

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

**“Isolamento e identificação de fungos filamentosos encontrados
em peças anatômicas conservadas em solução de formol a 10%”**

Wallace Ribeiro Corrêa

Dissertação de Mestrado apresentado ao programa de pós-graduação em Ciências Biológicas como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

São José dos Campos, SP.

2003

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

**“Isolamento e identificação de fungos filamentosos encontrados
em peças anatômicas conservadas em solução de formol a 10%”**

Wallace Ribeiro Corrêa

Dissertação de Mestrado apresentado ao programa de pós-graduação em Ciências Biológicas como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Newton Soares da Silva

São José dos Campos, SP.

2003

C846i

Corrêa, Wallace Ribeiro.

Isolamento e identificação de fungos filamentosos encontrados em peças anatômicas conservadas em solução de formol a 10% / Wallace Ribeiro Corrêa;

Orientador: Prof. Dr. Newton Soares da Silva – São José dos Campos: Univap, 2003.

59 p.: il.; 31cm.

Dissertação de Mestrado apresentado ao programa de pós-graduação em Ciências Biológicas, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2003.

1. Fungos filamentosos 2. *Aspergillus versicolor* 3. Peças Anatômicas 4. Formaldeído
I. Silva, Newton Soares, Orient. II. Título.

CDU: 582.28

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processo fotocopiador ou transmissão eletrônica.

Assinatura do aluno:

Data:

**“Isolamento e identificação de fungos filamentosos encontrados
em peças anatômicas conservadas em solução de formol a 10%”**

Wallace Ribeiro Corrêa

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Cristina Pacheco Soares (Univap) _____

Prof. Dr. Newton Soares da Silva (Univap) _____

Prof. Dr. Silvio Simões (Unitau) _____

Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco

Diretor do IP&D – Univap

São José dos Campos, 2003.

Dedicatória

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, autor, mentor, diretor e reitor da vida, que em todos os momentos me cobriu com Suas graças e providência, nunca deixando nada faltar.

A minha esposa, Márcia Cristina da Cruz Corrêa, filha Yasmin Ribeiro Corrêa e filho Diogo Henrique Ribeiro Corrêa pelo amor e compreensão nos momentos difíceis da vida e elaboração deste trabalho.

Aos meus pais e irmãos que tanto amo e sempre me incentivaram e ajudaram-me, principalmente quando eu mais precisei.

Agradecimentos especiais

Ao Prof. Dr. Newton Soares da Silva, pela amizade, orientação, dedicação, paciência e principalmente apoio no desenvolvimento deste trabalho.

A Profa. Dra. Cristina Pacheco Soares, responsável pelo laboratório de Cultura de Células, pelo constante incentivo, paciência e disponibilidade.

“Ainda que eu fale as línguas dos homens e dos anjos, se não tiver amor, serei como o bronze que soa ou como o címbalo que retine.

Ainda que eu tenha o dom da profecia, o conhecimento de todos os mistérios e o conhecimento de toda a ciência; ainda que eu tivesse toda a fé, a ponto de transportar montanhas, se não tiver amor eu nada serei...” I Corintos 13.

