3, 7, 1_0 e 3_0). Destes cinco elementos, o elemento 1 distingue-se dos restantes, com as contagens fúngicas mais elevadas, em ambas as faces do provete. Na quarta recolha de fungos (aos 84 dias), obtiveram-se os valores máximos de UFC em ambas as faces do provete, sendo que o elemento 1 é o que se destaca com os valores mais elevados de contaminação. Globalmente, constata-se uma diminuição significativa da quarta

para a quinta recolha principalmente nos elementos com maior contaminação. Por fim, tal como o esperado observa-se que das duas faces do provete P1, a que apresenta um maior grau de contaminação é a face A, correspondente à face inoculada. Em ambas as situações os elementos posicionados no topo do provete (1 e 1_0) apresentaram o maior número de UFC, e um comportamento ao longo do tempo semelhante. De um modo geral, o crescimento ocorrido nestes elementos é 10x maior comparativamente aos restantes elementos. Por outro lado, os elementos posicionados no fundo do provete registam os valores de UFC mais reduzidos. Pelo que leva a deduzir que de algum modo a posição do provete na câmara pode ter influenciado o desenvolvimento fúngico. O favorecimento do crescimento que aparentemente ocorre no topo pode ser devido à maior circulação de ar que poderá uniformizar os valores de temperatura e humidade.

Tabela III.4a: Evolução do número de UFC/cm², para o provete P1- face A.

Tempo (dias, após inoculação)		População fúngica (UFC/cm ²)					
		14	28	56	84	112	140
Elementos	1	L.I	L.I	212	10917	6063	1413
	2	0	L.I	L.I	108	37	106
	3	0	0	185	L.I	11	52
	4	0	L.I	L.I	L.I	14	188
	5	0	L.I	L.I	L.I	16	121
	6	0	L.I	L.I	L.I	14	168
	7	L.I	L.I	50	312	68	49
	8	0	0	L.I	46	34	46

L.I – Valor menor que 50 UFC/cm²; Cor amarelo - ausência de crescimento (nulo);
 Cor vermelho - presença fúngica fora do limite de contagem (UFC/cm²); Cor verde - presença fúngica (UFC/cm²).

Tabela III.4b: Evolução do número de UFC/cm², para o provete P1- face B.

Tempo (dias, após inoculação)		População fúngica (UFC/cm ²)					
		14	28	56	84	112	140
Elementos	1_0	0	73	345	3996	158	333
	2_0	0	0	L.I	L.I	36	31
	3_0	0	L.I	53	475	29	53
	4_0	0	0	L.I	L.I	20	15
	5_0	0	L.I	L.I	L.I	12	32
	6_0	0	L.I	L.I	L.I	29	78
	7_0	0	0	L.I	L.I	78	L.I
	8_0	0	L.I	L.I	L.I	L.I	10

L.I – Valor menor que 50 UFC/cm²; Cor amarelo - ausência de crescimento (nulo);
 Cor vermelho - presença fúngica fora do limite de contagem (UFC/cm²); Cor verde - presença fúngica (UFC/cm²).

III-Análise da resistência de diferentes materiais de construção ao desenvolvimento de fungos

As Tabelas (III.5a e III.5b) são relativas ao provete P2. Globalmente, a face A regista uma tendência de crescimento da população até ao dia 84 seguindo-se um decréscimo. Contrariamente a face B demonstra uma tendência de crescimento em todo o período de estudo. Mais concretamente, é possível averiguar-se que na primeira recolha (aos 14 dias de ensaio) em ambas as faces verificou-se o crescimento das primeiras colónias de fungos no total de 8 elementos. Os resultados relativos à segunda recolha (aos 28 dias), demonstram um desenvolvimento fúngico na totalidade dos elementos que compõe a face A, destacando-se o elemento 16 (63 UFC/cm²). Na face B, a maioria dos seus elementos também revelam a presença de colónias fúngicas, sendo o elemento 9 o que apresenta o maior valor (243 UFC/cm²). Verifica-se que a maioria dos elementos da face A, deste provete (P2) apresentam o seu valor máximo aos 84 dias de ensaio (quarta recolha), com exceção do elemento 15 que apresenta o seu máximo na última recolha (140 dias). Tal como referido acima, posteriormente regista-se, uma diminuição, tendência semelhante à observada para a maioria dos elementos do provete P1. Na face B a maioria dos seus elementos atinge o valor máximo de colónias fúngicas na última recolha (140 dias), exceto os elementos 10 e 16, em que o seu valor máximo de UFC é contabilizado aos 84 dias de ensaio (> 130 UFC/cm²). Das duas faces do provete P2, a face que apresenta um maior grau de contaminação é a face A. De modo semelhante ao observado no provete P1, o elemento que apresentou maior número de UFC, foi o elemento 9 (face A) e 9_0 (face B) localizado no topo do provete, evidenciando a provável influência da posição do provete na câmara sobre o desenvolvimento fúngico. A ordem de grandeza do crescimento registado nestes elementos é cerca de 100x maior comparativamente aos restantes elementos.

Tabela III.5a: Evolução do número de UFC/cm², para o provete P2- face A.

População fúngica (UFC/cm ²)		Tempo (dias, após inoculação)					
		14	28	56	84	112	140
Elementos	9	L.I	L.I	L.S	16781	15167	6415
	10	0	L.I	L.I	133	41	39
	11	L.I	L.I	L.I	85	20	42
	12	0	L.I	L.I	138	35	128
	13	0	L.I	L.I	110	25	25
	14	L.I	L.I	L.I	125	29	32
	15	0	L.I	L.I	L.I	18	46
	16	L.I	63	L.I	160	68	32

L.I – Valor menor que 50 UFC/cm²; Cor amarelo - ausência de crescimento (nulo);

Cor vermelho - presença fúngica fora do limite de contagem (UFC/cm²); Cor verde - presença fúngica (UFC/cm²).

Tabela III.5b: Evolução do número de UFC/cm², para o provete P2- face B.

População fúngica (UFC/cm ²)		Tempo (dias, após inoculação)					
		14	28	56	84	112	140
Elementos	9_0	L.I	243	230	2575	3425	3665
	10_0	0	0	0	58	20	41
	11_0	0	0	0	L.I	26	87
	12_0	L.I	L.I	L.I	L.I	33	53
	13_0	0	0	L.I	L.I	L.I	42
	14_0	L.I	L.I	L.I	L.I	14	101
	15_0	L.I	L.I	L.I	L.I	13	62
	16_0	0	L.I	L.I	45	11	26

L.I – Valor menor que 50 UFC/cm²; Cor amarelo - ausência de crescimento (nulo);

Cor vermelho - presença fúngica fora do limite de contagem (UFC/cm²); Cor verde - presença fúngica (UFC/cm²).

De acordo com as contagens obtidas (Tabelas III.6a e III.6b) relativas ao provete de gesso cartonado normal (G1) observa-se um perfil semelhante em ambas as faces, com um crescimento de fungos contínuo ao longo do período de ensaio. Em ambas as faces apenas se registou a presença de fungos a partir dos 28 dias de ensaio (segunda recolha). Constata-se que a partir da quarta recolha (aos 84 dias), os valores das contagens fúngicas apresentam um crescimento exponencial, atingindo valores finais superiores a 58×10^3 UFC/cm². Tal como o observado para o P1 e P2, o registo do maior número de UFC/cm² é superior nos elementos do topo do provete, mas a diferença observada é menor que nos casos anteriores.

Tabela III.6a: Evolução do número de UFC/cm², para o provete G1- face A.

População fúngica (UFC/cm ²)		Tempo (dias, após inoculação)					
		14	28	56	84	112	140
Elementos	17	0	L.I	L.I	L.S	100542	441875
	18	0	L.I	L.I	165	18275	58375

L.I - Valor menor que 50 UFC/cm²; L.S - Valor maior que 500 UFC/cm²; Cor amarelo - ausência de crescimento (nulo); Cor vermelho - presença fúngica fora do limite de contagem (UFC/cm²); Cor verde - presença fúngica (UFC/cm²).

Tabela III.6b: Evolução do número de UFC/cm², para o provete G1- face B.

População fúngica (UFC/cm ²)		Tempo (dias, após inoculação)					
		14	28	56	84	112	140
Elementos	17_0	0	0	0	473	58479	236875
	18_0	0	0	L.I	440	62438	174375

L.I - Valor menor que 50 UFC/cm²; Cor amarelo - ausência de crescimento (nulo);
 Cor vermelho- presença fúngica fora do limite de contagem (UFC/cm²) ; Cor verde - presença fúngica (UFC/cm²).

As Tabelas III.7a e III.7b são alusivas às contagens de UFC/cm² do provete de gesso cartonado hidrófugo (G2), denota-se uma tendência evolutiva crescente semelhante ao provete G1, ocorrendo pequenas diferenças ao longo dos diferentes dias de amostragem. Evidencia-se que em 2 elementos houve o registo da presença logo no primeiro momento de amostragem, e que o maior número de UFC foi registado para o elemento 20_0 correspondente à face não inoculada e localizado na parte inferior do provete. Os valores finais de UFC/cm² variaram na ordem de 10⁶ a 10⁷.

Tabela III.7a: Evolução do número de UFC/cm², para o provete G2- face A.

População fúngica (UFC/cm ²)		Tempo (dias, após inoculação)					
		14	28	56	84	112	140
Elementos	19	0	L.I	58	L.S	308958	751875
	20	L.I	L.I	455	13250	181458	211823

L.I - Valor menor que 50 UFC/cm²; L.S - Valor maior que 500 UFC/cm²; Cor amarelo - ausência de crescimento (nulo); Cor vermelho- presença fúngica fora do limite de contagem (UFC/cm²); Cor verde - presença fúngica (UFC/cm²).

Tabela III.7b: Evolução do número de UFC/cm², para o provete G2- face B.

População fúngica (UFC/cm ²)		Tempo (dias, após contaminação)					
		14	28	56	84	112	140
Elementos	19_0	0	L.I	L.S	L.S	203229	734896
	20_0	L.I	L.I	L.I	L.S	173958	1279375

L.I - Valor menor que 50 UFC/cm²; L.S - Valor maior que 500 UFC/cm²; Cor amarelo - ausência de crescimento (nulo); Cor vermelho- presença fúngica fora do limite de contagem (UFC/cm²); Cor verde - presença fúngica (UFC/cm²).

De acordo, com os resultados das contagens obtidos para os provetes P1 e P2 denota-se que os elementos 1 e 9, respetivamente apresentam os valores mais elevados de UFC/cm², ao longo do período de amostragem, indicando que estes elementos apresentam as melhores condições para o desenvolvimento da população em estudo. As zonas dos elementos definidas para a realização das recolhas nos respetivos períodos de amostragem, podem ter condicionado os resultados obtidos, sobretudo para os provetes de ensaio P1 e P2, justificando a diminuição no número de colónias de fungos da quarta para a quinta amostragem ocorrida em alguns elementos. As contagens máximas de fungos foram registadas nos provetes de gesso cartonado (G1 e G2), em relação aos provetes de argamassa P1 e P2. E por sua vez, o provete G2, mais especificamente o elemento 20_0 apresentou o valor máximo de UFC/cm². Os resultados apontam para a influência da natureza do substrato e das características dos sistemas de pintura aplicados sobre o ciclo de vida dos fungos. Bem como a influência de fatores inerentes à realização deste ensaio, tais como, a posição do provete no interior da câmara climática, as dimensões dos provetes, a inoculação dos provetes e o sistema de ventilação da câmara. Estes de alguma forma influenciaram a ocorrência de zonas preferenciais de contaminação da câmara e a proliferação/desenvolvimento dos esporos fúngicos no seu interior. Analisando o ciclo de vida dos fungos, pode-se concluir que a fase de adaptação dos fungos às condições do meio demorou entre 14 a 28 dias, confirmando-se os 21 dias de referência necessários para o crescimento (Ndagijimana et al., 2008). A fase exponencial de crescimento para a maioria dos elementos ocorreu após os 84 dias. As fases seguintes do ciclo de vida dos fungos, estacionária e de declínio apenas foram registadas para os provetes de argamassa, visto que para os provetes de gesso o crescimento manteve-se até à última amostragem. Reforçando a maior influência dos materiais de construção dos provetes em detrimento do ambiente interior de câmara climática.

III.4.2 Avaliação qualitativa do crescimento fúngico

A avaliação qualitativa do crescimento dos fungos nos provetes de ensaio fez-se por inspeção visual e recorrendo ao registo fotográfico. Constatou-se que em algumas situações a avaliação quantitativa indicava a presença de fungos, facto que não era reproduzível na inspeção visual, visto os fungos se encontrarem numa fase de crescimento não observável a olho nú .

No provete P1 a contaminação fúngica foi visível, nas três réplicas do elemento 1 (1A, 1B, 1C) pertencentes à face A, a partir dos 56 dias após a inoculação (Figura III.6a). Na Figura III.6b está patente o aspeto visual fotográfico observado aos 140 dias de ensaio. As zonas onde se observou a presença de fungos encontram-se destacadas, relativamente a outras manchas observadas associadas a sujidade e poeiras, decorrentes do transporte dos provetes para o interior da câmara de ensaio. Denota-se um padrão de distribuição do crescimento localizado nas zonas periféricas.

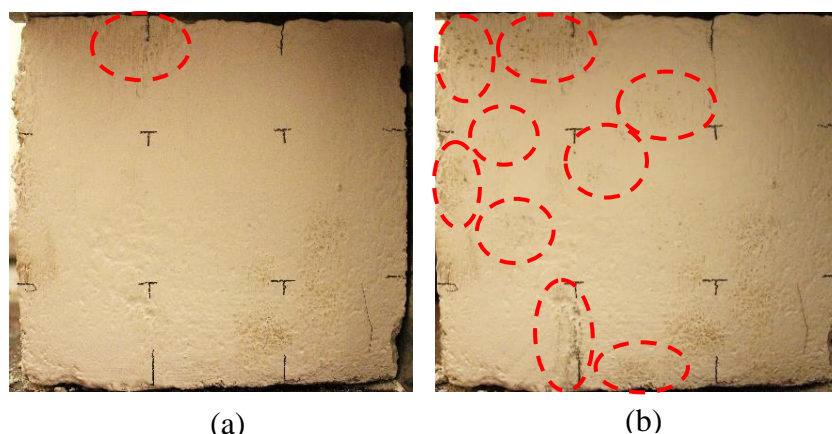


Figura III.6: Registo fotográfico da réplica 1A, do elemento 1, provete P1 : (a) aos 56 dias; (b) aos 140 dias. Tracejado indica manchas de início de crescimento fúngico observado.

Para os restantes elementos constituintes do provete P1 (de 2 a 8) não foram detetados visualmente, quaisquer indícios de crescimento fúngico, pelo que o valor máximo registado de 188 UFC/cm^2 (*vide* ponto III.4.1, Tabela III.4a) não é visível a olho nú. Contudo valores superiores a 212 UFC/cm^2 já se visualizam.

A evolução qualitativa do crescimento no provete P2 mostrou tendência semelhante ao provete P1. A presença fúngica foi detetada com maior relevância num dos seus elementos constituintes, neste caso no elemento 9, contrastando com os restantes elementos. Neste elemento a primeira manifestação de fungos ocorreu na sua réplica 9C, após 56 dias da inoculação dos provetes, tal como observado na Figura III.7a. Na Figura III.7b denota-se o aspeto deste elemento no final do período de ensaio, bem como a distribuição do seu crescimento fúngico na zona periférica do provete.

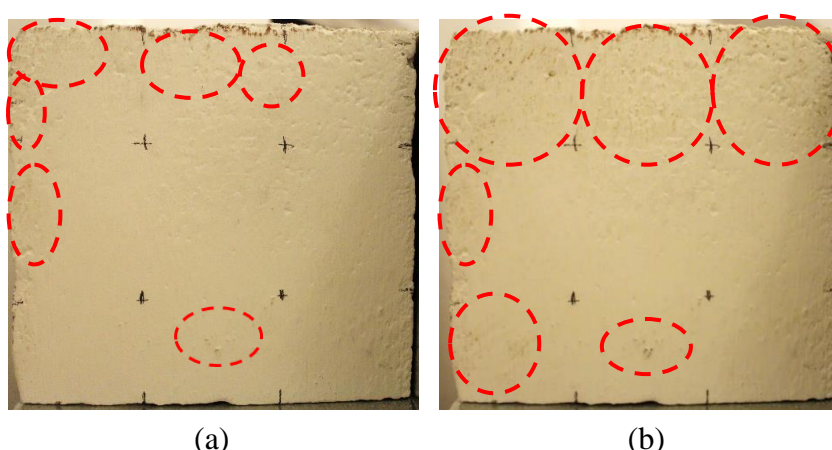


Figura III.7: Registo fotográfico da réplica 9C, do elemento 9, provete P2 : (a) aos 56 dias; (b) aos 140 dias. Tracejado indica manchas de início de crescimento fúngico observado.

Nos provetes de gesso cartonado normal (G1), as primeiras manifestações de crescimento fúngico ocorreram no mesmo momento que em P1 e P2, ou seja, a partir dos 56 dias. Este crescimento foi verificado em ambas nas réplicas “A” dos seus elementos constituintes, 17A e 18A, sendo visível através das Figuras III.8 e III.9, respetivamente para os 56 e 140 dias de ensaio (último registo fotográfico).

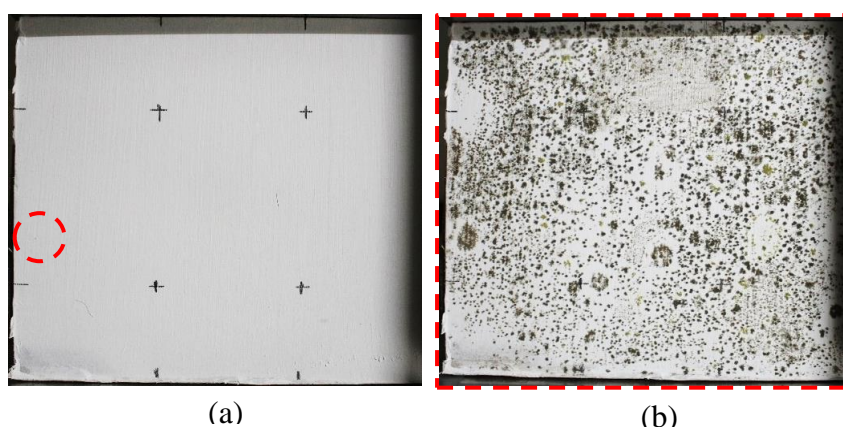


Figura III.8: Registo fotográfico da réplica 17A, do elemento 17, provete G1: (a) aos 56 dias; (b) aos 140 dias. Tracejado indica manchas de início de crescimento fúngico observado

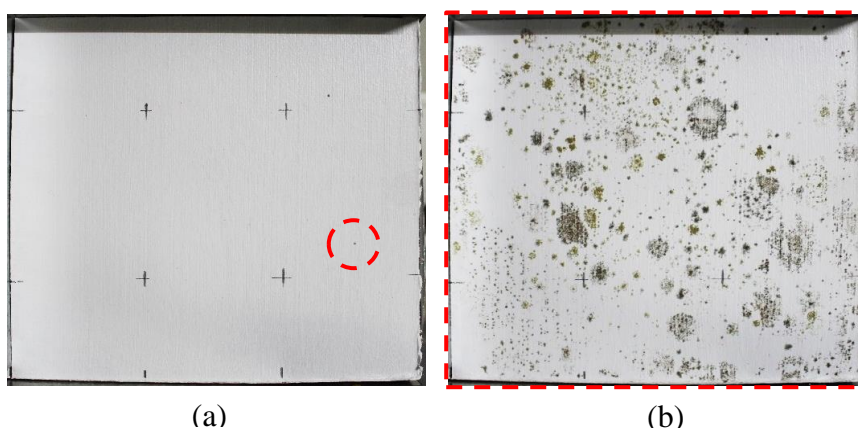


Figura III.9: Registo fotográfico da réplica 18A, do elemento 18, provete G1: (a) aos 56 dias; (b) aos 140 dias. Tracejado indica manchas de início de crescimento fúngico observado .

Nos provetes de gesso cartonado hidrófugo (G2), as primeiras manifestações de crescimento fúngico ocorreram em momentos distintos relativamente aos restantes provetes. Este desenvolvimento foi denotado em ambas as réplicas “A” dos seus elementos constituintes, 19A e 20A, com se pode verificar segundo as Figuras III.10 e III.11, respetivamente alusivas para os 28, 56 e 140 dias de ensaio. Observaram-se fungos aos 28 dias na superfície de uma das réplicas do elemento 19, mais propriamente na réplica 19A, coincidente com o valor registado

na análise quantitativa para o mesmo período de amostragem, denotando-se tal concordância apenas neste caso. Seguidamente, aos 56 dias de ensaio numa das réplicas pertencentes ao elemento 20, na réplica 20A, identificaram-se pela primeira vez vestígios do crescimento fúngico.

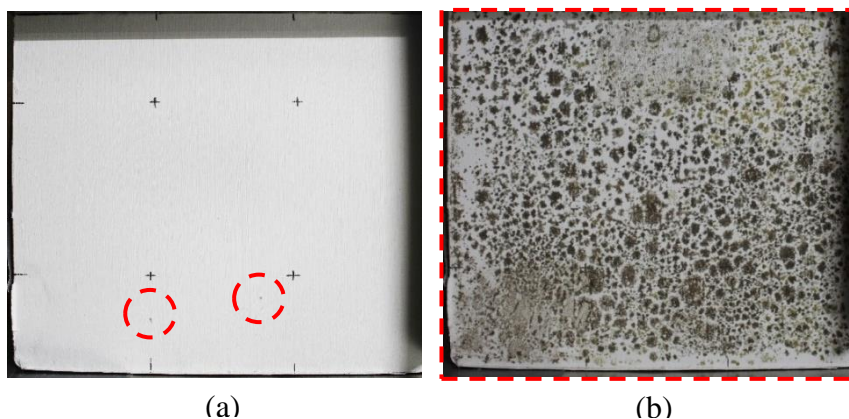


Figura III.10: Registo fotográfico da réplica 19A, do elemento 19, provete G2 : (a) aos 28 dias; (b) aos 140 dias. Tracejado indica manchas de início de crescimento fúngico observado .

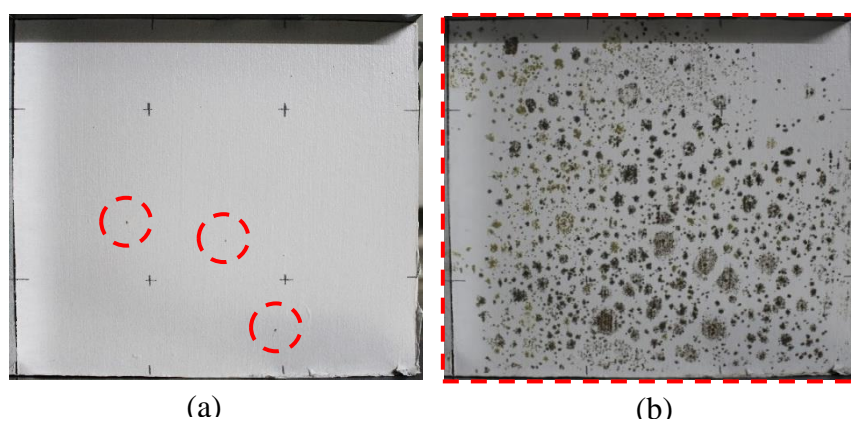


Figura III.11: Registo fotográfico da réplica 20A, do elemento 20, provete G2 : (a) aos 56 dias; (b) aos 140 dias. Tracejado indica manchas de início de crescimento fúngico observado .

De acordo com a observação do registo fotográfico para os elementos 19 e 20, do provete G2, denota-se que o elemento 19 é o que apresenta um crescimento fúngico mais acentuado. Em ambas as situações a distribuição do crescimento é uniforme. Desta análise qualitativa dos fungos foi possível validar os resultados obtidos nas contagens de UFC/cm² para os provetes em estudo. Nos provetes de argamassa P1 e P2 constatou-se que os elementos 1 e 9, respetivamente, tanto visualmente como nas contagens são os que se destacam com um maior desenvolvimento fúngico. Assim como, nos provetes de gesso cartonado G1 e G2, os elementos 17 e o 19 de cada provete, salientam-se dos restantes elementos por apresentarem uma maior contaminação fúngica.

Perante a análise das contagens de UFC/cm², principalmente para os provetes P1 e P2 tinha-se constatado que as zonas de colheita, poderiam ter condicionado os resultados obtidos. Este facto, pode ser confirmado com o registo fotográfico pois constata-se que a proliferação fúngica ocorreu mais ao nível das extremidades e na zona central dos seus elementos. Contrariamente, ao que se observou nos elementos dos provetes de gesso cartonado G1 e G2, tendo ocorrido a propagação por toda a superfície do elemento. Estas diferenças na distribuição podem estar relacionadas com as características do substrato e/ou conjugação de tintas aplicadas sobre o mesmo, bem como com a existência de rugosidades na superfície. As rugosidades predominantes nos provetes de gesso cartonado (G1 e G2) são zonas preferenciais de crescimento devido à acumulação de humidade e nutrientes necessários para o respetivo metabolismo dos fungos.

III.4.3 Influência dos diferentes substratos no crescimento fúngico

Os diferentes substratos constituintes dos provetes foram a argamassa de cal (R1) aplicada na construção da parede P1, com uma mistura de cal e areia (1:3), e argamassa bastarda (R2) aplicada na elaboração da parede P2, com um traço de cimento:cal:areia (1:3:12). Por fim, foram ainda construídos dois provetes com um substrato à base de gesso cartonado normal (G1) e outro com gesso cartonado hidrófugo (G2).

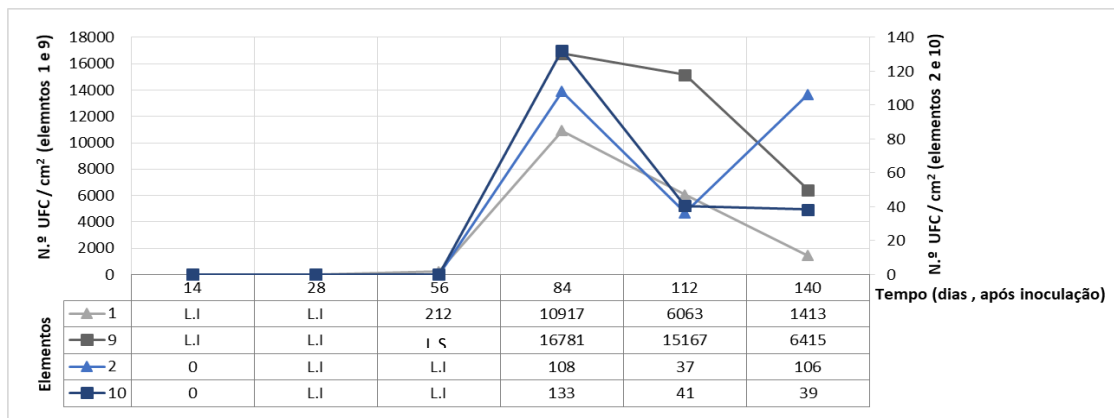
No sentido de analisar a influência do substrato formaram-se grupos de elementos (apenas os que constituem as faces A dos provetes) com o mesmo sistema de pintura (*vide* ponto III.3.1, Tabela III.3), diferindo apenas no substrato. Desta forma elaboraram-se 10 grupos que definem os diferentes sistemas de pintura usados, conjugando as tintas primário e de acabamento, mais propriamente 8 grupos para os substratos de argamassa de cal (R1) e argamassa bastarda (R2) e 2 grupos para os substratos de gesso normal (G1) e gesso hidrófugo (G2). Nesta avaliação consideraram-se os valores máximos de UFC/cm² obtidos independente do momento de recolha como sendo indicativos do substrato com menor resistência ao desenvolvimento de fungos.

Para analisar a influência do substrato de argamassa (R1 e R2), fez-se a análise dos elementos combinados tendo igual sistema de pintura entre si: 1+9 (tinta primário A e tinta acabamento E), 2+10 (tinta primário B e tinta acabamento F), 3+11 (tinta primário C e tinta acabamento G), 4+12 (tinta primário C e tinta acabamento H), 5+13 (tinta primário C e tinta acabamento I), 6+14 (tinta primária D e tinta acabamento G), 7+15 (tinta primário D e tinta acabamento H) e por fim conjunto de elementos 8+16 (tinta primário D e tinta acabamento I).

Segundo a análise do Gráfico III.1, verificou-se que os elementos 9 e 10 compostos provenientes do provete P2 constituído pelo substrato de argamassa bastarda (R2), apresentam um número de colónias fúngicas superior aos seus elementos combinados, respetivamente,

III-Análise da resistência de diferentes materiais de construção ao desenvolvimento de fungos

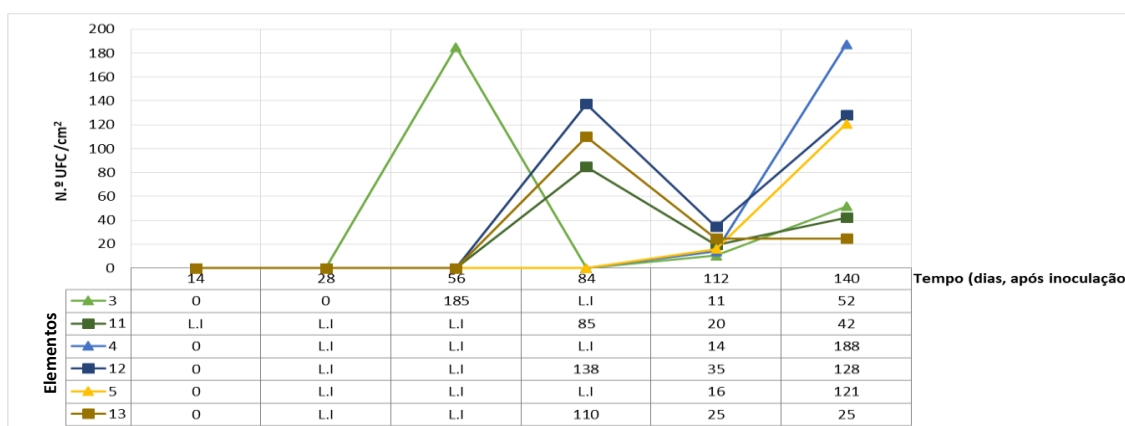
elementos 1 e 2 do provete P1 constituídos pelo substrato de argamassa de cal (R1). Destaca-se igualmente o perfil semelhante entre os elementos combinados com equivalente sistema de pintura.



L.I - Valor menor que 50 UFC/cm²; L.S - Valor maior que 500 UFC/cm².

Gráfico III.1: Evolução do crescimento fúngico perante os substratos R1 e R2, para os conjuntos de elementos: 1+9 e 2+10.

De acordo, com a observação do Gráfico III.2 os elementos 3, 4 e 5 que apresentam na sua constituição o substrato argamassa de cal (R1), revelaram um maior desenvolvimento de UFC/cm², comparativamente aos seus elementos combinados 11, 12 e 13 de argamassa bastarda (R2). Sendo que na última amostragem o elemento 4 destaca-se relativamente aos restantes elementos de argamassa de cal (R1), pois apresenta um crescimento fúngico mais significativo (188 UFC/cm²). Este grupo apresenta resultado oposto ao grupo anterior em relação ao substrato que promove um maior crescimento fúngico. Ao nível do perfil evolutivo apenas os elementos provenientes do mesmo provete, ou seja, substrato – R2 são os que apresentam tendência semelhante. Facto que indica a possível influência do substrato na resistência dos materiais de construção ao crescimento dos fungos.

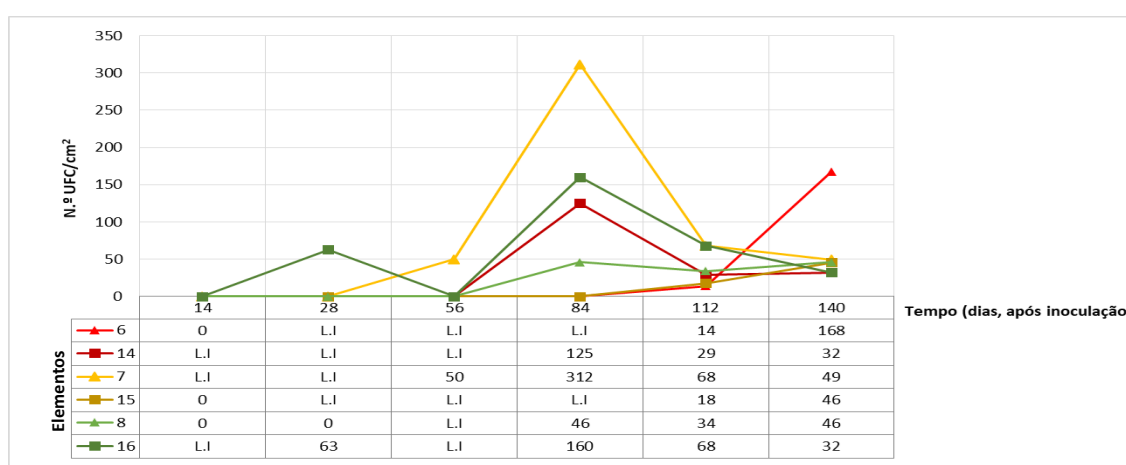


L.I - Valor menor que 50 UFC/cm².

Gráfico III.2: Evolução do crescimento fúngico perante os substratos R1 e R2, para os conjuntos de elementos: 3+11, 4+12 e 5+13.

III-Análise da resistência de diferentes materiais de construção ao desenvolvimento de fungos

No Gráfico III.3 apresenta-se a combinação de elementos, 6+14, 7+15 e 8+16 produzidos a partir dos substratos de argamassa R1 e R2. Estes conjuntos, no geral, apresentam comportamentos distintos referentes à contaminação fúngica. Mais uma vez, se confirma que os elementos 6 e 7 com substrato à base de argamassa de cal (R1), revelam valores de UFC superiores aos elementos de argamassa bastarda (R2). Contrariamente o caso do elemento 15 pertencente ao provete P2 e formulado com argamassa R2, que apresenta um número de UFC significativamente reduzido, assim como o elemento 8 de argamassa R1 (46 UFC/cm²).



L.I - Valor menor que 50 UFC/cm².

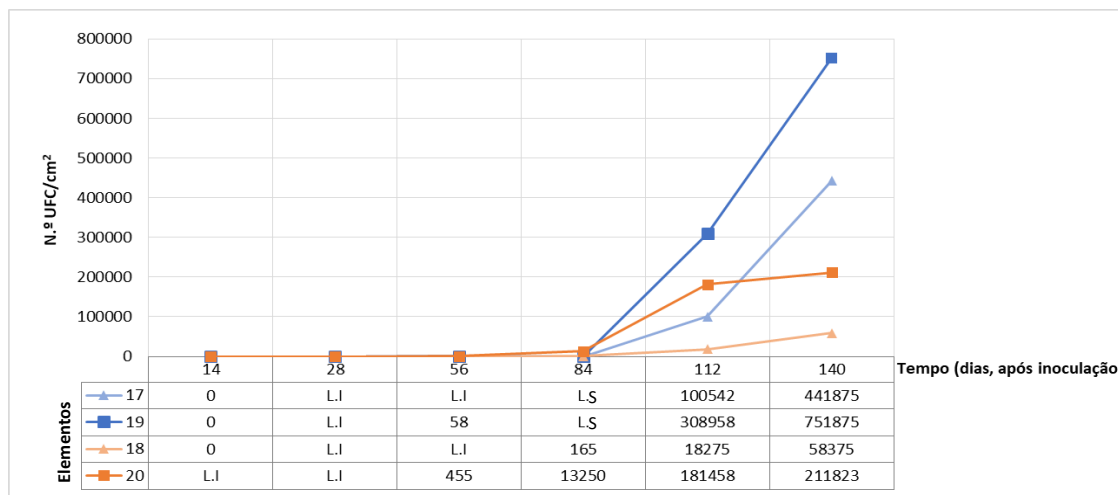
Gráfico III.3: Evolução do crescimento fúngico perante os substratos R1 e R2, para os conjuntos de elementos: 6+14, 7+15 e 8+16.

Analisando a combinação entre os elementos dos provetes P1 e P2 referentes aos substratos R1 e R2 respetivamente, denota-se que estes resultados não apontam para uma conclusão clara relativamente ao melhor substrato. Pelo que o favorecimento em termos de crescimento pode ser devido ao substrato R2 de argamassa bastarda ser constituído por uma proporção de cimento, cal e areia maior (1:3:12), tornando-o menos resistente à proliferação de fungos comparativamente ao substrato R1 só constituído por cal e areia (1:3). Segundo os ensaios de Wiktor et al. (2009), os materiais de construção à base de cimento são, geralmente, superfícies mais porosas e irregulares, o que constitui uma mais valia para os fungos se fixarem ao substrato através das suas hifas. A existência de adjuvantes orgânicos que servem de alimento para os fungos, derivados da poeira ou de material orgânico que se acumula na suas superfícies, torna-os adequados para o crescimento dos mesmos (Hannu Viitanen et al., 2010; Wiktor et al., 2009).