Resumo

O desenvolvimento de fungos filamentosos em ambientes fechados é causa crescente de preocupação, pois está relacionado diretamente a problemas adversos de saúde. Mediante a essa preocupação, este trabalho teve por objetivo isolar e identificar os fungos filamentosos encontrados em laboratórios de anatomia humana, onde a proliferação dos mesmos encontrava-se visível nas peças anatômicas conservadas em solução de formol a 10%; bem como, analisar a resistência dos isolados em diferentes concentrações de formaldeído avaliados através do método 3-(4,5-Dimetil-2-Tiazil)-2,5-Difenil-2H-Tetrazólio Bromide (MTT). As amostras foram coletadas diretamente nas peças anatômicas mediante técnicas assépticas e foram processadas em meio de cultura não seletivo. Para a identificação das amostras foram feitas análises macroscópicas das colônias mediante observação direta e análises microscópicas das estruturas dos fungos isolados. Para analisar a resistência dos isolados a diferentes concentrações de formaldeído, inicialmente foi feita a coleta e a inoculação dos conidiósporos em diferentes concentrações de formaldeído por um período de 48 horas. Após o período de exposição a análise foi feita mediante a leitura dos derivados de formazan com um leitor de ELIZA, Spectra Counttm PACKARD, usando um comprimento de onda de absorvância de 570nm. Todos os isolados apresentaram características macroscópicas e microscópicas semelhantes ao gênero *Aspergillus* e a espécie *Aspergillus versicolor*, um fungo encontrado comumente em ambientes fechados. O resultado da análise do MMT demonstrou que a solução de formaldeído a 10% não inibe totalmente o desenvolvimento do *Aspergillus versicolor*, demonstrando assim que a desinfecção não é total. Através dos resultados concluímos que o desenvolvimento de *Aspergillus versicolor* em laboratórios de anatomia humana é um risco para saúde de professores, alunos e técnicos de anatomia, visto que, o fungo está associado a diferentes patologias, principalmente de ordem respiratória, bem como estudos futuros deverão ser elaborados visando o desenvolvimento e a adequação de novas fórmulas, visando o registro de melhores resultados na conservação das peças anatômicas e melhor desinfecção, evitando-se o desenvolvimento de patógenos como *Aspergillus versicolor*.

Palavras chaves: *Aspergillus versicolor*, peças anatômicas e ambiente fechado.

Abstract

The development of filamentous fungi in closed environment is a growing cause of concern, due to its direct relation to adverse problems of health. Because of that, the purpose of this work was to isolate and identify filamentous fungi found at laboratories of human anatomy, which could be observed in the anatomical pieces conserved in formaldehyde solution at 10%, as well as to analyze the resistance of the isolated fungi in different formaldehyde concentrations evaluated through the method 3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazyl)-2,5-Diphenyl-2H-Tetrazolium Bromide (MTT). The samples were collected directly from the anatomical pieces by aseptic techniques and then processed in a non-selective culture medium. For the identification of the samples, macroscopic analysis of the colonies were performed by direct observation and microscopic analysis of the structures of the isolated fungi. To analyze the resistance of the these fungi to different formaldehyde concentrations, the collection and inoculation of the conidia was initially performed in different formaldehyde concentrations for a period of 48 hours. After the exhibition period the analysis was done by the reading of formazan derivates with an ELISA reader, Spectra Count™ PACKARD, using a wavelength of absorbance of 550nm. All the isolated fungi presented macroscopic and microscopic characteristics similar to the gender *Aspergillus* and the species *Aspergillus versicolor*, a fungi found commonly in closed environment. The result of the MTT analysis demonstrated that the formaldehyde solution at 10% doesn't inhibit the development of the *Aspergillus versicolor* totally, demonstrating that the disinfection is not complete. Through the results we concluded that the development of *Aspergillus versicolor* in laboratories of human anatomy is a risk for the health of teachers, students and technicians, because, this fungi is associated to different pathologies, mainly breathing disorders. We suggest that future studies be elaborated seeking the development and the adaptation of new formulas, for the registration of better results in the conservation and better disinfection of the anatomical pieces, in order to avoid the development of pathogens such as *Aspergillus versicolor*.

Key words: *Aspergillus versicolor*, human anatomical pieces and closed environment.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Formaldeído.....	2
1.2. Os Fungos.....	5
1.3. O método MTT.....	13
2. OBJETIVOS.....	16
3. MATERIAL e MÉTODOS.....	17
3.1. Coleta das amostras.....	17
3.2. Tampão salina fosfato.....	18
3.3. Meios de cultura.....	18
3.3.1. Ágar Sabouraud Dextrose.....	18
3.3.2. Caldo Sabouraud.....	19
3.4. Obtenção de conídios.....	19
3.5. Processamento das amostras.....	20
3.5.1. Inoculação.....	21
3.5.2. Isolamento.....	22
3.6. Preparação de montagens para estudo.....	22
3.6.1. Técnica de micro cultivo em lâmina.....	22
3.6.2. Preparação por desagregação.....	23
3.7. Corante – Azul-de-lactofenol.....	23
3.8. Métodos de análise e identificação.....	24
3.8.1. Análise macroscópica.....	24
3.8.2. Análise microscópica.....	25
3.9. Análise dos resultados.....	25
3.10. Análise da resistência dos conídios a diferentes concentrações de formaldeído com o método 3-(4,5-Dimethyl-2-triazyl)-2-5diphenyl-2H- Tetrazolium Bromide – MTT.....	25
3.11. Análise dos resultados do MTT.....	27