Por fim, os últimos grupos formados encontram-se associados a combinações de elementos relativas aos substratos de gesso cartonado G1 e G2 (Gráfico III.4). Os dois conjuntos de elementos 17+19 (tinta primário D e tinta acabamento H) e 18+20 (tinta primário D e tinta acabamento I) apresentam comportamentos distintos face à contaminação dos fungos. No entanto os elementos de cada grupo apresentam tendências semelhantes entre si. Por outro lado,

III-Análise da resistência de diferentes materiais de construção ao desenvolvimento de fungos

em ambos os elementos 19 e 20 formulados a partir do substrato de gesso cartonado hidrófugo (G2), apresentam um elevado número de UFC/cm², com destaque para o elemento 19 com valores superiores a 751x10³ UFC/cm².



L.I - Valor menor que 50 UFC/cm²; L.S - Valor maior que 500 UFC/cm².

Gráfico III.4: Evolução do crescimento fúngico perante os substratos de gesso G1 e G2, para os conjuntos de elementos: 17+19 e 18+20.

No geral, verificou-se que as contagens de colónias fúngicas são mais elevadas nos elementos formulados a partir do substrato de gesso cartonado em relação à argamassa, principalmente a partir do gesso cartonado hidrófugo (G2). Este facto pode estar diretamente relacionado com o cartão aplicado na sua superfície, que confere um acabamento liso, mas constituindo para os fungos uma fonte rica em nutrientes. Para além, dos provetes estarem sujeitos a uma temperatura e humidade relativa constante, no caso do gesso hidrófugo (G2), este tem um tratamento aplicado que lhe confere resistência à humidade, repelando-a para a superfície do provete. Este facto favorece o desenvolvimento e proliferação dos fungos neste substrato, visto contribuir para aumentar o teor de humidade na superfície, condição essencial para o desenvolvimento dos microrganismos. Estes resultados são concordantes com os obtidos por Viitanen et al. (2010), que concluíram que os materiais de construção formulados a partir de material orgânico (como a madeira e o papel) são mais sensíveis ao desenvolvimento de fungos quanto maior o teor de humidade, o que vai de encontro às necessidades nutritivas dos mesmos. Resumindo, pode-se mencionar sem grande evidência que em termos de substrato o R1 (argamassa de cal) é o que aparenta ser o mais resistente aos fungos em oposição ao substrato G2 (gesso cartonado hidrófugo). Deste modo aconselha-se a ponderar a utilização de materiais de construção com substratos à base de gesso em ambientes húmidos e quentes, principalmente em materiais com características hidrófugas.

III.4.4 Influência dos sistemas de pintura no crescimento fúngico no crescimento fúngico

Tal como descrito anteriormente, o sistema de pintura é constituído por tintas com função de primário (A, B, C, D) e de acabamento (E, F, G, H e I), com diferentes características ao nível da sua constituição, sendo de natureza orgânica (acrílica, vinílica ou estireno-acrílica) ou inorgânica (cal, cal apagada e silicato de potássio), pH variável (8-9 ou >12), proteção fúngica distinta (baixa, média e alta), diferente brilho (mate ou acetinado), % de PVC diferentes (25-80) e variada permeabilidade ao vapor de água (média e alta). Desta forma a influência dos sistemas de pintura é analisada considerando grupos elaborados com base no mesmo substrato (R1, R2, G1 e G2), mas com diferenças ao nível das tintas usadas. Consequentemente, para cada substrato, agruparam-se os elementos de forma a analisar a influência das tintas primárias (C e D) e posteriormente grupos para avaliar o efeito das tintas de acabamento (G, H e I). No caso de não ser possível formar grupos, analisou-se o sistema de pintura global conjugando o possível efeito das tintas primárias (A e B) com as tintas de acabamento (E, F). Nesta avaliação também se consideraram os valores máximos de UFC/cm² obtidos independente do momento de recolha como sendo indicativos da tinta com menor resistência ao desenvolvimento de fungos.

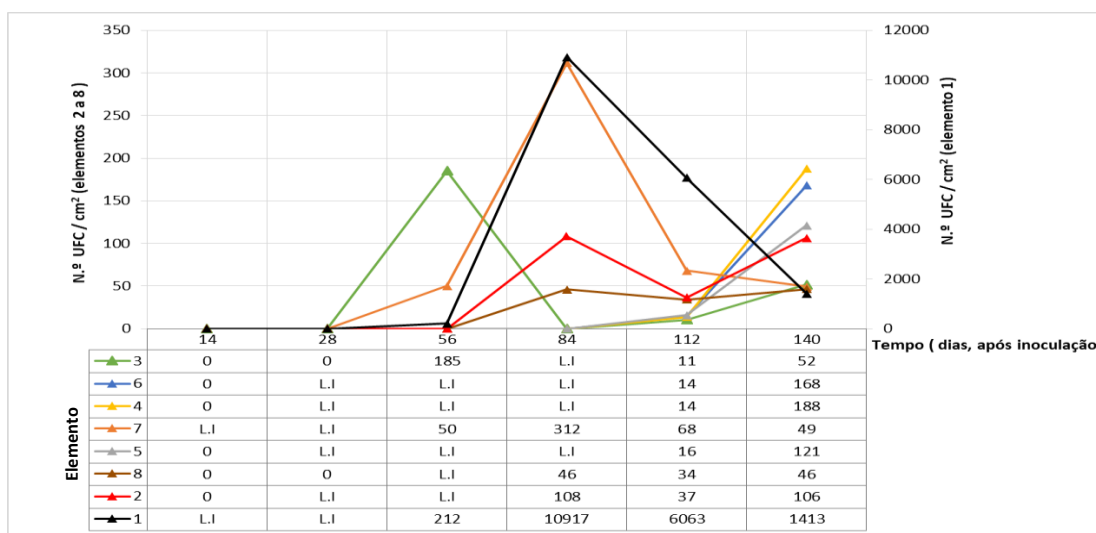
A conjugação dos elementos 3+6, 4+7, 5+8 do provete P1 (Gráfico III.5), revelam a influência das tintas primárias (C e D), visto os elementos de cada grupo terem a mesma tinta de acabamento, tinta G, H e I respetivamente. Por conseguinte, para cada elemento constituinte de cada grupo usaram-se tintas primárias distintas, tinta C e tinta D, as quais possuem características semelhantes, salientando-se o facto de ambas serem de natureza orgânica. Os resultados não apontam claramente para a prevalência de uma ter maior resistência em relação à outra. Visto que as conjugações dos elementos apontam para no segundo grupo a tinta C como a que apresenta maior resistência ao desenvolvimento fúngico, mas os restantes grupos apontam a tinta D.

A combinação dos elementos 3+4+5 e 6+7+8 permite avaliar a influência da tinta de acabamento, respetivamente tinta G, tinta H e tinta I, devido à aplicação da mesma tinta primária nos elementos de cada grupo. As tintas com função de primário usadas foram a tinta C e D para o primeiro e segundo grupo respetivamente (Gráfico III.5). Pela análise do número máximo de UFC/cm² verifica-se uma semelhança de resultados, a variar entre os 121 e os 188 UFC/cm², para os elementos 5 (tinta I) e 4 (tinta H). Segundo estes valores a tinta de acabamento I é a que tem um ligeiro aumento na proteção face ao desenvolvimento fúngico. Os elementos 6+7+8, também resultam da aplicação das mesmas tintas de acabamento que os elementos anteriores, mas com tinta primária D, denotando-se que o comportamento fúngico no elemento 8 (tinta I) ao longo de todo o ensaio apresenta valores baixos, comparativamente

III-Análise da resistência de diferentes materiais de construção ao desenvolvimento de fungos

aos restantes elementos. Deste modo, a tinta acabamento I perante estes resultado é a tinta com maior poder de inibição fúngica. Contrariamente ao elemento 7, tendo por base a tinta H, que registou o maior crescimento. As características ao nível da natureza orgânica das tintas de acabamento são semelhantes, variando apenas o nível de proteção fúngica e a permeabilidade ao vapor de água. Pelo que se deduz que a alta proteção fúngica da tinta I possa ter influenciado a proteção fúngica registada.

Relativamente aos elementos 1 e 2 constituintes do provete P1 foram sujeitos à aplicação de tintas primárias e tintas acabamentos distintas, respetivamente tintas A e B e tintas E e F. O elemento 1 revela ser de todos os elementos o que apresenta uma menor proteção fúngica, concordante com as características da tinta primária A e de acabamento E. Ambas apresentam proteção fúngica baixa, substrato de cal e pH alcalino, condições que aparentemente favorecem o desenvolvimento fúngico. O elemento 2 (tinta primária B e acabamento F) com o valor máximo de 108 UFC/cm² atingido aos 84 dias de ensaio, demonstra maior proteção em relação ao elemento 1, pelo que outras características para além da proteção fúngica da tinta primário terão influenciado o comportamento. Um parâmetro que pode ter contribuído para esta diferença poderá estar relacionado com a tinta de acabamento. Visto que o potencial antifúngico da tinta de acabamento conjugada (F) é superior ao da tinta de acabamento do elemento 1 (tinta E). Ambas as tintas apresentam a mesma natureza (inorgânica), mas distinguem-se pela tinta E apresentar proteção fúngica baixa.



L.I - Valor menor que 50 UFC/cm².

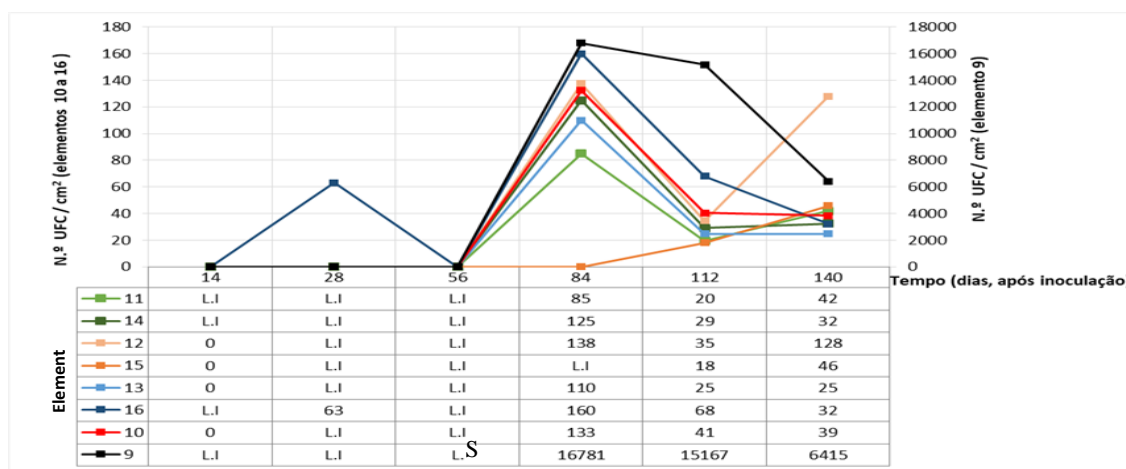
Gráfico III.5: Crescimento fúngico para os elementos do provete P1 em função do tempo para avaliar a influência do sistema de pintura.

O mesmo tipo de análise foi efetuada para o provete P2. O conjunto de elementos 11+14, 12+15 e 13+16 onde foram aplicadas respetivamente as tintas de acabamento G, H e I, permite testar as tintas primárias C e D. Segundo as contagens de fungos (Gráfico III.6) para os grupos

definidos, estas indicam que a tinta orgânica D é a que apresenta maior grau de inibição fúngica apenas para o segundo grupo e a tinta C para os restantes casos. Tal como o referido anteriormente as características de ambas as tintas são semelhantes contudo, registam comportamentos diferentes ao nível da resistência do desenvolvimento de fungos. Deste modo, os resultados obtidos apontam para sinergias entre a tinta com função de primário e a tinta de acabamento conjugada.

Para avaliar o efeito das tintas de acabamento G, H e I foram agrupados os elementos com igual tinta primária (C e D). Consequentemente, os elementos 11+12+13 formam um grupo tendo a tinta C como tinta primária e o grupo dos elementos 14+15+16 cuja tinta primária usada foi a tinta D. Para cada grupo a ordem das tintas de acabamento usada foi a tinta G, H e I respetivamente. Os elementos que registaram o maior número de UFC para cada grupo foram os elementos 11 (85 UFC/cm²) e o 15 (46 UFC/cm²). Desta feita, os resultados não são concordantes, visto que a tinta de acabamento aplicada no primeiro caso foi a tinta G, e no segundo a tinta H. De salientar que ambas são de natureza orgânica e com uma ação média relativamente à inibição do crescimento fúngico. A principal diferença reside no parâmetro PVC e na permeabilidade ao vapor de água, sendo a tinta H a que apresenta nível elevado e a tinta G nível médio de permeabilidade.

Tal como no provete P1, os elementos 9 e 10 constituintes do provete P2 foram sujeitos à aplicação das mesmas tintas primárias e acabamentos, respetivamente tintas A e B e tintas E e F. O elemento 9 revela ser de todos os elementos o que apresenta uma menor ação antifúngica, o que leva a concluir que a conjugação da tinta primária (tinta A) e de acabamento (tinta E) aplicada não é uma boa opção no que respeita à proteção fúngica. Confirmando-se, tal como para o provete P1, que a diferença nas características ao nível da proteção fúngica da tinta de acabamento (E e F) se refletiu nos resultados.



L.I - Valor menor que 50 UFC/cm²; L.S - Valor maior que 500 UFC/cm².

Gráfico III.6: Crescimento fúngico para os elementos do provete P2 em função do tempo para avaliar a influência do sistema de pintura.

Relativamente aos provetes de gesso cartonado normal (G1) e hidrófugo (G2) a tinta que serviu como primário foi a tinta D, pelo que em ambos os casos apenas se irá analisar o efeito das tintas de acabamento usadas (H e I). Pela visualização do Gráfico III.4 (*vide* ponto III.4.2.1), as contagens de fungos referentes aos elementos 17 e 18 do provete G1, onde foram aplicadas as tintas de acabamento H e I, respetivamente, indicaram que o sistema de pintura com uma resistência mais elevada ao desenvolvimento fúngico foi o que continha a tinta I. Os resultados obtidos são concordantes com os resultados para os elementos do provete G2 – elementos 19 e 20. Deste modo, infere-se que a tinta I é a que apresenta maior capacidade para impedir o desenvolvimento de fungos, coincidente com o respetivo parâmetro de proteção fúngica alta.

Globalmente, verifica-se que para os provetes P1 e P2, os sistemas de pintura com melhor desempenho antifúngico apresentavam a tinta D e a C como primário respetivamente. Pelo que não se pode afirmar claramente qual é o melhor primário, facto que é concordante com a semelhança nas características das tintas. Ambas exibem natureza orgânica e conferem a mesma proteção fúngica (média), para além de ambas serem indicadas na aplicação em substratos de reboco como o que compõe o provete P2.

Ao nível das tintas de acabamento, nos provetes P1, G1 e G2 a tinta com melhor desempenho foi a tinta I, enquanto que na parede P2 foram as tintas G e H. Todas as tintas conferem às superfícies valores de pH similares (entre 8 e 9) e são de natureza orgânica. Contrariando o facto das tintas de natureza orgânica constituírem uma fonte de nutrientes para os fungos (Arumala, 2006) favorecendo o seu crescimento. Porém, diferem na proteção fúngica, sendo que a tinta I apresenta uma proteção fúngica alta, e as tintas G e H uma proteção fúngica média, o que indica a importância desta característica em detrimento da natureza. Segundo a análise estatística realizada para a avaliação das características das tintas primárias e de acabamento em termos da sua tipicidade, os resultados permitiram concluir que a natureza e a proteção fúngica das tintas de acabamento são as características mais importantes das tintas na avaliação do crescimento fúngico. Para além destas características, o teste também revelou que o PVC, o pH e a permeabilidade das tintas são também fatores a ter em conta. No entanto estas conclusões não foram suficientes para a tinta I apresentar o melhor desempenho em todas as situações. Outras características em que diferem as tintas I, G e H são ao nível do teor em pigmentos (% PVC) e na permeabilidade ao vapor de água, sendo a tinta H a que apresenta maiores valores para ambas as características. Mediante os resultados, a conjugação destas propriedades permitiu uma inibição parcial da proliferação dos microrganismos. Este facto não é concordante com o esperado, pois segundo a literatura, tintas com elevado PVC (>40%) correspondem a tintas com maior permeabilidade, como é o caso das tintas de cal e silicatos. Nestes casos, a secagem da parede é realizada mais rapidamente evitando a probabilidade de desenvolvimento fúngico nas porosidades do substrato, visto que um PVC elevado corresponde a quantidades de ligantes da tinta e cargas insuficientes para preencher os vazios entre as partículas do substrato (Khorassani, Pourmahdian, Taromi, & Nourhani, 2005). A tinta H é uma tinta de natureza distinta à relatada na literatura, mas apresenta elevado PVC e porosidade,

relativamente às tintas I e G. Se a tinta H apresenta elevada permeabilidade significa que a água não fica retida na sua superfície, mas seria absorvida pelo que seria oposto ao gesso hidrófugo (G2), o que implicaria uma maior proteção face ao desenvolvimento fúngico, situação que não se verifica. Logo, deste modo é impossível concluir claramente quais das tintas de acabamento I, G e H apresenta uma melhor performance relativamente à inibição da proliferação fúngica.

Apesar da proliferação de fungos acontecer preferencialmente em ambientes ácidos e neutros para a maioria das espécies (intervalo ótimo de pH 3-9), o teor alcalino das tintas primárias e acabamentos não se apresentou eficaz para diminuir o desenvolvimento fúngico (Sedlbauer, 2001). Estes resultados podem ser indicativos de que a espécie inoculada nos provetes se desenvolve numa vasta gama de pH, incluindo a gama alcalina.

Constatou-se que o sistema de pintura formulado com a tinta primária D e tinta acabamento H apresentou o pior desempenho quando aplicado na placa de gesso cartonado hidrófugo, sendo que na placa de gesso cartonado normal foi igualmente desfavorável. É possível afirmar que independentemente das características do sistema de pintura aplicados o tipo de substrato que compõe os provetes de gesso (G1 e G2) tem uma grande influência nos resultados obtidos.

Os sistemas de pintura constituídos pelas tintas A+ E (tinta à base de cal) e B + F (tintas à base de silicatos), no geral não se mostraram adequados à inibição de fungos. O pior desempenho foi registado para o sistema A+E que resultou da junção de tintas de diferentes naturezas, respetivamente tinta primária orgânica (tinta A) e tinta acabamento inorgânica (tinta E). Esta tendência deve-se igualmente às características de baixa proteção fúngica, apesar de serem mais indicadas para a aplicação no substrato de argamassa de cal – R1, como o que compõe o provete P1. Relativamente ao sistema de pintura com tintas à base de silicatos (tintas B e F), o seu desempenho antifúngico foi mais eficaz no provete P1, formulado a partir de argamassa de cal (R1). Ambas as tintas são de natureza inorgânica, apesar de serem mais indicadas para a aplicação em substratos como o que integra o provete P2 (argamassa bastarda – R2) e de terem uma concentração de pigmentos (% PVC) elevada e um pH alcalino que as ostenta.

III.4.5 Análise dos COV totais na câmara climática

Na tentativa de perceber se a atividade microbiológica pode estar associada ao aumento das emissões de COV totais resultantes do respetivo metabolismo, e desta forma monitorizar de um modo expedito a evolução do crescimento, efetuaram-se as medições dos COV totais no interior de câmara. A análise dos COV foi efetuada nos momentos de amostragens definidos para as contagens. Da monitorização feita apenas se detetaram COV aos 14 dias de ensaio, representadas no Gráfico III.7.

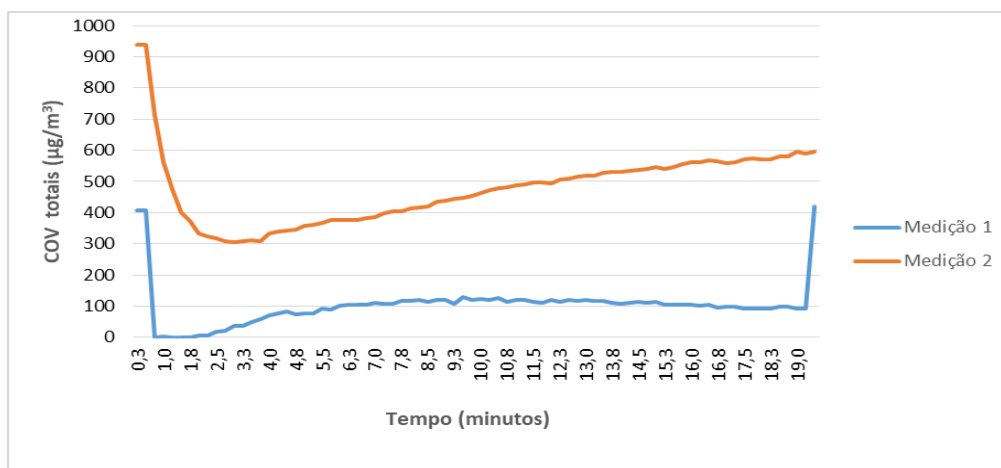


Gráfico III.7: Medição de COV totais no interior da câmara climática, após 14 dias do início dos ensaios.

Como está patente no gráfico neste dia ocorreram duas medições em contínuo durante 20 minutos, onde se verifica que os COV totais variaram entre os 100 e 600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. Segundo as contagens de UFC para os 14 dias de ensaio (*vide* ponto III.4.1) relativas aos quatro provetes de ensaio, denota-se que de um modo geral o crescimento era insignificante. Segundo a literatura a ocorrência de COV em espaços interiores é devida na maior parte das vezes a fontes relacionadas com os materiais de construção, decoração, mobiliário e equipamento. Por outro lado, numa pequena escala poderá ser incutido ao desenvolvimento de populações microbiológicas. Neste último caso, a quantidade e tipo de COV emitidos depende das espécies de fungos e das condições ambientais em que se verifica o crescimento destes organismos (Bennett & Inamdar, 2015). Estas emissões têm na base da sua composição álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos, éteres, ésteres, terpenos, tióis e seus derivados. Estes compostos estão normalmente associados ao aroma a mofo característicos de espaços interiores húmidos. Técnicas diferentes podem ser usadas para a identificação dos tipos de compostos presentes, nomeadamente cromatografia gasosa com deteção de massa (GC-MS) após amostragem com tubos específicos (Method 8260D, 2017). Existem ainda algumas ferramentas que permitem extrapolar a composição dos COV dependendo das espécies de fungos (mVOC, 2014). Deste modo, o valor obtido pode ter sido condicionado pelo sistema de tintas aplicado nos provetes de ensaio. Este facto pode justificar igualmente a não deteção de COV totais nas restantes amostragens, pois pode ter ocorrido uma dispersão dos COV provenientes das tintas para o exterior da câmara durante as recolhas das amostras. Pelo que a emissão de COV resultantes do metabolismo microbiano não é significativa de modo a ser detetada pelo equipamento, não sendo possível monitorizar a evolução da população de um modo indireto pela medição dos COV totais.

III.4.6 Avaliação da carbonatação

A avaliação do grau de carbonatação dos provetes de ensaio permite avaliar a influência da população de fungos na degradação dos materiais de construção e paralelamente a respetiva intensidade de crescimento. A carbonatação de um determinado tipo de material (por exemplo, o betão) pode ser dividida em três áreas a partir da superfície de exposição. Em que, temos a região carbonatada, a região em processo de carbonatação e a região não carbonatada, sendo que a região não carbonatada apresenta um pH acima de 12 e a região carbonatada apresenta um pH abaixo de 9 (Kulakowski,2002). A Tabela III.8 apresenta os resultados decorrentes da medição do pH para os vários elementos principais constituintes dos provetes de ensaio que de um modo geral apresentaram carácter alcalino. Contudo, pode-se agrupar os resultados obtidos em dois grupos, correspondente aos provetes de argamassa (P1 e P2) e aos provetes de gesso (G1 e G2). O pH registado rondou em média os 12,9 para os provetes P1 e P2, o que indica que não ocorreu carbonatação. Contrariamente, nos provetes G1 e G2 os valores do pH encontram-se na zona limite considerada como indicativa de carbonatação ($\text{pH} < 9$) (Ashraf, 2016). Todavia salienta-se que o pH das tintas utilizadas nestes provetes já rondava os 8-9 de acordo com as respetivas características (*vide* ponto III.3.1, Tabelas III.1 e III.2).

Tabela III.8: Valores de pH de carbonatação registados aos 140 dias nos quatro provetes de ensaio.

Provetes	Elementos	pH carbonatação
P1	1	12,77
	2	12,85
	3 e 4	12,89
	5 ao 8	12,91
P2	9	12,86
	10	12,87
	11e12	12,89
	13	12,86
	14	12,87
	15	12,88
	16	12,85
G1	17	8,74
	18	8,76
G2	19	8,72
	20	8,70

De forma a complementar o processo anterior, foi aplicado um método expedito de análise do processo físico-químico de carbonatação nos provetes *in situ*. Este processo envolve a utilização do indicador ácido-base fenolftaleína, pois este reage com a fase líquida que se encontra nos poros do material dos provetes. Portanto, segundo o pH do meio exhibe a cor mangenta/rosa

forte se meio alcalino ou apresenta a cor natural do material (torna-se incolor) em meios neutros e ácidos (Lee et al., 2012). Assim, após a aspersão superficial e em profundidade do indicador fenolftaleína, denota-se que a cor magenta/rosa forte do indicador manteve-se em todos os provetes, tal como se pode verificar no exemplo da Figura III.12 para o provete P2.



Figura III.12: Avaliação da carbonatação através da aspersão do indicador fenolftaleína *in situ* para o provete de ensaio P2.

De acordo, com os resultados obtidos nos dois métodos os elementos dos provetes P1 e P2, não se encontravam em processo de carbonatação. Segundo Cultrone et al. (2005) a carbonatação total e completa das argamassas é um processo demorado, podendo mesmo, demorar vários anos. O material deve apresentar alguma porosidade, de modo a permitir a evaporação de água e a penetração do dióxido de carbono (Cultrone et al., 2005), o que não acontece nestes provetes, pois apesar da sua elevada porosidade as concentrações de CO₂ poderiam ser reduzidas. Nos provetes de gesso cartonado G1 e G2 os resultados foram semelhantes, confirmando-se de que não ocorreu a carbonatação, sendo que o valor do pH inferior a 9 foi derivado do sistema de pintura utilizado. Este facto indica que num curto espaço de tempo (140 dias) a atividade microbiana não foi suficiente para alterar o estado do material e sugerindo que apenas em caso de elevado crescimento fúngico é que poderá ocorrer a carbonatação dos materiais.

III.4.7 Identificação da espécie fúngica

A identificação da espécie do fungo utilizado nos ensaios, foi feita recorrendo à análise macroscópica e microscópica da sua morfologia entre outras características, bem como através de testes bioquímicos. A análise foi feita tendo por base a lista dos fungos comumente encontrados em ambientes interiores, que pertencem aos géneros fúngicos *Cladosporium*, *Penicillium* e *Aspergillus* (Leung & Lee, 2016).

Com base nas diversas pesquisas efetuadas, procedeu-se à descrição das principais características macroscópicas da espécie fúngica isolada (Figura III.13). A visualização da

colônia fúngica isolada em meio Sabouraud Chloramphenicol Agar (Bioakar), permitiu verificar que a mesma apresenta uma morfologia circular, uma margem/borda regular e uma superfície rugosa. Relativamente à elevação que consiste na vista lateral da colônia é elevada, nesta também se verifica a produção de conídios, que se visualizam mais detalhadamente em seguida na análise microscópica. A colônia apresenta uma cor esverdeada, o reverso de cor creme a castanha e as colônias apresentam um diâmetro que varia entre os 30 a 40 mm (Blackburn, 2006; Rosa, 2013). Perante estas características observadas dos fungos, os géneros *Penicillium* e *Aspergillus* são os que se encaixam nestas condições.



Figura III.13: Espécie fúngica utilizada nos ensaios.

A análise microscópica foi fundamental na determinação do género de fungo que foi inoculado nos provetes. Deste modo, após as diversas pesquisas efetuadas foi possível a observação das principais estruturas morfológicas e reprodutoras inerentes ao género em estudo (Figura III.14). Deste modo, suspeita-se que será uma espécie pertencente ao género *Penicillium*, sendo um género de fungos muito comum, que se desenvolve numa ampla gama de habitats, desde o solo até à vegetação, no ar, ambientes internos e em vários produtos alimentares. Este é constituído por esporos vegetativos (conídios) que são a sua principal estrutura de reprodução assexuada. Os conídios são geralmente verdes e nascem em cadeias produzidas pelas fiálides, que são estruturas de dimensões reduzidas, alongadas e que estreitam numa das extremidades. Estas estruturas encontram-se sob verticilos (pontos de ramificação), e assentam sob estes através da intervenção de células de suporte especializadas conhecidas por métulas. Por fim, os conidióforos são hifas que suportam toda a estrutura produtora de conídios (Machado, 2006; Visagie et al., 2014)

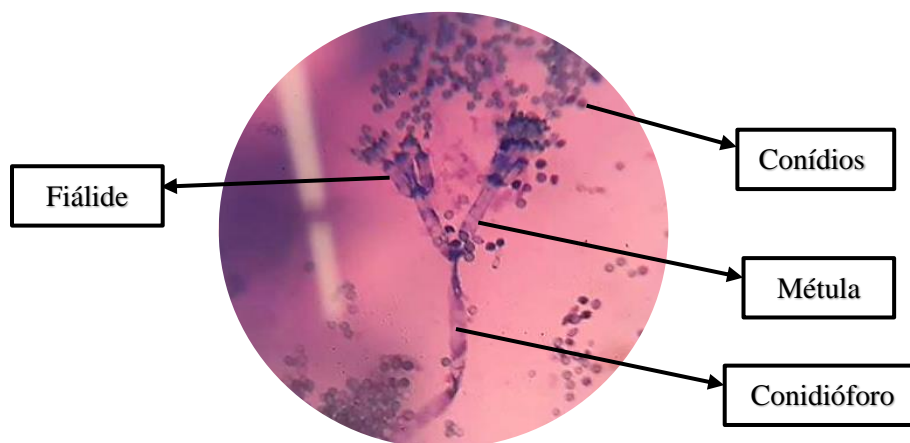


Figura III.14: Análise microscópica da espécie fúngica isolada.

Na tentativa de se confirmar o gênero e identificar a espécie fúngica, realizaram-se um conjunto de testes bioquímicos, estando os respectivos resultados descritos na Tabela III.9. Tendo em conta, que os testes anteriores apontam para o gênero *Penicillium*, com base principalmente nas suas características macroscópicas e nas pesquisas realizadas, ambas apontam para duas espécies, o *Penicillium brevicompactum* e o *Penicillium chrysogenum*. Deste modo, definiu-se uma bateria de testes bioquímicos de modo a identificar a espécie em causa. Os testes realizados tiveram por base os trabalhos efetuados por P. Bridge (1985), pois estes envolviam entre outras, as duas espécies suspeitas.

Tabela III.9: Resultados dos testes bioquímicos efetuados.

Teste	Crescimento a Diferentes Temperaturas				
Resultados	4°C	37°C	40°C		
	+(a)	+	-(b)		
Teste	Crescimento a Diferentes pH				
Resultados	2	10	12		
	+	+	+		
Teste	Crescimento na Presença de Substâncias Inibidoras				
Resultados	Naa	CuS	ZnS	Cvt ₁ ^(c)	Cvt ₂ ^(d)
	+	+	+	+	+
Teste	Crescimento em Diferentes Fontes de Carbono				
Resultados (meio sólido)	Lactose		Ácido Cítrico		
	+		+		
	+		+		
Teste	Crescimento em Diferentes Fontes de Azoto				
Resultados (meio sólido)	Glucose		Nitrito de Sódio		
	+		+		
	+		+		
Teste	Atividade Enzimática Hidrolítica				
Resultados	Amido	Gelatina		Caseína	
	+	+		+	

III-Análise da resistência de diferentes materiais de construção ao desenvolvimento de fungos

- (a) Indicação de resultado positivo (+), em que se verificou crescimento fúngico;
- (b) Indicação de resultado negativo (-), em que não se verificou crescimento fúngico;
- (c) Corresponde à massa de cristal de violeta 0,05 g/L (Cvt₁);
- (d) Corresponde à massa de cristal de violeta 0,01 g/L (Cvt₂);

De um modo geral, os testes bioquímicos permitem a identificação de espécies analisando diferenças ao nível das preferências nutricionais, no crescimento perante condições diversificadas de temperaturas e pH, resistência a substâncias inibidoras e a excreção de diferentes tipos de enzimas para a assimilação de diversos substratos. Os resultados obtidos para o crescimento a diferentes temperaturas (4°C, 37°C e 40°C) inserem-se nas classes de crescimento dos microrganismos psicrófilos (0-20°C) e os mesófilos (20-40°C) para a espécie inoculada, ou seja o crescimento a 4°C e ausência a 40°C são concordantes com os trabalhos desenvolvidos por Bridge et al. (1985), exceto para a temperatura de 37°C, apontando para a espécie *Penicillium brevicompactum*. Contudo, apesar do valor positivo obtido para a temperatura de 37°C ser contraditório, todos os restantes testes indicam como sendo a espécie *Penicillium brevicompactum*. Segundo a literatura, este género de fungos podem ser classificados como mesófilos psicrotolerantes, pois desenvolvem-se numa gama entre uma temperatura mínima de 0°C ou menos até uma temperatura máxima por volta dos 40°C (Flannigan et al., 2016). Os estudos efetuados por Ndagijimana et al. (2008) sobre a espécie *Penicillium brevicompactum* confirmam que a mesma é capaz de sobreviver e crescer perante temperaturas de refrigeração, ou seja, temperaturas extremamente baixas. No crescimento em meios com diferentes níveis de pH (2, 10 e 12) e respetivas gamas como a ácida (0-6 pH) e alcalina (8-12 pH). Os resultados demonstraram que a espécie fúngica em causa tem capacidade para se desenvolver em qualquer das gamas estudadas, abrangendo meios ácidos a alcalinos. Foram realizados dois ensaios para a gama alcalina (pH=10 e pH=12), pois pequenas variações de pH podem dar origem a resultados distintos, o que não se verificou pois houve crescimento de fungos em ambos. Contrapondo os resultados obtidos com os de Bridge et al. (1985), reforça-se a ideia de provavelmente se está perante a espécie *Penicillium brevicompactum*, a maioria dos resultados obtidos são semelhantes, exceto o resultado obtido para o pH=12. Segundo Sedlbauer (2001), a proliferação de fungos acontece preferencialmente em ambientes ácidos e neutros para a maioria das espécies (intervalo ótimo de pH 3-9). No entanto, valores de pH entre 2-11 também são tolerados por algumas espécies de fungos, o que aparenta ser o caso da espécie fúngica em causa. O crescimento fúngico perante a presença de uma vasta diversidade de substâncias inibidoras como azida de sódio (Naa), sulfato de cobre (CuS), sulfato de zinco (ZnS) e o cristal de violeta (Cvt) também foi testado. Os resultados obtidos foram semelhantes aos registados por Bridge et al. (1985), exceto para o Cvt₁ em que se verificou crescimento de fungos, resultado oposto ao do autor. Pelo que mais uma vez este conjunto de testes apontam para a espécie *Penicillium brevicompactum* em detrimento à espécie *Penicillium chrysogenum*. Relativamente às preferências metabólicas em termos de fontes de carbono foram testados a lactose e o ácido cítrico, tanto em meio líquido como sólido. Neste caso, como ambas as espécies suspeitas *Penicillium brevicompactum* como a *Penicillium chrysogenum* apresentam resultados positivos para as fontes de azoto testadas, esta série de testes não serviu para

esclarecer sobre a identificação da espécie. Enquanto que, em termos de assimilação de fontes de azoto utilizou-se o nitrito de sódio e um controlo positivo a glucose, testados em meio líquido e sólido. Tal como anteriormente, os resultados obtidos são concordantes com os de Bridge et al. (1985) para a espécie *Penicillium brevicompactum* (Bridge et al. 1985). Por fim, a atividade enzimática dos fungos foi analisada usando os substratos amido, gelatina e caseína. Tendo-se apurado que a espécie fúngica inoculada tinha a capacidade para assimilar qualquer substrato tal como a espécie *Penicillium brevicompactum* (Bridge et al., 1985). Portanto, comparando os resultados obtidos com os da literatura, verificou-se que a maioria dos resultados corroboram que a espécie inoculada nos provetes de ensaio seria o *Penicillium brevicompactum*.

O que se deveria fazer para confirmar a espécie em causa era recorrer às novas técnicas de biologia molecular, sendo que estas encontram-se agrupadas em métodos baseados no PCR (do inglês, “Polymerase Chain Reaction”), métodos baseados em sondas de DNA e RNA, técnicas de amplificação, métodos baseados em amplificação isotérmica e métodos baseados na interferência por RNA. Os métodos baseados no PCR ou Reação em Cadeia da Polimerase como o PCR convencional, PCR múltiplo, PCR em tempo real ou quantificado, entre outros, procedem à replicação do DNA, enquanto que os métodos baseados em sondas de DNA e RNA como o Northern blot, hibridização *in situ* e a hibridização fluorescente *in situ*, consistem no uso de uma sonda para a análise de ácidos nucleicos de fungos. As técnicas de amplificação como o microarranjo de DNA, permitem a análise de milhares de mRNA simultaneamente, para além de observações nas mudanças da expressão genética. Os métodos baseados em amplificação isotérmica como a amplificação isotérmica de ácidos nucleicos e de sequências de ácidos nucleicos, consistem na amplificação do ácido nucleico alvo que ocorre sob condições isotérmicas de alta especificidade. Por fim, temos os métodos baseados na interferência por RNA que são usados para identificar e controlar os fungos fitopatogénicos (Aslam et al., 2017; Gherbawy & Voigt, 2010). Devido às limitações dos testes convencionais, atualmente o desenvolvimento da biologia molecular tem potenciado o aparecimento de novas técnicas e métodos que fornecem informações de uma forma mais rápida e específica relativamente à confirmação e identificação de espécies e géneros fúngicos.