4.	RESULTADOS	28
5.	DISCUSSÃO	40
6.	CONCLUSÃO	47
7.	REFERÊNCIAS	48
8.	ANEXO A. Prancha de identificação com os caracteres macroscópicos e microscópicos.....	59

Lista de figuras

Figura 1a:	Colônia isolada de amostra da crista ilíaca.....	33
Figura 1b:	Reverso da colônia isolada da crista ilíaca.....	33
Figura 2a:	Colônia isolada do couro cabeludo.....	34
Figura 2b:	Reverso da colônia isolada do couro cabeludo.....	34
Figura 3:	Célula pé.....	35
Figura 4:	Conidióforos longos e lisos.....	36
Figura 5:	Fiálides bisseriadas.....	37
Figura 6:	Conídios.....	38
Figura 7:	<i>Aspergillus versicolor</i>	39

Lista de tabelas

TABELA 1.	Característica macroscópica do primeiro grupo.....	28
TABELA 2.	Característica macroscópica do segundo grupo.....	29
TABELA 3.	Característica microscópica dos isolados.....	30
TABELA 4:	Tabela de identificação de espécies de <i>Aspergillus</i> , da (ICPA).....	31

Lista de gráficos

Gráfico 1:	Avaliação da resistência dos isolados a diferentes concentrações de formaldeído - 48 h, pelo método MTT.....	32
------------	--	----

Lista de abreviaturas e símbolos

ABPA	Aspergilose broncopulmonar alérgico
AFB1	Aflatoxina B1
atm	Atmosfera
BHI	Infusão cérebro coração
CFU	Unidade formadora de colônia
DHA	Desidrogenase ativa
DMSC	5,6-dimethoxy sterigmatocystin
DMSO	Dimetilsulfóxido
IgE	Imunoglobulina E
IPA	Aspergilose invasiva pulmonar
IPCA	Comissão Internacionl em Penicillium e Aspergillus
IUMS	União Internacional e Sociedade Microbiológica
LPCB	Corante azul-de-lactofenol
Mg/ml	Miligramas por mililitros
MIC	Concentração mínima inibitória
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-triazyl)-2-5diphenyl-2H-TetrazoliumBromide
Na ₂ HPO ₄	Monohidrogeno fosfato de sódio
NaH ₂ PO ₄	Dihidrogeno fosfato de sódio
NCCLS	Comitê Nascional para Padrão de Laboratórios Clínicos
nm	Nanômetro
OD	Densidade óptica
PBS	Tampão salina fosfato
pH	Potencial de hidrogenação
ppm	Partículas por milhão
rpm	Rotação por minuto
SAB	Ágar Sabouraud
SDA	Ágar Sabouraud Dextrose
SF	Sinusite fúngica
YNBG	Meio fermento nitrogênio glicose

1. INTRODUÇÃO

Estudos sobre a invasão e o impacto de fungos a sistemas biológicos em ambientes fechados é um assunto importante de saúde pública, que tem sido amplamente investigado por vários pesquisadores, visto uma crescente preocupação e significativas evidencias sobre os largos e severos efeitos adversos à saúde dos ocupantes de habitações contaminadas, provocada pela exposição a micotoxinas e esporos produzidos por fungos contaminantes em recinto fechado (ROWAN et al., 1999; DALES et al., 1991; HUSMAN, 1996).

Ambientes escolares com problemas de proliferação fúngica tem sido alvo de intensas pesquisas, visto um crescente relato de casos de alergias em alunos e professores. Quase sempre, os casos de alergias como rinite estão relacionados à exposição de grandes quantidades de esporos fúngicos suspensos no ar, fato esse nem sempre visualizado pelos alunos e profissionais da educação e que provoca um impacto negativo à saúde dos ocupantes de escolas contaminadas (SANTILLI; ROCKWELL, 2003).