III.5 Conclusão

A avaliação da resistência de diferentes materiais de construção ao desenvolvimento de fungos foi realizada em quatro provetes de ensaio, formulados a partir de substratos distintos e com a aplicação de sistemas de pintura com características variadas. Sendo sujeitos a um conjunto de testes que permitiram a avaliação do crescimento fúngico, a avaliação do estado de carbonatação e a identificação da espécie fúngica inoculada, permitindo deste modo chegar às conclusões que a seguir se mencionam:

A avaliação quantitativa do crescimento da população fúngica através da contagem do número de UFC e a avaliação qualitativa dos fungos por inspeção visual recorrendo ao registo

fotográfico revelaram que as contagens máximas de fungos foram registadas nos provetes de gesso cartonado (G1 e G2) , em relação aos provetes de argamassa P1 e P2.

Perante a análise das contagens de UFC/cm², principalmente para os provetes P1 e P2 constatou-se que as zonas de colheita, condicionaram os resultados obtidos. Este facto foi confirmado, com o registo fotográfico pois verificou-se que a proliferação fúngica ocorreu mais ao nível das extremidades e na zona central dos seus elementos. Contrariamente, ao que se observou nos elementos dos provetes de gesso cartonado G1 e G2, tendo ocorrido a propagação por toda a superfície do elemento.

Na análise da influência dos diferentes substratos que compoñham os quatro provetes de ensaio denotou-se que as contagens de UFC são mais elevadas nos elementos formulados a partir do substrato de gesso cartonado, principalmente a partir do gesso cartonado hidrófugo G2. Enquanto, nos provetes P1 e P2 referentes aos substratos de argamassa de cal e argamassa bastarda R1 e R2 respetivamente, verificou-se que o número de colónias fúngicas era semelhante em ambos os provetes, deste modo não foi possível aferir de uma forma clara qual o substrato mais resistente à proliferação fúngica.

No geral o sistema de pintura aplicado nos provetes P1 e P2 com natureza orgânica não permitiu verificar qual das tintas usadas como primário e acabamento eram mais indicadas para a inibição fúngica, pois apesar de terem diferentes níveis de proteção fúngica, a aplicação de tintas com proteção fúngica elevada numa das camadas (como a combinação com a tinta de acabamento I) não assegura a ausência de fungos.

Em ambos os provetes, o sistema de pintura constituído por primário e por acabamento de naturezas distintas (como o sistema de pintura A+E), apresentou o desempenho mais desfavorável à inibição do crescimento fúngico. Assim como os sistemas de pintura aplicados nas placas de gesso cartonado revelaram-se inadequados para inibir a proliferação de fungos, principalmente o sistema D+I aplicado no substrato de gesso hidrófugo (G2).

A determinação dos COV no interior da camara climática revelou que não existe uma relação entre os COV e o crescimento dos fungos, pois a monitorização do crescimento fúngico mostrou-se baixa.

A avaliação do grau de carbonatação dos provetes de indicou que não se verificou qualquer indicio de carbonatação dos mesmos.

A identificação da espécie do fungo utilizado nos ensaios, foi feita recorrendo à análise macroscópica e microscópica da sua morfologia que levou a induzir que possivelmente estávamos perante o género *Penicillium*, a tentativa de identificação da espécie foi realizada

através de um conjunto de testes bioquímicos que apontaram para a espécie *Penicillium brevicompactum*.

III.6 Referências

- Abelho, M. (2013). Protocolos de Microbiologia Ambiental : parte 1 – métodos básicos em microbiologia.(PDF).Escola Superior Agrária de Coimbra. Obtido de URL:<http://www.esac.pt/Abelho/MicroAmbiental/Protocolos%5B1%5D_2011_2012.pdf>.
- Abelho, M. (2013). Protocolos de Microbiologia Ambiental : parte 3 - microbiologia ambiental aplicada.(PDF).Escola Superior Agrária de Coimbra. Obtido de URL:<http://www.esac.pt/Abelho/MicroAmbiental/Protocolos%5B3%5D_2012_2013.pdf>.
- Abrusci, C., Martiin-Gonzalez, A., Del Amo, A., Catalina, F., Collado, J., & Platas, G. (2005). Isolation and identification of bacteria and fungi from m cinematographic films. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 56, 58–68.
- Adams, R. I., Bhangar, S., Dannemiller, K. C., Eisen, J. A., Fierer, N., Gilbert, J. A., Bibby, K. (2016). Ten questions concerning the microbiomes of buildings. *Building and Environment*, 109, 224–234. <https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2016.09.001>.
- Alcântara, F., Cunha, M. Â., & Almeida, M. A. (2001). *Microbiologia : práticas laboratoriais* (2ª). Universidade de Aveiro.
- Alum, A., & Isaacs, G. Z. (2016). Aerobiology of the built environment: Synergy between Legionella and fungi. *American Journal of Infection Control*, 44(9), 138–143. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2016.06.004>.
- Arumala, J. (2006). Mold and the Construction Industry. *International Journal of Construction Education and Research*, 2(2), 75–89. <https://doi.org/10.1080/15578770600775868>.
- Ashraf, W. (2016). Carbonation of cement-based materials: Challenges and opportunities. *Construction and Building Materials*, 120(Supplement C), 558–570. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2016.05.080>.

- Aslam, S., Tahir, A., Aslam, M. F., Alam, M. W., Shedayi, A. A., & Sadia, S. (2017). Recent advances in molecular techniques for the identification of phytopathogenic fungi – a mini review. *Journal of Plant Interactions*, 12(1), 493–504. <https://doi.org/10.1080/17429145.2017.1397205>
- ASTM.D5465-93. (2004). Standard Practice for Determining Microbial Colony Counts from Waters Analyzed by Plating Methods . (PDF). ASTM International. Obtido de URL:<<ftp://185.72.26.245/Astm/2/01/Section%2011/ASTM1102/PDF/D5465.pdf>>.
- Barreira, E., Almeida, R., Silva, E., Brás, I., Rocha, A., & Costa, C. (2017). Avaliação laboratorial do desenvolvimento de fungos numa parede de tabique reabilitada com uma argamassa de cal. Apresentado na Congresso da Reabilitação do Património, realizado na Universidade de Aveiro.
- Blackburn, C. (2006). *Food spoilage microorganisms*. (1^a). Woodhead Publishing.
- Borrego, S., Lavin, P., Perdomo, I., Gómez de Saravia, S., & Guiamet, P. (2012). Determination of indoor air quality in archives and biodeterioration of the documentary heritage. *ISRN Microbiology*, 2012, 680–598. <https://doi.org/10.5402/2012/680598>
- Bridge, P. (1985). An evaluation of some physiological and biochemical methods as an aid to the characterization of species of *Penicillium* subsection *Fasciculata*. *Journal of General Microbiology*, 1887–1895.
- Brito, V. (2009). *Influência dos revestimentos por pintura na secagem do suporte*. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa. Obtido de URL: <<https://run.unl.pt/handle/10362/2575>>.
- Carvalho, S., & Nogueira, J. (2004). Química e Indústria: as características das tintas e as características dos polímeros com que são formuladas. *Sociedade Portuguesa de Química*, (95), 24.
- Cultrone, G., Sebastián, E., & Huertas, M. O. (2005). Forced and natural carbonation of lime-based mortars with and without additives: Mineralogical and textural changes. *Cement and Concrete Research*, 35(12), 2278–2289. <https://doi.org/10.1016/j.cemconres.2004.12.012>
- Cwalina, B. (2008). Biodeterioration of concrete. *Architecture Civil Engineering Environment*, 1(4), 133–140.

- Flannigan, B., Samson, R. A., & Miller, J. D. (2003). *Microorganisms in Home and Indoor Work Environments: Diversity, Health Impacts, Investigation and Control*. CRC Press.
- Gherbawy, Y., & Voigt, K. (2010). *Molecular Identification of Fungi*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-05042-8>
- Godinho, M., & Simões, L. M.(1994). Heterogeneidade geológica dum plutónio granítico - caracterização numérica. *Universidade de Coimbra*.
- Johansson, P., Wamming, T., Bok, G., & Edlund, M.-L. (2013). Mould growth on kiln-dried and air-dried timber. *European Journal of Wood and Wood Products*, 71(4), 473–481. <https://doi.org/10.1007/s00107-013-0699-y>.
- Khorassani, M., Pourmahdian, S., Taromi, F. A., & Nourhani, A. (2005). Estimation of Critical Pigment Volume Concentration in Latex Paint Systems Using Gas Permeation. *Iranian Polymer Journal*, pp. 1000–1007.
- Kulakowski, M. (2002). *Contribuição ao estudo da carbonatação em concretos e argamassas compostos com adição de sílica ativa* (Tese de Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Obtido de URL:<<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/3594/000390188.pdf?sequence=1>>.
- Kumar, M., & Verma, R. K. (2010). Fungi diversity, their effects on building materials, occupants and control– a brief review. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 69(9), 657–661.
- Lee, H. J., Kim, D. G., Lee, J. H., & Cho, M. S. (2012). A Study for carbonation degree on concrete using a phenolphthalein indicator and fourier-transform infrared spectroscopy. *International Journal of Civil, Environmental, Structural, Construction and Architectural Engineering*, 6(2), 95–101.
- Letícia, M. G., & Brazolin, S. (2012). Biodeterioração de materiais utilizados na construção civil: métodos de ensaio e uso de biocidas. Apresentado na XIV ENTAC - Encontro Nacional de Tecnologia do Ambiente Construído, São Paulo.
- Leung, M. H. Y., & Lee, P. K. H. (2016). The roles of the outdoors and occupants in contributing to a potential pan-microbiome of the built environment: a review. *Microbiome*, 4(1), 21. <https://doi.org/10.1186/s40168-016-0165-2>.

III-Análise da resistência de diferentes materiais de construção ao desenvolvimento de fungos

- Machado, A. (2006). *Uso de técnicas de detecção rápidas de fungos filamentosos na água* (Dissertação de Mestrado). Escola de Engenharia da Universidade do Minho. Obtido de URL:<<https://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/6153/1/Capitulo1e2.pdf>>.
- mVOC, (microbial Volatile Organic Compounds).(2014). Obtido 25 de Março de 2017, de URL:<<http://bioinformatics.charite.de/mvoc/#>>.
- MIL-STD-810G. (2008). Department of Defense Test Method Standard for Environmental Engineering Considerations and Laboratory Tests. (PDF). United States Department of Defense. Obtido de URL:<http://everyspec.com/MIL-STD/MIL-STD-0800-0899/MIL-STD-810G_12306/>.
- Moon, H. J. (2005). *Assessing mold risks in buildings under uncertainty* (PhD Thesis). Georgia Institute of Technology.
- Ndagijimana, M., Chaves-López, C., Corsetti, A., Tofalo, R., Sergi, M., Paparella, A., ... Suzzi, G. (2008). Growth and metabolites production by *Penicillium brevicompactum* in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*, 127(3), 276–283. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.07.019>.
- Pinheiro, S. (2003). *Registro fonte: Impacto da colonização do fungo Cladosporium Sphaerospermum sobre a argamassa do concreto* (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória. Obtido de URL:<<http://livros01.livrosgratis.com.br/cp133901.pdf>>.
- Polizzi, V., Adams, A., De Saeger, S., Van Peteghem, C., Moretti, A., & De Kimpe, N. (2012). Influence of various growth parameters on fungal growth and volatile metabolite production by indoor molds. *The Science of the Total Environment*, 414, 277–286. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.10.035>.
- Prussin, A. J., & Marr, L. C. (2015). Sources of airborne microorganisms in the built environment. *Microbiome*, 3, 78. <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0144-z>.
- Räsänen, V., & Penttala, V. (2004). The pH measurement of concrete and smoothing mortar using a concrete powder suspension. *Cement and Concrete Research*, 34(5), 813–820. <https://doi.org/10.1016/j.cemconres.2003.09.017>.
- Rosa, M. (2013). *Monitorização da Presença de Fungos com Interesse Clínico em Ambiente Hospitalar: Zonas de Banho como Potenciais Focos de Contaminação Fúngica* (Dissertação de Mestrado). Universidade dos Açores, Angra do Heroísmo. Obtido de URL:<<http://repositorio.uac.pt/handle/10400.3/2074>>.

- Rowan, N. J., Johnstone, C. M., McLean, R. C., Anderson, J. G., & Clarke, J. A. (1999). Prediction of toxigenic fungal growth in buildings by using a novel modelling system. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(11), 4814–4821.
- Samson, R. (2011). Ecology and general characteristics of indoor fungi. Em *Fundamentals of mold growth in indoor environments and strategies for healthy living* (pp. 101–116). Wageningen Academic Publishers, Wageningen. https://doi.org/10.3920/978-90-8686-722-6_5.
- Sanchez-Silva M., & Rosowsky David V. (2008). Biodeterioration of Construction Materials: State of the Art and Future Challenges. *Journal of Materials in Civil Engineering*, 20(5), 352–365. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)0899-1561\(2008\)20:5\(352\)](https://doi.org/10.1061/(ASCE)0899-1561(2008)20:5(352)).
- Sedlbauer, K. (2001). *Prediction of mould fungus formation on the surface of and inside building components* (PhD Thesis). Fraunhofer Institute for Building Physics, Stuttgart University. Obtido de URL:<https://www.ibp.fraunhofer.de/content/dam/ibp/en/documents/ks_dissertation_etcm1021-30729.pdf>.
- Simas, M. (2007). *Sistemas de proteção do betão face à carbonatação* (Dissertação de Mestrado). Universidade Técnica de Lisboa. Obtido de URL:<<https://fenix.tecnico.ulisboa.pt/downloadFile/395137460030/Disserta%C3%A7%C3%A3o.pdf>>.
- Sinogas, C., Alho, L., & Brito, I. (2003). Microbiologia Geral Princípios de Microbiologia. Universidade de Évora: Departamento de biologia. Obtido de URL:<<http://home.dbio.uevora.pt/~ibrito/micro/MICRO/MANUAL.pdf>>.
- Sutton, S. (2011). Accuracy of Plate Count. *Journal of validation technology*, 17(3), 42.
- Sterflinger, K., & Piñar, G. (2013). Microbial deterioration of cultural heritage and works of art - tilting at windmills? *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(22), 9637–9646. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5283-1>.
- Viitanen, Hannu, Vinha, J., Salminen, K., Ojanen, T., Peuhkuri, R., Paaianen, L., & Lähdesmäki, K. (2010). Moisture and Bio-deterioration Risk of Building Materials and Structures. *Journal of Building Physics*, 33(3), 201–224. <https://doi.org/10.1177/1744259109343511>.
- Visagie, C. M., Houbraken, J., Frisvad, J. C., Hong, S.-B., Klaassen, C. H. W., Perrone, G., Samson, R. A. (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, 78(Supplement C.), 343–371. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.001>.

- Wiktor, V., De Leo, F., Urzì, C., Guyonnet, R., Grosseau, P., & Garcia-Diaz, E. (2009). Accelerated laboratory test to study fungal biodeterioration of cementitious matrix. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63(8), 1061–1065. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2009.09.004>.

IV. Avaliação do risco de exposição de técnicos de laboratório a agentes biológicos e químicos

IV.1 Resumo

A exposição a agentes biológicos e químicos tem impactos negativos na nossa saúde e bem-estar, assim como na qualidade do ar interior dos edifícios (QAI). As atividades desenvolvidas em laboratórios de ensino e instituições de investigação são um exemplo entre outros, da exposição a estes agentes com inúmeros riscos associados para os técnicos expostos. Deste modo, o principal objetivo deste trabalho consistiu na avaliação do risco de exposição dos técnicos de um laboratório de investigação de um estabelecimento de ensino superior aos agentes biológicos e químicos. Para tal, realizaram-se amostragens ao ar interior de 3 salas (L1,L2 e L3) pertencentes a um laboratório e com características distintas em termos de área, ocupação e ventilação, no total de 6 amostragens compreendidas entre os meses de fevereiro a julho. A sala L1 apresenta uma área de cerca 20 m² e é constituída por duas câmaras climáticas, onde ocorrem ensaios com fungos. Esta sala não apresenta qualquer tipo de sistema de ventilação mecânico, a renovação do ar é promovida pelas infiltrações de ar não controladas através das frinchas de uma porta que liga à sala L2. A sala L2 ocupa uma área com cerca de 33 m², em que existe uma câmara climática e uma zona de escritório, onde existem sistemas de ventilação mecânico e a renovação do ar é promovida por uma conduta de insuflação/extração de ar (inativa) e as infiltrações de ar não controladas através das frinchas de uma porta (porta de saída para a nave de construções). Por fim, a nave de construções (sala L3) apresenta uma área total de aproximadamente 129 m², onde se encontram vários sistemas de ventilação mecânicos associados às câmaras climáticas e ao próprio edifício, para além de ventilação natural associada à circulação e mistura do ar interior e exterior. A avaliação da exposição aos agentes biológicos foi realizada com base em duas metodologias distintas, respetivamente amostragem ativa com recurso a uma bomba de extração de ar na avaliação da população de fungos e bactérias e a amostragem passiva na avaliação apenas da população de fungos. Nesta amostragem procedeu-se à colocação de caixas de Petri abertas com meio sólido para a sedimentação dos esporos fúngicos ou fragmentos presentes no ar ambiente, por ação da gravidade durante um certo período de tempo estabelecido. A avaliação da exposição aos agentes químicos e parâmetros físicos, tais como a temperatura, humidade relativa do ar, CO₂ e os COV totais foram efetuadas através de medições em continuo realizadas por equipamentos de medição eletrónicos. Os resultados obtidos da amostragem passiva aos fungos e da amostragem ativa às bactérias revelaram valores fora da gama de contagem de unidades de 20-200 colónias para os fungos e 20-80 colónias para as bactérias, mínimo

requerido pelos métodos aplicados. As concentrações resultantes da amostragem ativa aos fungos revelaram que o local L1 e L2 são os que apresentam uma maior concentração fúngica coincidentes com temperaturas elevadas, mas humidades relativas baixas. Os valores medidos de temperatura e humidade relativa do ar não apresentam qualquer risco para a saúde e conforto térmico dos técnicos. As concentrações de UFC não se encontram dentro do limite legal estabelecido pela legislação nacional, para se pode concluir sobre o risco que representam para os técnicos expostos às mesmas, teriam de ser realizadas novas avaliações. As medições em contínuo dos COV permitiram concluir que as suas concentrações medidas se encontram acima dos limites legais, sendo a exposição aos mesmos considerada de elevado risco para os técnicos. Enquanto a monitorização das concentrações de CO₂ encontram-se dentro do limite legal estabelecido pela legislação, não comportando qualquer risco para os técnicos. Por fim, foram ainda mencionadas algumas medidas de prevenção relativas à ventilação dos espaços, sendo fundamental a realização de 5 renovações por hora de forma a diminuir o risco de exposição aos agentes monitorizados.