A má qualidade do ar em recintos fechados é indicada como a causa do aumento das exacerbações de asma entre crianças e jovens, sendo que, a maior prevalência de erupções asmáticas, foi detectada em ambientes escolares, que apresentavam salas com baixas temperaturas, alta umidade relativa do ar, altas concentrações de formaldeído ou outras combinações orgânicas voláteis, que conseqüentemente pudessem desencadear os sintomas respiratórios (SMEDJE; NORBACK; EDLING, 1997).

A presença de fungos filamentosos e a poluição do ar em ambientes escolares é um fato que aumenta o risco de sensibilização alérgica nos alunos. Estudos epidemiológicos em escolas com problemas de proliferação fúngica e poluição no ar verificaram a ocorrência de sintomas respiratórios como tosse crônica, muco crônico, ofegância, ataques de dispnéia e falta de respiração, significativamente associados à contaminação ambiental (JEDRYCHOWSKI; FLAK, 1997).

Estudos da qualidade do ar em escolas com problemas de proliferação fúngica revelaram que dois fatores são de suma importância para o desenvolvimento dos sintomas respiratórios: a presença de umidade e a armação dos edifícios. Construções de concreto associadas a problemas de umidade, são fatores de risco significantes para o desenvolvimento de sintomas respiratórios, visto que, essa união proporciona uma eventual ocorrência de fungos contaminantes como o *Aspergillus versicolor*, *Cladosporium* e *Stachybotrys*, fato que não é evidenciado em edifícios escolares de madeira e sem problemas de umidade (MEKLEIN et al., 2002).

Mediante a grande preocupação relacionada ao desenvolvimento de fungos patogênicos em ambientes fechados e os problemas de saúde que esses agentes provocam, a nota de proliferação fúngica em peças anatômicas conservadas em solução de formol a 10% e relatos de alergias de origem desconhecida no laboratório de anatomia da UNIVAP, foram os motivos para o desenvolvimento desta pesquisa, visto que, a presença de fungos patogênicos em ambientes de trabalho é o suficiente para implicá-los como causadores de doenças, pois não são contaminantes naturais da rotina nos laboratórios de anatomia humana, além do mais, avaliações dermatológicas realizadas em profissionais ligados à anatomia, demonstraram altos índices de contaminação fúngica (ANDRÉ et al., 2000).

1.1 Formaldeído

Para realização dos estudos anatômicos, inicialmente, se faz necessário à utilização de técnicas para a conservação dos cadáveres. Dentre as técnicas anatômicas de embalsamamento, a via arterial é uma das mais utilizadas, e consiste na injeção do fixador pelas artérias. Este método faz com que os cadáveres fiquem sempre bem fixados, de forma que eles possam ser usados não só para dissecação anatômica, mas também para pesquisas. (IKEDA, et al., 1993).

O processo de fixação dos cadáveres, peças anatômicas e vísceras utilizadas no laboratório de anatomia é feito, a fim de evitar a deterioração dos tecidos e

conseqüentemente preservar os elementos úteis aos estudos. A fixação é a parte mais importante de todo o trabalho, dependendo dela a manutenção da forma e a conservação das peças. O formaldeído é o fixador comumente utilizado, preparado em solução aquosa a 10%, que penetra rapidamente nos tecidos fixando-os. Para o preparo da solução de formol a 10%, juntam-se 100 ml de formol a 100% a 900 ml de água corrente. Sendo essa solução ligeiramente ácida, a eliminação da acidez é obtida pela adição de 4 gramas de fosfato de sódio monobásico, 6,5 gramas de fosfato de sódio diabásico anidro (RODRIGUES, 1998).