IV.2 Introdução

No geral o ser humano passa diariamente, mais de 90% do seu tempo em locais fechados, sejam naves industriais, escolas, ginásios, hospitais, casas ou edifícios administrativos, estando na maioria das vezes sujeitos principalmente à exposição a agentes biológicos e químicos (Adams et al., 2016). O risco de exposição a estes agentes tem impactes negativos na saúde e no bem-estar da população, assim como na qualidade do ar interior dos edifícios (QAI), acabando deste modo por afetar principalmente os grupos populacionais especialmente mais vulneráveis devido ao seu estado de saúde ou idade (Guimarães, 2016). Integram-se no conceito de agentes biológicos, as bactérias, os fungos, os vírus e os parasitas. Com exceção dos vírus, que se multiplicam quando infetam células alvo, os agentes biológicos são seres vivos capazes de se desenvolverem e de se reproduzirem no ambiente em que se inserem desde que fatores, como por exemplo a temperatura e a humidade sejam favoráveis (Guimarães, 2016). A presença de teores elevados de humidade nestes ambientes, bem como a existência de ventilação inadequada contribuem para o desenvolvimento e proliferação destes agentes (Singh, Yu, & Kim, 2010). O aumento da prevalência de edifícios danificados pela humidade e a subsequente contaminação do ar interior por agentes biológicos pode contribuir para o aumento notável de doenças alérgicas. Os riscos associados à exposição a estes agentes geralmente podem-se dividir em três grupos: reações alérgicas (por exemplo, asma, rinite alérgica, pneumonite de hipersensibilidade, conjuntivites, tosse, dores de cabeça, entre outros), infeções (crescimento do fungo no organismo, por exemplo a aspergilose e o enfisema pulmonar) e as respostas tóxicas (Gorny et al., 2002). As reações alérgicas e infeções resultam da exposição a elevadas concentrações de esporos, células e fragmentos destes microrganismos em ambientes interiores. As reações tóxicas estão relacionadas principalmente com as toxinas fúngicas, exotoxinas bacterianas e componentes celulares como o β -1,3 glucano presente em conídios fúngicos que

são compostos tóxicos resultantes do metabolismo destes microrganismos. Estes produtos entram em contato com o organismo humano, a partir do ar, por inalação ou por absorção através da pele e podem produzir efeitos agudos, como as reações imunológicas e inflamatórias ou a longo prazo, pelas suas propriedades citotóxicas revelarem efeitos mutagénicos ou carcinogénicos (Gorny et al., 2002; Nunes, 2005; Sedlbauer, 2001). Os agentes químicos são representados principalmente pelos compostos orgânicos voláteis (COV) e pelo dióxido de carbono (CO₂). Os COV são emitidos por objetos/estruturas que maioritariamente existem no interior dos edifícios tais como carpetes, mobiliário, produtos de limpeza, tintas, perfumes, lacas e solventes, para além de serem subprodutos resultantes do metabolismo de fungos e bactérias (APA, 2009; Z. G. Nunes, 2005; Polizzi et al., 2012). O CO₂ é expelido naturalmente para os ambientes interiores também como subproduto do metabolismo dos seres vivos. Além disso, também é gerado em processos de combustão no exterior, que acabam por condicionar a QAI de um edifício (Magalhães, 2009). Deste modo, a exposição a estes compostos no interior de um edifício pode gerar sintomas muito similares aos mencionados na exposição aos agentes biológicos, conduzindo ao fenómeno conhecido como Síndrome do Edifício Doente (SED) (APA, 2009). Existem atividades onde o risco de exposição a estes agentes é elevado, como é o caso das atividades desenvolvidas em laboratórios de ensino e instituições de investigação, que acarretam elevados riscos para a saúde dos profissionais, como por exemplo as infeções e alergias causadas pela manipulação de uma grande diversidade de microrganismos, para além da exposição aos agentes químicos associados ao edifício e ao metabolismo principalmente de fungos e bactérias (Hwang, Park & Yoon, 2014; Rim & Lim, 2014). Apesar, da existência de legislação que impõe limites de exposição a estes agentes e de normas de higiene e segurança nestes setores de atividade, como forma de diminuir e evitar os riscos inerentes à sua exposição, é fundamental a aplicação de métodos de avaliação quantitativa, para o conhecimento da concentração dos mesmos, para se poderem desenvolver medidas de proteção adequadas (Guimarães, 2016). Desta forma, o principal objetivo deste trabalho consistiu na avaliação do risco de exposição dos técnicos de um laboratório de investigação de um estabelecimento de ensino superior aos agentes biológicos e químicos. Adicionalmente, para uma melhor avaliação da QAI realizaram-se a título complementar a medição de alguns parâmetros físicos.

IV.3 Material e Métodos

As amostragens microbiológicas ao ar interior e a medição dos parâmetros físicos e químicos ocorreram numa instituição de ensino superior na área de Engenharia, mais precisamente em espaços pertencentes a um laboratório afeto ao Departamento de Civil da FEUP. As determinações experimentais dos agentes biológicos em estudo foram executadas na ESTGV, mais concretamente no Laboratório de Bioengenharia, associado ao Departamento de Ambiente. É de salientar que as amostragens realizadas no laboratório afeto à FEUP foram concretizadas durante o período laboral, decorrendo entre os meses de fevereiro a julho do presente ano, tendo-se definidos seis momentos de amostragem. Dois momentos ocorreram no

inverno (21 de fevereiro e 7 de março) e os restantes 4 momentos no período da primavera/verão (4 de abril, 20 de maio, 30 de maio e 27 de junho).

IV.3.1 Caracterização do local de estudo

O local de estudo para a avaliação do risco de exposição a agentes biológicos e químicos foi um laboratório afeto ao departamento de Engenharia Civil da instituição em causa. Este laboratório foi o escolhido para o presente estudo, pois encontrava-se em desenvolvimento um trabalho experimental que envolvia a manipulação de microrganismos fúngicos, com o objetivo de incrementar estudos avançados associados aos conceitos de patologias e reabilitação do património edificado. O laboratório era composto por um conjunto de salas e uma nave de construções, ocupando uma área de aproximadamente 850 m². As amostragens realizadas à qualidade microbiológica do ar interior e as medições dos parâmetros físicos e químicos foram realizadas nas salas L1, L2 e L3 (nave de construções) delineadas a vermelho, de acordo com a Figura IV.1. A sala L1 apresentava uma área com cerca de 20 m² e era constituída por duas câmaras climáticas walk-in, onde numa delas decorreram os ensaios fúngicos (assinalada com uma cruz a sua localização na sala). Esta sala não apresentava qualquer tipo de sistema de ventilação mecânico, a renovação do ar era promovida pelas infiltrações de ar não controladas através das frinchas na envolvente, nomeadamente de uma porta que ligava à sala L2. A sala L2 ocupava uma área com cerca de 33 m², em que existia uma câmara climática de ensaios de envelhecimento acelerado e uma zona onde se encontravam alguns alunos a desenvolver trabalhos de investigação. Neste espaço para além do material de escritório (por exemplo, computadores, telefones, entre outros), existiam sistemas de ventilação mecânico (como aquecedores e ventoinhas) e a renovação do ar era promovida por uma conduta de insuflação/extração de ar (inativa) e as infiltrações de ar não controladas através das frinchas de uma porta (porta de saída para a nave de construções). Por fim, a nave de construções (sala L3) apresentava uma área total de aproximadamente 129 m², onde se encontravam vários sistemas de ventilação mecânicos associados às câmaras climáticas e ao próprio edifício, para além de ventilação natural associada à circulação e mistura do ar interior e exterior (existia uma porta de garagem por onde se realizam as cargas e descargas de materiais). Estas salas encontravam-se ao nível do solo e segundo as condições referidas anteriormente, as salas L1 e L2 eram salas pequenas de reduzido arejamento, enquanto a sala L3 (nave de construções) era uma sala maior que tinha um bom arejamento. Os 3 locais eram potencialmente zonas de reduzida higienização, uma vez que, eram locais onde havia manipulação de agentes biológicos e por outro lado na sala L3 verificava-se a manipulação de diversos materiais para a realização de inúmeros ensaios como cimento, blocos de cimento, tintas, entre outros. Estes materiais tanto libertam como acumulam poeiras e com a mistura de correntes de ar acabam por condicionar a qualidade do ar e a higienização das restantes s

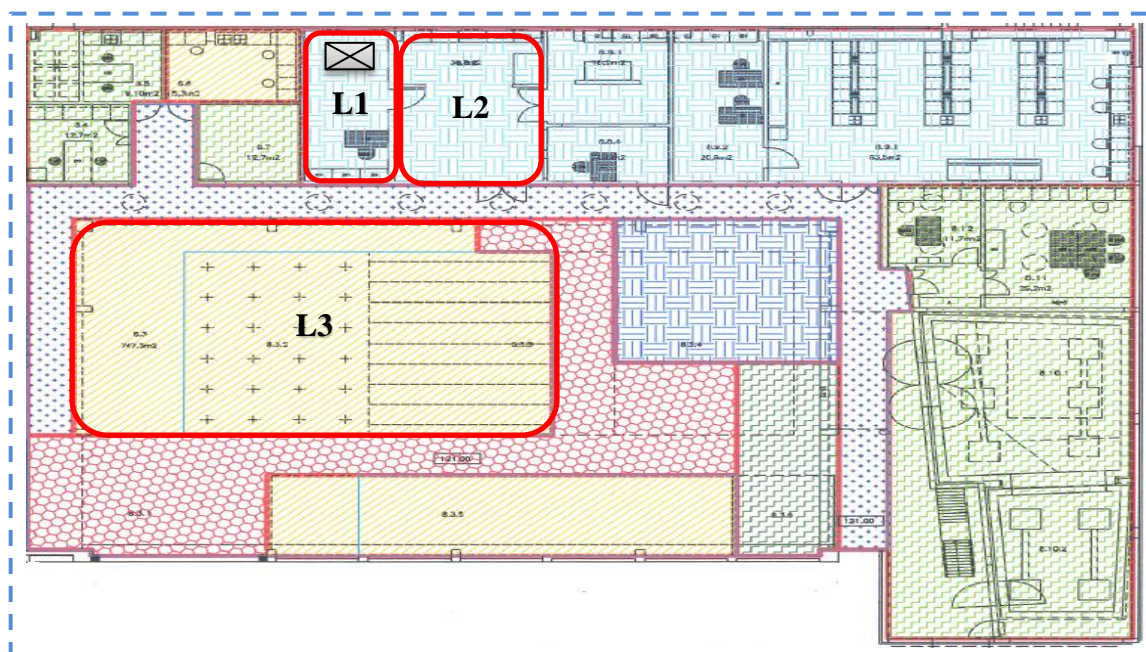


Figura IV.1: Planta do laboratório do Departamento de Engenharia Civil, em estudo [escala 1-200].

IV.3.2 Avaliação da exposição a agentes biológicos

A avaliação da exposição a agentes biológicos foi baseada em duas metodologias: (i) amostragem ativa e (ii) amostragem passiva. As amostras foram sempre efetuadas em triplicado para cada local, para além dos respetivos meios de controlo ou brancos importantes no despiste de possível contaminação da amostra. As amostragens para ambos os métodos foram realizadas nos três pontos definidos anteriormente para o laboratório em estudo: sala L1, sala L2 e nave de construções (sala L3), bem como no exterior. Na localização dos pontos de amostragem no interior do edifício teve-se em conta as considerações estabelecidas pela Agência Portuguesa do Ambiente - APA (2015). A avaliação do risco é calculada mediante a comparação das UFC quantificadas no exterior do edifício. Com este objetivo foi realizado um procedimento equivalente no interior e no exterior do LFC.

IV.3.2.1 Amostragem ativa

O sistema de amostragem ativo era composto por uma bomba (KMS NØZZNA18), um porta-filtros de plástico, um funil na extremidade do tubo de captação de ar para maximizar a entrada de ar, como esquematizado na Figura IV.2b. Um dos principais componentes físicos deste método é o filtro usado, de nitrato de celulose com um tamanho de poros de $0,45\mu\text{m}$ (Sartorius) (Abelho, 2013)

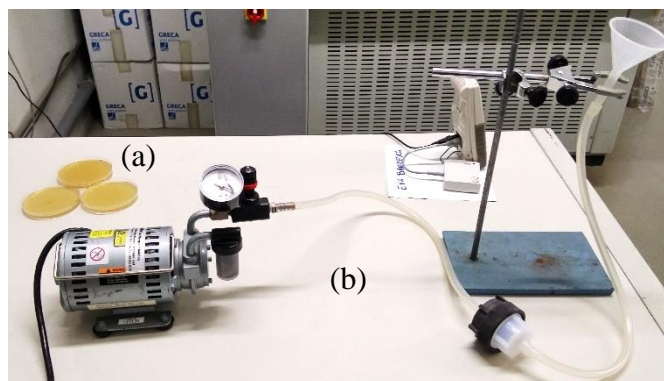


Figura IV.2: Montagem para a avaliação da exposição a agentes biológicos: (a) Método passivo; (b) Método ativo.

Antes do início dos ensaios foi sempre realizada a calibração do caudal da bomba para um caudal médio de 14,3 L/min, segundo trabalhos similares. O tempo de amostragem e volume foram otimizados ao longo das 6 campanhas efetuadas (Tabela IV.1), sendo que o volume pretendido segundo a legislação situava-se entre os 200 e 300 litros de ar, por forma a se obterem valores recomendáveis de UFC por caixa (Jardim et al., 2015; Sudharsanam et al., 2012). Após as amostragens, os filtros foram colocados nas caixas contendo os meios sólidos Plate Count Agar (Sigma-Aldrich) e Sabouraud Chloramphenicol Agar (Bioakar), posteriormente colocadas a incubar, a uma temperatura de 27°C e durante 24-48 horas para as bactérias e durante 7 dias para os fungos. Por fim, procederam-se às contagens tendo em consideração a literatura definiu-se que o número de unidades formadoras de colónias válidas por caixa era de 20 a 80 para as bactérias e de 10 a 100 para os fungos (ASTM.D5465-93, 2004; Decreto Lei n.º 236, 1998).

Tabela IV.1: Informação sobre a amostragem da QAI para os diferentes dias de amostragem.

Dias de amostragem	Q _{bomba} (L/min)	tempo _{amostragem} (min)	V _{amostragem} (L)
21 fevereiro	14,30 ±0,28	20	289,8
7 de março		15	217,0
4 de abril		10	144,1
2 de maio		10	144,1
30 de maio		5	142,5
27 de junho		20	285,0

IV.3.2.2 Amostragem passiva

Na amostragem passiva pretendeu-se avaliar apenas a população de fungos, pelo que as caixas de Petri contendo o meio sólido Sabouraud Chloramphenicol Agar (Bioakar) foram expostas

ao ar durante 30 minutos (Figura IV.2a)(Jardim et al., 2015). Após a incubação a uma temperatura de 27°C numa incubadora (ISCO- FTD250) e durante 7 dias, seguiram-se as contagens de UFC. Sendo consideradas as caixas de Petri que contabilizassem entre 20 a 200 colónias (Abelho, 2013; ASTM.D5465-93, 2004; Jardim et al., 2015). Posteriormente, os resultados das contagens foram expressos em UFC/m³ de ar amostrado, segundo a Equação.2 definida como equação de Omeliansky (Hayleeyesus & Manaye, 2014):

$$N = 5a \times 10^4 (bt)^{-1}, \quad (2)$$

onde o N é o número de UFC/m³ de ar, o *a* é o número de colónias por caixa de Petri, o *b* representa a área da superfície da caixa (cm²) e o *t* é o tempo de exposição (minutos).

IV.3.3 Avaliação da exposição a agentes químicos

A medição dos agentes químicos e adicionalmente dos parâmetros físicos ocorreu aquando das amostragens microbiológicas à QAI do laboratório em estudo. A medição dos parâmetros tais como a temperatura, a humidade relativa do ar e o CO₂ foi executada em contínuo por equipamentos de medição eletrónicos (Chauvin Arnoux CA-1510; Telaire T7000 Series) que foram colocados nos 3 locais de amostragem (sala L1, L2 e L3). Os COV totais também foram alvo de medições contínuas utilizando um equipamento (PhoCheck TIGER) que é composto por um conjunto de sensores que permitem a deteção de uma vasta gama de COV.

IV.4 Resultados obtidos e discussão

IV.4.1 Análise da exposição aos agentes biológicos

Os microrganismos patogénicos podem ser perigosos em concentrações extremamente baixas, tais como algumas bactérias e fungos. Estes microrganismos, mesmo que não sejam detetáveis podem provocar efeitos tóxicos ou alérgicos através da produção dos seus metabólitos (como as micotoxinas ou endotoxinas) (EU-OSHA, 2017). Acrescentando a este facto, os agentes biológicos podem crescer, e um pequeno número de microrganismos pode-se reproduzir em períodos muito curtos, desde que as condições ambientais sejam as favoráveis, nomeadamente a temperatura e humidade. Os valores de humidade e temperatura desempenham um papel muito importante no que respeita ao crescimento microbiano. Contudo, apesar de não apresentarem um valor definido na legislação nacional sobre a QAI são referenciados como parâmetros de conforto térmico. Pelo que adicionalmente neste trabalho procedeu-se à análise desses parâmetros.

A avaliação do risco de exposição dos trabalhadores em laboratórios de investigação a agentes biológicos foi quantificada por amostragem ativa e passiva como referido anteriormente.

Pretendeu-se aplicar a amostragem passiva para a avaliação da QAI resultante da exposição à população fúngica, de modo a confirmar os resultados entre metodologias de amostragem e avaliar a compatibilidade dos métodos. Contudo a amostragem passiva de fungos nos diferentes locais revelou valores de UFC muito baixos. Deste modo, as contagens de UFC obtidas não foram válidas, pois não se encontravam dentro da gama de contagem referenciada anteriormente (20 a 200 UFC/caixa). Pelo que a análise foi realizada com base apenas nos resultados obtidos no método de amostragem ativo, considerando desde já que os dois métodos aplicados não são concordantes entre si.

Na amostragem ativa pretendeu-se avaliar a exposição dos técnicos de laboratório a bactérias e fungos. A análise à exposição a bactérias nos 3 locais de amostragem não foi válida, pois os valores obtidos encontram-se muito abaixo do intervalo que valida a sua contagem em caixas de Petri (20 a 80 UFC). No que respeita à avaliação da QAI relativamente à exposição à população fúngica, numa perspetiva geral, denota-se um aumento da sua presença ao longo do tempo, apresentado uma descida na última amostragem para valores próximos do primeiro dia de amostragem (Gráfico IV.1). Relativamente aos locais, os valores registados para as salas L1 e L2 são sempre superiores aos obtidos para o L3, excetuando o dia 30 de maio (5ª amostragem). De facto as salas L1 e L2 são semelhantes em termos de características de construção, pois são espaços confinados com reduzida ventilação e a sala L3 é um espaço mais amplo ocorrendo por isso um maior fator de diluição. Na mesma figura representa-se a variação da temperatura ao longo do período de amostragem, para os respetivos espaços em estudo. Segundo a sua interpretação, verifica-se que nas três salas do laboratório em estudo existe um ligeiro aumento da temperatura ao longo do período em análise. De um modo geral, a gama de temperatura variou entre os 16 °C e os 28°C.

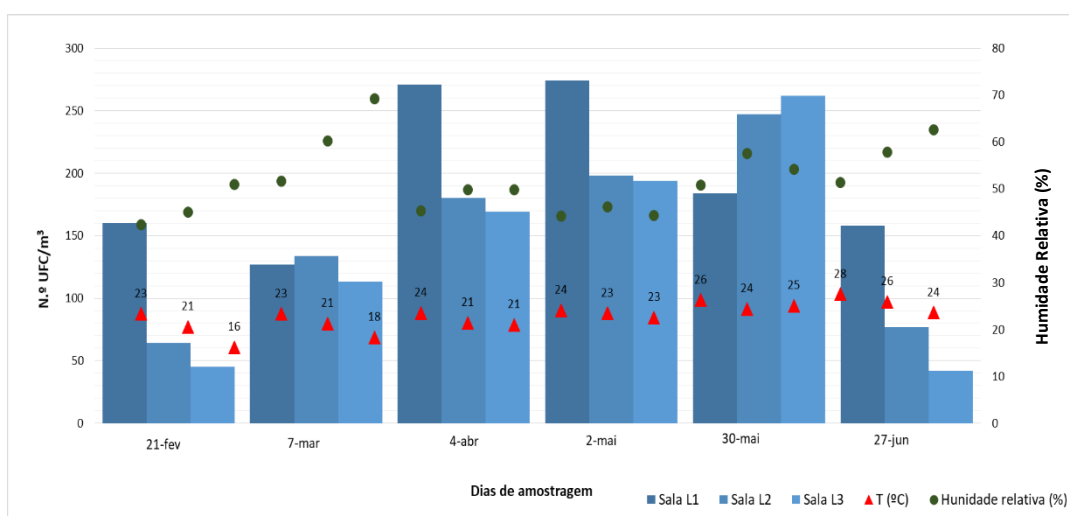


Gráfico IV.1: Variação da concentração de fungos, temperatura e humidade relativa ao longo do tempo de amostragem para os locais em estudo.

A temperatura é um fator fundamental para o desenvolvimento dos fungos, sendo que estes toleram mais facilmente o frio do que temperaturas muito elevadas. A maioria das espécies desenvolve-se entre os 0-50 °C, denotando-se um maior crescimento segundo condições ideais que se situam entre os 20-40°C para a maioria dos fungos mesófilos (Sedlbauer, 2001) que são normalmente os presentes em ambiente interiores. A tendência observada ao nível dos locais com maior concentração de fungos (L1 e L2) é coincidente com os locais com maior temperatura.

Os resultados da monitorização da humidade relativa do ar para os diferentes locais em estudo, segundo o período de amostragem são também apresentados no Gráfico IV.1. Os resultados obtidos demonstram que existem variações significativas na humidade do ar das salas em estudo. De acordo com a WHO(2009), os fungos no interior dos edifícios germinam e crescem rapidamente em locais com uma humidade relativa próxima do nível de saturação (<100%). Comparando os resultados obtidos da humidade relativa e da concentração de fungos denota-se uma contradição, visto que as salas com elevada humidade relativa apresentaram uma baixa concentração de fungos. Neste caso, os fungos desenvolveram-se significativamente em ambientes com humidades inferiores ao nível de saturação, facto que comprova a influência de outras condições ambientais no respetivo crescimento.

Segundo os estudos de Frankel et al. (2012), a estação do ano afeta significativamente as concentrações microbianas internas dos edifícios, que são influenciadas pela temperatura, umidade relativa e pelas taxas de troca de ar entre o ar exterior e interior. Desta forma, os resultados obtidos demonstram que durante a estação do ano primavera/verão (de abril a junho) foram onde se registaram as temperaturas mais elevadas (máximas que rondam os 25-28°C) e simultaneamente houve períodos de humidade relativa baixa (mínimas entre 44-51°C) para os locais onde no geral se registaram concentrações elevadas de fungos (salas L1 e L2). De acordo com os trabalhos desenvolvidos por Dacarro et al. (2003) na avaliação da QAI em edifícios escolares, também se confirma que fatores ambientais como a temperatura, humidade relativa do ar e as taxas de ventilação influenciam o desenvolvimento microbiano e a QAI dos edifícios/espacos principalmente os mais confinados. Deste modo, confirma-se que os resultados obtidos para as salas com diferentes características podem ter sido condicionados pelos fatores ambientais e por uma ineficaz ventilação destes espacos o que proporcionou uma maior concentração de fungos.

Tal como o referido anteriormente, na legislação nacional relativa à QAI estes dois parâmetros (temperatura e humidade) não possuem valores de referência. Contudo, numa perspetiva de análise do conforto térmico foram usados valores de normas. Os resultados obtidos da monitorização da temperatura interior das salas foram comparados com um intervalo de referência definido pela norma europeia EN 15251(2007), que estipula que a temperatura de conforto no interior de um edifício deve-se encontrar na gama dos 20-26°C. Condição que no geral se encontra em conformidade com os resultados obtidos, apesar de no dia 27 de junho se

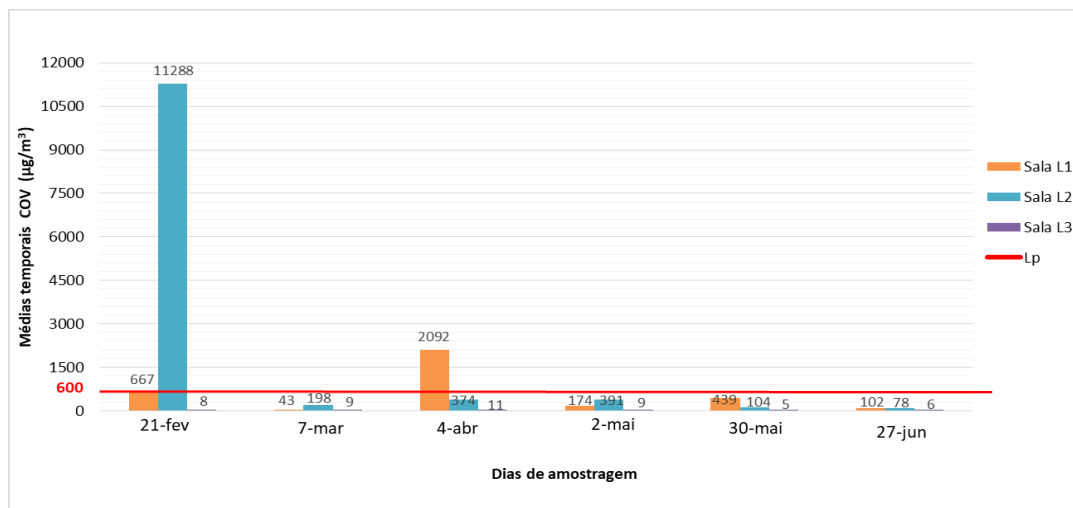
ter verificado um ligeiro aumento da temperatura para a sala L1. No que respeita à humidade, segundo os estudos de Simonson et al. (2001), este relaciona vários parâmetros relativos à saúde e qualidade do ar interior em função da humidade relativa, onde definiu o intervalo de 30% a 55% de humidade como sendo o limite ideal de variação da humidade. Comparando os resultados obtidos com os do autor, verificamos que em alguns dias de amostragem as salas L2 e L3 não estão dentro desta gama de humidade ideal ao nível do conforto térmico, contrariamente à sala L1.

De acordo com a legislação nacional em vigor, na avaliação da qualidade microbiológica do ar interior (QMAI) a concentração de colónias fúngicas no interior das salas não pode ser superior à concentração detetada no exterior do laboratório em estudo (171 UFC/m³). Assim, perante a análise dos resultados obtidos das amostragens registaram-se situações de não conformidade legal principalmente na sala L1, da 3^a à 5^a campanha de amostragem, que podem colocar em risco os técnicos expostos. Efetivamente foram quantificadas 271, 274 UFC/m³ em L1 na 3^a e 4^a campanha, respetivamente e 262 UFC/m³ em L3 na 5^a campanha de amostragem. Deste modo, segundo a portaria 353-A/2013 de 4 de dezembro teriam de ser realizadas novas avaliações com base na análise de novos critérios de conformidade. Estes critérios definem a verificação da ausência de crescimento fúngico em qualquer superfície e a realização de uma análise da amostra às espécies e misturas de espécies presentes e respetivas concentrações.

IV.4.2 Análise da exposição aos agentes químicos

IV.4.2.1 Avaliação da concentração de COV totais

Na tentativa de perceber se a atividade microbiológica poder ser considerada uma possível fonte de COV no ambiente das salas, efetuaram-se medições de COV totais no interior de cada uma das três salas (L1, L2 e L3). Os resultados da monitorização efetuada encontram-se representados no Gráfico IV.2, assim como os valores legais estipulados pela legislação em vigor. O Gráfico IV.2 representa a variação da concentração dos COV totais ao longo dos diferentes dias de amostragem, para os espaços em estudo, denotando-se globalmente, que não existe um perfil evolutivo tendencial. Contudo pode-se afirmar que existem situações opostas no primeiro dia em relação ao último dia de amostragens, representando a situação de maior e menor concentração, respetivamente. Denota-se que os valores obtidos de COV totais para as salas L1 e L2 atingem concentrações superiores, relativamente às monitorizações efetuadas para a nave das construções (sala L3). Para ambas as salas (L1 e L2) nos dias 21 de fevereiro e 7 de março as concentrações medidas foram muito superiores ao limiar de proteção (Lp) imposto pela Portaria nº 353-A/2013 de 4 de dezembro. Esta situação leva à classificação da exposição dos investigadores presentes nos espaços em estudo em risco médio.



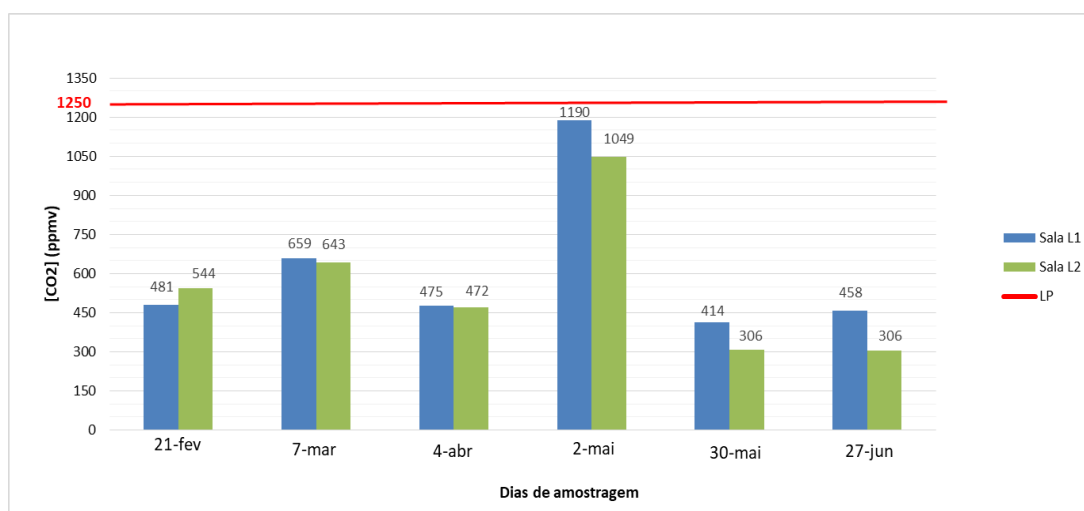
Lp – Limiar de proteção legal para os COV (600 µg /m³)

Gráfico IV.2: Variação da concentração de COV totais ao longo do tempo de amostragem para os locais em estudo.

Confrontando estes resultados com as concentrações de fungos, verifica-se que não são coincidentes, visto que o resultado obtido no dia 21 de fevereiro não coincidiu com uma concentração máxima de fungos (Gráfico IV.1), contrariamente aos resultados de 4 de abril. Deste modo, os ensaios que ocorriam com fungos na sala L1, as emissões da tinta dos provetes em ensaio e a fraca ventilação dos espaços podem ter interferido nas medições e levarem à obtenção, principalmente na sala L2, de um nível de COV tão elevado. Segundo (Moullat, Robine, Ramalho, & Oturan, 2008) a determinação de COV totais permite a deteção da presença de fungos em espaços interiores, porém poucos destes compostos são específicos dos fungos. Desta forma, a medição de Compostos Orgânicos Voláteis Microbiológicos (COVM) torna-se ineficiente, devido às diversas fontes de emissão interiores e exteriores e a fatores como o elevado isolamento das habitações e a ventilação insuficiente que conduzem a concentrações elevadas de COV nos interiores .

IV.4.2.2 Avaliação da concentração de CO₂

Segundo o guia técnico da (APA, 2009), nos ambientes interiores, os níveis de CO₂ são indicadores da eficiência da ventilação. Elevadas concentrações de CO₂ evidenciam a falta de renovação de ar nos locais e uma possível acumulação de outros gases tóxicos e odores, pois a ineficaz ventilação não permite a diminuição dos mesmos para concentrações aceitáveis. A monitorização das concentrações de CO₂ foram efetuadas apenas para os locais L1 e L2, pelas características inerentes a estes dois espaços ao nível da sua área, ventilação e nível de ocupação. Deste modo, o Gráfico IV.3 representa a variação da concentração de CO₂ para os diferentes dias de amostragem nos 2 espaços em estudo.



Lp – Limiar de proteção legal para o CO₂ (1250 ppmv).

Gráfico IV.3: Variação do CO₂ ao longo do tempo de amostragem para os locais L1 e L2.

Segundo a análise do gráfico é possível denotar-se que ocorreu uma tendência de crescimento até ao dia 2 de maio (4^a amostragem) com posterior decréscimo até ao final do período de amostragens. Ao longo do período de amostragem a sala L1 destaca-se relativamente à sala L2, atingindo no seu interior concentrações ligeiramente mais elevadas de CO₂. Deste modo, os resultados obtidos podem estar relacionados com o facto da sala L1 ser um espaço mais confinado, com uma fraca ventilação que não assegura a distribuição e renovação do ar interior de forma eficiente. Apesar, de ser uma sala que apresenta um nível ocupacional permanente baixo comparativamente à sala L2, a porta que liga as duas salas acaba também por condicionar as concentrações de CO₂ devido às correntes de ar entre as duas que são inevitáveis mesmo que esta se encontre fechada. Ao longo do período de investigação o limiar de proteção para os dois espaços segundo a legislação nacional não foi ultrapassado (1250 ppmv), situação favorável contrapondo com a situações encontrada para os parâmetro abordados anteriormente, fungos e COV.

IV.4.3 Medidas de prevenção face à exposição aos agentes biológicos e químicos

As propostas de medidas que devem ser implementadas para a diminuição do risco de exposição dos ocupantes do laboratório a agentes biológicos e químicos é a manutenção de ventilação geral dos espaços, combinando a insuflação de ar fresco e a exaustão do ar interior. Esta situação decorre do facto de não haver um ponto de geração de poluente, e considerando que as salas onde há maior foco de emissão já estão fisicamente delimitadas. Para que esta ventilação seja

efetiva deve-se garantir a renovação do ar interior que terá que ser dimensionado de forma a garantir 5 a 8 renovações/hora (Nunes, 2006). Considerando as áreas das salas e o respetivo pé direito, as salas deviam garantir 300 e 495 m³/h para a sala L1 e L2, respetivamente. Pode-se optar por fazer a insuflação forçada para garantir este caudal de entrada de ar renovado, garantido a exaustão natural, ou vice-versa, sendo normalmente a primeira opção a mais aplicada (Tabela IV.2).

Tabela IV.2: Cálculo das renovações/hora para as salas que apresentaram um maior risco de exposição a agentes biológicos e químicos (Nunes, 2006).

Salas	Área (metros)	Altura (metros)	Volume ar insuflado (m ³)	Qar renovado (m ³ /h)	Renovação/ hora
L1	20	3	60	300	5
L2	33	3	99	495	
L3	129	7	903	4515	

IV.5 Conclusão

A avaliação do risco de exposição dos técnicos de laboratório a agentes biológicos e químicos foi efetuada em 3 salas pertencentes a um laboratório de investigação de um estabelecimento de ensino superior. Sendo sujeitas a um conjunto de métodos de amostragem e medições contínuas, permitindo assim chegar às seguintes conclusões que a seguir se apresentam:

Os resultados da amostragem passiva para a avaliação da QAI resultante da exposição aos fungos, revelou resultados de UFC muito baixos e fora da gama de contagem (20 a 200 UFC/caixa). Situação semelhante sucedeu na análise à exposição a bactérias através da aplicação do método ativo nos 3 locais de amostragem.

A avaliação da QAI através da monitorização ativa aos fungos, permitiu concluir que as salas L1 e L2 são as que apresentam uma maior concentração fúngica. Para além, desta tendência observada nestes locais (L1 e L2) ser coincidente com os locais com maior temperatura. Os resultados relativos à humidade relativa foram contraditórios, pois as salas com elevada humidade relativa apresentaram uma reduzida concentração de fungos. Este facto foi indicativo de que os fungos se desenvolveram em ambientes com humidades inferiores ao nível de saturação. A influência das estações do ano Inverno e Primavera/Verão associadas aos diferentes períodos de amostragem também foi registada.

A legislação nacional relativa à QAI não possui valores de referência para a temperatura e humidade relativa do ar, assim os valores medidos foram comparados a valores presentes na

literatura no âmbito da temática da QAI, que permitiram concluir que os espaços amostrados apresentam valores de temperatura e humidade relativa que não põe em risco a saúde e o conforto térmico dos técnicos que se encontram expostos aos mesmos.

Perante a análise dos resultados obtidos para as concentrações de UFC das amostragens registaram-se situações de não conformidade legal que poderiam colocar em risco os técnicos, mas segundo a portaria 353-A/2013 de 4 de dezembro, teriam de ser realizadas novas avaliações com base na análise de novos critérios de conformidade para aferir se realmente essas concentrações poderiam colocar em risco quem se encontra-se exposto às mesmas.