As substâncias químicas utilizadas nas técnicas de embalsamamento de peças humanas têm por objetivo eliminar a atividade microbiana. Em testes realizados para verificar a ação antimicrobiana, a administração de substâncias químicas via arterial resultou em uma redução de 99% da população microbiana depois de 2 horas de contato. Este nível de desinfecção foi mantido durante as 24 horas num período teste, sendo constatada a desinfecção tópica dos orifícios corpóreos, demonstrando deste modo que às práticas de embalsamamento presentes reduzem o perigo de transmissão potencial de agentes microbianos infecciosos dentro do ambiente imediato de restos humanos embalsamados (BURKE; SHEFFNER, 1976).

Spicher e Peters (1976), verificaram a resistência de diferentes microorganismos para formaldeído e a dependência do efeito antimicrobiano em diferentes concentrações de formaldeído. Foram analisadas bactérias gram-negativas e gram-positivas, esporos bacterianos, fungos, bacteriófagos e vírus. Para os estudos, os microorganismos foram expostos às mesmas condições ambientais, com temperatura constante a 20° C e pH 7.0, num período de duas horas de exposição ao formaldeído. Dentre as bactérias avaliadas, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, e *Salmonella* mostraram ser mais suscetíveis ao formaldeído que *Stafilococos*. Os fungos mostraram-se mais resistentes que as bactérias sendo os conídios de *Aspergillus niger* mais resistentes que leveduras de *Candida albicans*.

Apesar do formaldeído (HCHO) ser um excelente fixador, ele provoca reações adversas à saúde das pessoas expostas diretamente ao produto. Estudantes de um curso de embalsamamento expostos por um período de oitenta e cinco dias, a baixos níveis de

formaldeído por via oral e nasal, sofreram mudanças citogenéticas em células epiteliais na área da boca e em linfócitos sanguíneos, demonstrando ser o formaldeído, um indutor de mudanças citogenéticas, quando observada a exposição cumulativa do mesmo (SURUDA et al., 1993).

A associação quanto à exposição de profissionais, a determinadas concentrações de formaldeído e carcinomas de faringe, demonstrou uma relação significativa, entre o câncer hipofaríngeal e as exposições a determinadas concentrações de formaldeído, evidenciando um aumento de risco na indução de carcinomas quando os profissionais são expostos a longos períodos ao produto e quando a concentração do mesmo é aumentada (LAFOREST et al., 2000).

Uma avaliação previdente, quanto à função pulmonar e sintomas respiratórios entre estudantes de medicina expostos ao formaldeído por um período de sete meses, verificou uma incidência de broncoconstrição e sintomas respiratórios nos estudantes, em consequência à exposição ao produto. As exposições ao formaldeído, geralmente eram menores que 1 ppm, sendo as exposições de cume menores que 5 ppm. Foram detectados nos alunos sintomas agudos de irritação nos olhos e irritação respiratória, significativamente associada com a exposição ao formaldeído. Foram detectados ainda, casos de asma e irritações respiratórias entre os alunos com predisposição histórica (UBA, et al., 1989).

Análises citogenéticas realizadas em ratos expostos a diferentes concentrações de formaldeído, durante 6 horas por dia, por períodos de uma e oito semanas, não apresentaram nenhuma anormalidade cromossômica em células de medula óssea em relação ao grupo controle, mas havia um aumento significativo na frequência de aberrações cromossômicas em células de lavados pulmonares (macrófagos alveolares) de ratos que inalaram 15 ppm de formaldeído, sendo as fraturas de cromátides, as aberrações predominantes. Estes resultados indicam que o formaldeído apresenta efeitos genotóxicos significantes, localmente em macrófagos alveolares, mas não na medula óssea, sugerindo assim, que exposições prolongadas e repetitivas a altas concentrações de formaldeído, possam ser carcinógenas para ratos (DALLAS, et al., 1992).

Enquanto há provas inconsistentes que formaldeído possa induzir anomalias cromossômicas na medula óssea de roedores, expostos através de inalação *in vivo*, recentes estudos mostraram que as exposições ao formaldeído danificam células de tecidos que estão mais localmente expostos. Ratos expostos oralmente ao formaldeído apresentaram anomalias nucleares em células do epitélio gastrintestinal. Ratos tratados com formaldeído tiveram significante, aumentos na frequência de células micronucleadas no estômago, duodeno, íleo e colo, bem como sinais de irritação severa nos locais afetados, demonstrando serem as células do estômago mais sensíveis e as células do cólon menos sensíveis ao formaldeído (MIGLIORE et al., 1989).