As medições de COV para ambas as salas L1 e L2 nos dias 21 de fevereiro e 7 de março, foram indicativas de concentrações medidas muito superiores ao limiar de proteção (Lp) imposto pela portaria nº 353-A/2013, de 4 de dezembro. Esta situação levou à classificação da exposição dos investigadores presentes nos espaços em estudo em risco médio.

A monitorização das concentrações de CO₂ foram efetuadas apenas para os locais L1 e L2, pelas características inerentes a estes dois espaços. Ao longo do período de amostragem a sala L1 destacou-se relativamente à sala L2, atingindo no seu interior concentrações ligeiramente mais elevadas de CO₂, mesmo assim estas encontravam-se dentro do limiar de proteção imposto pela legislação, concluindo-se que estas não apresentam qualquer risco de exposição.

De acordo com os resultados obtidos para a exposição aos agentes biológicos e químicos foram também propostas medidas de prevenção para diminuição do risco de exposição a estes agentes relativamente à ventilação ineficiente denotada em alguns espaços. Com base na literatura foi calculado que seriam necessárias 5 renovações de ar por hora tendo em conta as características distintas dos espaços em estudo.

IV.6 Referências

- Abelho, M. (2013). Protocolos de Microbiologia Ambiental : parte 1 – métodos básicos em microbiologia .(PDF). Escola Superior Agrária de Coimbra. Obtido de URL:<http://www.esac.pt/Abelho/MicroAmbiental/Protocolos%5B1%5D_2011_2012.pdf>.
- Abelho, M. (2013). Protocolos de Microbiologia Ambiental: parte 3 - microbiologia ambiental aplicada .(PDF). Escola Superior Agrária de Coimbra. Obtido de URL:<http://www.esac.pt/Abelho/MicroAmbiental/Protocolos%5B3%5D_2012_2013.pdf>

- Adams, R. I., Bhangar, S., Dannemiller, K. C., Eisen, J. A., Fierer, N., Gilbert, J. A., Bibby, K. (2016). Ten questions concerning the microbiomes of buildings. *Building and Environment*, 109, 224–234. <https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2016.09.001>.
- APA, (Agência Portuguesa do Ambiente).(2009). Qualidade do ar em espaços interiores : um guia técnico. Obtido de URL:<https://www.apambiente.pt/_zdata/Divulgacao/Publicacoes/Guias%20e%20Manuais/manual%20QArInt_standard.pdf>.
- ASTM.D5465-93. (2004). Standard Practice for Determining Microbial Colony Counts from Waters Analyzed by Plating Methods . (PDF). ASTM International. Obtido de URL:<<ftp://185.72.26.245/Astm/2/01/Section%2011/ASTM1102/PDF/D5465.pdf>>.
- Bennett, J. W., & Inamdar, A. A. (2015). Are Some Fungal Volatile Organic Compounds (VOCs) Mycotoxins? *Toxins*, 7(9), 3785–3804. <https://doi.org/10.3390/toxins7093785>.
- Dacarro, C., Picco, A. M., Grisoli, P., & Rodolfi, M. (2003). Determination of aerial microbiological contamination in scholastic sports environments. *Journal of Applied Microbiology*, 95(5), 904–912.
- Decreto lei n.º 236/98.(1998). Proteger o meio aquático e melhorar a qualidade das águas em função dos seus principais usos. *Diário da República I.ª Série-A*. Nº 176 (01-08-1998), 3676-3722.
- EN 15251. (2007). Indoor environmental input parameters for design and assessment of energy performance of buildings- Addressing Indoor air Quality, Thermal Environment, Lighting and Acoustics. (PDF).
- EU-OSHA, E. A. for S. and H. at W. (2017). E-Facts-53- Risk assessment for biological agents. (PDF). Obtido de URL:<http://www.osha.mdsz.gov.si/resources/files/pdf/53_risk-assessment-biological-agents.pdf>.
- Frankel, M., Bekö, G., Timm, M., Gustavsen, S., Hansen, E. W., & Madsen, A. M. (2012). Seasonal Variations of Indoor Microbial Exposures and Their Relation to Temperature, Relative Humidity, and Air Exchange Rate. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(23), 8289–8297. <https://doi.org/10.1128/AEM.02069-12>.
- Gorny, R. L., Reponen, T., Willeke, K., Schmechel, D., Robine, E., Boissier, M., & Grinshpun, S. A. (2002). Fungal fragments as indoor air biocontaminants. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(7), 3522–3531.

- Guimarães, H. (2016). *Avaliação do risco de exposição a agentes biológicos: reprodutibilidade dos métodos Dgs, ntp 833 e miar(bio) em matadouros* (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto. Obtido de URL:<<https://repositorio-aberto.up.pt/handle/10216/85900>>.
- Hayleeyesus, S. F., & Manaye, A. M. (2014). Microbiological Quality of Indoor Air in University Libraries. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(Suppl 1), S312–S317. <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014C807>
- Hwang, S. H., Park, H. H., & Yoon, C. S. (2014). Analysis of variation in total airborne bacteria concentration to assess the performance of biological safety cabinets in microbial laboratories. *Safety and Health at Work*, 5(1), 23–26. <https://doi.org/10.1016/j.shaw.2014.01.001>.
- Jardim, D., Diegues, P., Santiago, A., Matias, P., Reis, V., Matos, J., Francisco, S. (2015). Metodologia de avaliação da qualidade do ar no interior de edifícios de comércio e serviços no âmbito da Portaria 353-A/2013, de 4 dezembro. (PDF). Agência Portuguesa do Ambiente em parceria com a Direção-Geral da Saúde. Obtido de URL:<https://www.apambiente.pt/_zdata/DAR/Ar%20Interior/Metodologia_Avaliacao_Qualidade_Ar_Interior_1.0.pdf>.
- Magalhães, A. (2009). *Avaliação do contributo na qualidade do ar interior hospitalar da humidade e dos fungos* (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto. Obtido de URL:<<http://repositorio-aberto.up.pt/handle/10216/66711>>.
- Method 8260D. (2017). Volatile organic compounds by gas chromatography/mass spectrometry. (PDF). National Institute for Occupational Safety and Health. Obtido de URL:<https://www.epa.gov/sites/production/files/2017-04/documents/method_8260d_update_vi_final_03-13-2017.pdf>
- Moularat, S., Robine, E., Ramalho, O., & Oturan, M. A. (2008). Detection of fungal development in a closed environment through the identification of specific VOC: demonstration of a specific VOC fingerprint for fungal development. *The Science of the Total Environment*, 407(1), 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.08.023>
- Nunes, F. (2006). *Segurança e higiene do trabalho: manual técnico*. Edições Gustave Eiffel.
- Nunes, Z. (2005). *Estudo da qualidade microbiológica do ar de ambientes internos climatizados* (Dissertação de Mestrado). Instituto de Controle da Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro. Obtido de URL:<http://bdtd.ibict.br/vufind/Record/FCRZ_21bbbedd7cf54e63286445d6ca33c496>

- Polizzi, V., Adams, A., De Saeger, S., Van Peteghem, C., Moretti, A., & De Kimpe, N. (2012). Influence of various growth parameters on fungal growth and volatile metabolite production by indoor molds. *The Science of the Total Environment*, 414, 277–286. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.10.035>.
- Rim, K.-T., & Lim, C.-H. (2014). Biologically hazardous agents at work and efforts to protect workers health: a review of recent reports. *Safety and Health at Work*, 5(2), 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.shaw.2014.03.006>.
- Sedlbauer, K. (2001). *Prediction of mould fungus formation on the surface of and inside building components* (PhD Thesis). Fraunhofer Institute for Building Physics, Stuttgart University. Obtido de [URL:<https://www.ibp.fraunhofer.de/content/dam/ibp/en/documents/ks_dissertation_e_tcm1021-30729.pdf>](https://www.ibp.fraunhofer.de/content/dam/ibp/en/documents/ks_dissertation_e_tcm1021-30729.pdf).
- Simonson, C. J., Salonvaara, M., & Ojanen, T. (2001). Improving indoor climate and comfort with wooden structures. *VTT Publications*.
- Singh, J., Yu, C. W. F., & Kim, J. T. (2010). Building pathology, investigation of sick buildings - toxic moulds. *Indoor and Built Environment*, 19(1), 40–47. <https://doi.org/10.1177/1420326X09358808>.
- Sudharsanam, S., Swaminathan, S., Ramalingam, A., Thangavel, G., Annamalai, R., Steinberg, R., Srikanth, P. (2012). Characterization of indoor bioaerosols from a hospital ward in a tropical setting. *African Health Sciences*, 12(2), 217–225. <https://doi.org/10.4314/ahs.v12i2.22>.
- WHO. (2009). WHO guidelines for indoor air quality: dampness and mould.(PDF). WHO Regional Office for Europe. Obtido de [URL:<http://www.who.int/indoorair/publications/7989289041683/en/>](http://www.who.int/indoorair/publications/7989289041683/en/).

V. Conclusão geral

Tendo em consideração os diferentes trabalhos realizados durante o projeto e descritos no presente trabalho, as conclusões globais podem ser sintetizadas nos seguintes pontos.

Na avaliação da resistência de diferentes materiais de construção ao desenvolvimento de fungos, os quatro provetes de ensaio em estudo foram sujeitos a um conjunto de testes. Tanto na análise quantitativa de UFC como na qualitativa os provetes de gesso cartonado (G1 e G2) registaram contagens máximas de fungos, em relação aos provetes de argamassa (P1 e P2). As zonas de colheita de UFC condicionaram os resultados das contagens de fungos, principalmente para os provetes de argamassa (P1 e P2). Os substratos de gesso cartonado, principalmente os de gesso cartonado hidrófugo (G2) revelaram-se pouco resistentes ao desenvolvimento de fungos, comparativamente aos provetes de argamassa (P1 e P2). A aplicação de sistemas de pintura nos provetes P1 e P2 com níveis de proteção elevada numa das camadas de tinta (como a combinação com a tinta de acabamento I), não permitiu concluir qual das tintas usadas como primário ou acabamento assegura a ausência de fungos. Os provetes constituídos pelo sistema de pintura A+E e D+I demonstraram um desempenho desfavorável face ao desenvolvimento de fungos. A monitorização de COV no interior da câmara climática revelou que não existe uma relação significativa entre os mesmos e o crescimento dos fungos. A avaliação do grau de carbonatação dos provetes indicou que não se verificou qualquer indicio de carbonatação dos mesmos. Os ensaios realizados para a avaliação da espécie que foi inoculada nos provetes apontaram que poderíamos estar perante a espécie *Penicillium brevicompactum*.

A avaliação do risco de exposição dos técnicos de um laboratório a agentes biológicos e químicos foi efetuada em 3 salas (L1,L2 e L3) pertencentes a um laboratório de investigação de um estabelecimento de ensino superior, sendo sujeitas a um conjunto de métodos e medições contínuas. Os resultados da amostragem passiva resultante da exposição a fungos e da análise à exposição a bactérias segundo o método ativo encontram-se fora da gama de contagem. A avaliação da QAI segundo a monitorização ativa a fungos, permitiu concluir que as salas L1 e L2 são as que apresentam uma maior concentração fúngica. Esta tendência denotada foi coincidente com os locais de maior temperatura, mas contraditória para os valores de humidade relativa, pois estes revelaram-se inferiores ao nível de saturação. A influência das estações do ano Inverno e Primavera/Verão associadas aos diferentes períodos de amostragem também foi registada. Segundo a literatura os valores de temperatura e humidade relativa registados nas salas não põe em risco a saúde e o conforto térmico dos técnicos que se encontram expostos aos mesmos. Nas concentrações de UFC das amostragens registaram-se situações de não conformidade com a legislação vigente. As medições de COV nas salas L1 e L2 revelaram resultados superiores aos limiares de proteção impostos pela legislação, o que levou à classificação da exposição dos investigadores presentes no espaço em estudo de risco médio. A monitorização do CO₂ revelou que a sala L1 apresenta concentrações superiores à sala L2 ,

V-Conclusão geral

devido às suas características inerentes, mas todos os resultados encontram-se dentro do limiar de proteção imposto pela legislação, não apresentando qualquer risco. Por fim, foram ainda propostas algumas medidas de prevenção relativas à ventilação dos espaços, sendo fundamental a realização de 5 renovações por hora de forma a diminuir o risco de exposição aos agentes monitorizados.

VI. Desenvolvimentos futuros

Relativamente à avaliação numa escala laboratorial da resistência de diferentes materiais de construção ao desenvolvimento de fungos é necessário o seu aprofundamento em trabalhos futuros, na avaliação quantitativa do crescimento da população fúngica seria fundamental o estudo da influência de fatores inerentes à realização dos ensaios, tais como, a posição do provete no interior da câmara climática, as dimensões dos provetes, a inoculação dos provetes e o sistema de ventilação da câmara. Na avaliação qualitativa do crescimento dos fungos nos provetes constatou-se em algumas situações que a avaliação quantitativa indicava presença de fungos, facto que depois não era reproduzível na inspeção visual, deste modo seria importante analisar o desenvolvimento dos fungos microscopicamente nos provetes. Na avaliação dos sistemas de pintura aplicados nos provetes era importante testar outros tipos de tintas com características mais distintas, talvez também com cores distintas expostas à luz solar, para a avaliação da temperatura que certas cores atingem se promovem o crescimento de fungos. Nos ensaios de carbonatação sujeitar os provetes ao processo de carbonatação acelerada em câmara climática de forma a verificar as variações de pH, antes do processo de carbonatação e depois deste processo.

Devido à crescente preocupação em relação à QAI, nomeadamente no âmbito nacional, seria fundamental a continuidade de estudos realizados em torno da avaliação do risco de exposição de técnicos de laboratório aos agentes biológicos e químicos. Nos laboratórios de ensino e instituições de investigação são identificados diferentes grupos de risco (investigadores, professores, alunos, equipas técnicas de manutenção, empregadas de limpeza, entre outros). Infelizmente, cada um destes grupos ao assumir o seu papel num laboratório não tem noção dos perigos e riscos a que se encontra exposto. Especificamente, estudos que enfoquem a monitorização dos fungos/bactérias suspensos no ar, as suas variações sazonais e as suas relações com fatores meteorológicos podem ser a base para futuras investigações, pois a flora fúngica e bacteriana é muito vasta, apesar da legislação em vigor especialistas da área de microbiologia referem que determinadas espécies de fungos e bactérias podem ser bastante patogénicas, mesmo que não se atinja a concentração referenciada. Além disso, é fundamental o dimensionamento correto de sistemas AVAC (aquecimento, ventilação e ar condicionado) que permitam a diluição dos agentes químicos e a renovação do ar principalmente em espaços confinados.

VII. Anexos

Anexo A: Matrizes relativas ao teste estatístico realizado para cálculo das tipicidades, segundo as diferentes características das tintas primárias e de acabamento.

Tabela VI.A1 – Cálculo das tipicidades para a matriz de 0 a 100 UFC/cm².

Características das tintas	Elementos principais dos provetes									Vetor tipicidade
	3	7	8	10	11	13	14	15	16	
Substrato_P	2	2	2	2	2	2	2	2	2	t1=116,75
Natureza_P	1	1	1	2	1	1	1	1	1	t2= 64,45
pH_P	1	1	1	2	1	1	1	1	1	t3=64,45
Proteção Fúngica_P	2	2	2	1	1	2	2	2	2	t4=110,75
Substrato_A	2	2	2	2	1	2	2	2	2	t5=116,75
Natureza_A	3	4	4	2	3	4	3	4	4	t6=204,39
pH_A	1	1	1	2	1	1	1	1	1	t7=64,45
Proteção Fúngica_A	2	2	3	2	2	3	2	2	3	t8=137,59
Brilho_A	2	1	2	1	2	2	2	1	2	t9=96,45
PVC_A	1	4	2	3	1	2	1	4	2	t10=135,09
Permeabilidade VaporÀgua_A	1	2	1	2	1	1	1	2	1	t11=79,01

(...)_P - Característica relativa à tinta primária;

(...)_A- Característica relativa à tinta de acabamento.

Tabela VI.A2 – Cálculo das tipicidades para a matriz de 100 a 1000 UFC/cm².

Características das tintas	Elementos principais dos provetes					Vetor tipicidade
	2	4	5	6	12	
Substrato_P	2	2	2	2	2	t1=66,57
Natureza_P	2	1	1	1	1	t2= 39,53
pH_P	2	1	1	1	1	t3=39,53
Proteção Fúngica_P	1	2	2	2	2	t4=60,42
Substrato_A	2	2	2	2	2	t5=66,57
Natureza_A	2	3	4	3	4	t6=115,28
pH_A	2	1	1	1	1	t7=39,53
Proteção Fúngica_A	2	2	3	2	2	t8=73,41
Brilho_A	1	1	2	2	1	t9=45,77
PVC_A	3	4	2	1	4	t10=96,91
Permeabilidade VaporÀgua_A	2	2	1	1	2	t11=54,28

(...)_P - Característica relativa à tinta primária;

(...)_A- Característica relativa à tinta de acabamento.

Tabela VI.A3 – Cálculo das tipicidades para a matriz de 1000 a 10000 UFC/cm².

Características das tintas	Elementos principais dos provetes		Vetor tipicidade
	1	9	
Substrato_P	1	1	t1=10,58
Natureza_P	1	1	t2= 10,58
pH_P	2	2	t3=21,17
Proteção Fúngica_P	1	1	t4=10,58
Substrato_A	1	1	t5=10,58
Natureza_A	1	1	t6=10,58
pH_A	2	2	t7=21,17
Proteção Fúngica_A	1	1	t8=10,58
Brilho_A	1	1	t9=10,58
PVC_A	3	3	t10=31,75
Permeabilidade VaporÀgua_A	2	2	t11=21,17

(...)_P - Característica relativa à tinta primária;

(...)_A- Característica relativa à tinta de acabamento.

Tabela VI.A4 – Cálculo das tipicidades para a matriz de >10000 UFC/cm².

Características das tintas	Elementos principais dos provetes				Vetor tipicidade
	17	18	19	20	
Substrato_P	2	2	2	2	t1=56,99
Natureza_P	1	1	1	1	t2= 28,50
pH_P	1	1	1	1	t3=28,50
Proteção Fúngica_P	2	2	2	2	t4=56,99
Substrato_A	2	2	2	2	t5=56,99
Natureza_A	4	4	4	4	t6=113,98
pH_A	1	1	1	1	t7=28,50
Proteção Fúngica_A	2	3	2	3	t8=70,80
Brilho_A	1	2	1	2	t9=42,33
PVC_A	4	2	4	2	t10=86,63
Permeabilidade VaporÀgua_A	2	1	2	1	t11=43,31

(...)_P - Característica relativa à tinta primária;

(...)_A- Característica relativa à tinta de acabamento.