O formaldeído é um gás intensamente irritante que afeta principalmente os olhos e está associado com sintomas respiratórios. Um monitoramento de possíveis efeitos inflamatórios decorrentes de altas concentrações de formaldeído em ambientes domésticos demonstrou que os ocupantes das moradias, apresentavam irritações das membranas mucosas e asma, sendo os mecanismos subjacentes responsáveis por estes resultados ainda não estabelecidos, além disso, as exposições a níveis elevados de formaldeído podem provocar uma resposta clínica inflamatória nas vias aéreas de crianças saudáveis. (FRANKLIN; DINGLE; STICK, 2000).

Krzyzanowski; Quackenboss e Lebowit, (1990), a partir de aplicação de questionários, relacionaram sintomas respiratórios crônicos quanto à exposição para formaldeído em casas durante um período de uma semana. Os dados revelaram que as pessoas expostas ao formaldeído apresentaram tosse crônica, ataques de ofegância, ataques de falta de respiração, diagnósticos de bronquite crônica e asma. Significativamente a maior prevalência de taxa de asma e bronquite crônica detectadas, foi observada em moradias com maiores concentrações de formaldeído.

1.2 Os fungos

Os fungos filamentosos são organismos que produzem uma gama extensiva de produtos naturais chamados metabólicos secundários, que são produzidos depois que o

fungo completa sua fase inicial de crescimento e dá início a uma fase de desenvolvimento representada pela formação de esporos. Estas combinações são muito diversificadas em estrutura e executam funções que nem sempre são conhecidas (CALVO et al., 2002).

Análises epidemiológicas demonstram que alguns metabólicos secundários aerolisados em ambientes fechados podem ser responsáveis por múltiplos problemas de saúde nos ocupantes de moradias contaminadas, sendo o longo e duradouro período de exposição aos metabólicos o fator responsável pelas intoxicações (PIECKOVA; KUNOVA, 2002).

A exposição prolongada e intensa a bio-aerossóis de determinados fungos, está associada com desordens dos sistemas nervoso central, respiratório, desordens das membranas mucosas, de alguns parâmetros que pertencem ao sistema imune celular e humoral, sugerindo ainda, uma possível deficiência orgânica de competência imune (JOHANNIING et al., 1996).

Os bio-aerossóis fúngicos podem impressionar o “senso químico comum”, que sente pungência e responde ao estímulo com manifestações de desconforto geral, dores de cabeça, irritações nos olhos, irritações no nariz e garganta; podem ocasionar também, sensações estranhas, como coçar, queimar e formigar; podem provocar ainda a constrição do músculo liso respiratório; a diminuição da atenção, desorientação, vertigens entre outros efeitos (OTTO et al., 1990).

Dentre os metabólicos secundários produzidos pelos fungos, as micotoxinas são combinações químicas que podem causar doença em humanos e animais (HENDRY; COLE, 1993). A exposição para micotoxinas pode acontecer por inalação ou contato direto, sendo seus efeitos os mais diversos, variando de desordens agudas e crônicas, a reações sistêmicas e até mesmo cânceres. As micotoxinas agem ainda como imunossupressores que podem estar associadas com uma prevalência de infecções entre os habitantes de edifícios com problemas de umidade (REIJULA; TUOMI, 2003).

Estudos sugerem que a inalação de micotoxinas em ambientes fechados está diretamente relacionada a erupções de doenças pulmonares e asma (HODGSON et al., 1998). Foi sugerido também que tais combinações orgânicas voláteis possam ainda afetar a saúde humana, causando letargia, dor de cabeça, irritação dos olhos e membranas mucosas do nariz e garganta (FISCHER; DOTT, 2003).

Relatos indicam que a exposição de crianças de um a oito meses, residentes em moradias com problemas de umidade e contaminação por micotoxinas de *Stachybotrys chartarum*, desenvolveram casos de hemossiderose pulmonar, caracterizada por hemorragia pulmonar que fez os bebês tossirem sangue, demonstrando serem os metabólicos produzidos por fungos altamente citotóxicos (JARVIS et al., 1998).

Dentre as micotoxinas, a aflatoxina (AFB1) é uma micotoxina que quando exposta na alimentação, prejudica a defesa dos hospedeiros aumentando a suscetibilidade a infecções. Além de estar presente em componentes dietéticos, AFB1 é achada também em quantias significantes em partículas respiráveis de pó de grãos. Estudos demonstram que a exposição respiratória experimental à AFB1 suprime as defesas pulmonares e sistêmicas dos hospedeiros, indicando que a exposição e conseqüente inalação da AFB1, por profissionais, torna-se extremamente perigosa (JAKAB, et al., 1994).

A valinomicina é uma micotoxina isolada em pó de recintos fechados contaminados pelo *Streptomyces griseus*, e que em doses muito pequenas, testadas em sangue humano, pode alterar profundamente a resposta imune reduzindo a citotoxicidade das células natural Killer e a produção de citocinas (PAANANEN et al., 2000).

Os fungos filamentosos são responsáveis também pela liberação de esporos, importantes contaminantes em ambientes fechados, que apresentam propriedades citotóxicas. A inalação ininterrupta de esporos fúngicos, por habitantes de moradias contaminadas, torna-se potencialmente perigosa à saúde (SMITH et al., 1992), uma vez que estudos realizados sobre o impacto dessas partículas em pacientes com morbidez de

asma, no departamento de emergência de asma de um hospital para crianças, revelou que, a inalação de esporos de vários grupos de fungos, em diversos ambientes, responde por uma proporção significativa das exacerbações de asma (DALES et al., 2000), podendo ainda, atuar os esporos fúngicos em menor intensidade ambiental, como alergênicos indutores de rinite (WU et al., 1999).

Os esporos fúngicos estão entre os principais agentes alergênicos encontrados presentes em nosso ambiente durante todo o ano, desencadeando as reações alérgicas clássicas causadas por fungos (NIEDOSZYTKO; CHELMINSKA; CHELMINSKI, 2002). Estudos em casas de pacientes asmáticos relacionaram a presença de esporos de dezessete gêneros fúngicos no ambiente interno, destacando a presença e domínio de espécies de *Penicillium* e *Aspergillus*, correlacionando a presença dos fungos no ar das casas dos pacientes com as crises de asma (OLONITOLA, 1994).

Eduard et al. (2001), comprovando que as exposições em níveis altos de microorganismos não infecciosos é reconhecida como uma causa de doença das vias respiratórias em populações ativas, após exposições de fazendeiros a microorganismos registraram sintomas como: ofegância em 3%; tensão de tórax em 7%; tosse em 14%; sintomas nos olhos em 18%; e sintomas de nariz em 22% dos fazendeiros testados, concluindo que a alta ocorrência de sintomas do nariz e olhos como também tosse durante trabalho, eram associadas à exposição aos esporos fúngicos.

Solomon (1975), isolou emanações de gêneros fúngicos, em recinto fechado, como *Penicillium*, *Oospora*, *Sporothrix*, enfatizando os *Aspergillus* como um fungo predominante em ambientes fechados, alertando para eventuais nuvens de esporos ao ar livre que podem penetrar no interior de estruturas e contaminar o ambiente interno.

Estudos *in vivo*, demonstraram que os esporos de *Streptomyces californicus* são capazes de provocar uma inflamação aguda nos pulmões de ratos e que podem causar ainda imunotoxicidade sistêmica, especialmente no baço. O efeito de imunotoxicidade se assemelha ao causado por agentes quimioterapêuticos, originalmente isolado de *Streptomyces spp*, mostrando serem os esporos do *Streptomyces californicus*

potencialmente perigoso à saúde de ocupantes de edifícios contaminados (JUSSILA et al., 2001; JUSSILA et al., 2003).

Os fungos liberam também em ambientes fechados, propágulos fúngicos, que são partículas de reatividade imunológica e tamanho consideravelmente menor que os esporos. Tais partículas são aerolizadas de superfícies contaminadas juntamente com os esporos numa proporção até 320 vezes maior do que os esporos, contaminando todo ambiente onde se encontram. A reatividade imunológica considerável, o alto número, e o pequeno tamanho das partículas dos fragmentos fúngicos podem contribuir para os problemas de saúde das pessoas diretamente ligadas aos ambientes contaminados (GÓRNY et al., 2002).

Extratos de esporos e micélio testados em pacientes com histórico de rinite e asma, demonstraram que o micélio e os esporos compartilham respostas alérgicas potentes em pessoas que apresentam reatividade alérgica. Os estudos demonstraram que as reatividades dos esporos e do micélio variam de intensidade, exibindo o micélio uma reatividade imunológica maior que a resposta induzida pelos esporos (FADEL et al., 1992).

O desenvolvimento de fungos contaminantes em ambientes fechados e os problemas adversos à saúde desencadeados por eles, estão diretamente relacionados a fatores ambientais favoráveis como disponibilidade de água e temperatura em cada uma de suas três fases de desenvolvimento: germinação, crescimento e esporulação (VUJANOVIC et al., 2001). Dentre os fatores ambientais responsáveis pelo desenvolvimento fúngico, o fator umidade é considerado como um risco confirmado para o aumento de casos de asma alérgica, rinite alérgica e dermatites atópicas, sendo o risco de resfriados o mais comum entre as infecções respiratórias (KILPELAINEN et al., 2001).

Neste respeito, os fungos do gênero *Aspergillus* são agentes que aparecem com grande incidência e são particularmente perigosos, pois podem resultar na colonização das vias aéreas e desenvolver subseqüentes aspergiloses, que são causas importantes de

mortalidade entre pacientes neutropênicos, particularmente com leucemia ou transplantados de órgãos sólidos; ou agir ainda como alergênicos poderosos (TOMEI; WERF, 2001).

A proliferação de fungos do gênero *Aspergillus* está entre os crescentes problemas da medicina moderna, pois, tais organismos são altamente invasivos e infecciosos, principalmente para pessoas de grupos de risco que sofrem de imunodeficiência. Tais fungos causam infecções invasivas muito rapidamente quando o ambiente imediato oferece nichos ecológicos para crescimento e morfogenia de partículas infecciosas (STAIB, 1992).

Aspergillus são patógenos normalmente adquiridos pela inalação de conídios capazes de alcançar as pequenas vias aéreas e os espaços alveolares, onde os mecanismos de defesa do hospedeiro debilitado permite a germinação de hifas e conseqüente invasão de tecido subseqüente (BOZZA et al., 2002), causando uma variedade de síndromes clínicas no pulmão, enquanto variando de aspergiloma em pacientes com cavidades pulmonares; para aspergilose necrozante crônico em pacientes que são ligeiramente imunocomprometidos ou têm doenças pulmonares crônica (SOUBANI; CHANDRASEKAR, 2002).

A aspergilose invasiva pulmonar (IPA) é uma doença severa e geralmente fatal que é vista em pacientes imunocomprometidos. É caracterizada pela invasão de hifas e conseqüente destruição do tecido pulmonar (BOZZA et al., 2002). Já a aspergilose broncopulmonar alérgico (ABPA) é uma reação de hipersensibilidade a antígenos de *Aspergillus* que afetam principalmente os pacientes com asma e fibrose cística. É caracterizada pela colonização crônica das vias aéreas pelo *Aspergillus*. Clinicamente a síndrome apresenta episódios periódicos de ofegância, produção de muco, infiltrações pulmonares e níveis elevados de soro IgE. Muitos pacientes desenvolvem bronquiectasia central, e um subconjunto irá organizar a doença pulmonar fibrótica (SOUBANI; CHANDRASEKAR, 2002; COCKRILL; HALES, 1999).

A sinusite fúngica (SF) é uma importante causa de rinosinusite crônica, uma infecção dos seios paranasais com eventual aumento da pressão intrassinusal podendo causar expansão e erosão da parede sinusal, com conseqüente envolvimento de estruturas vizinhas como órbita e crânio (MONTEIRO et al., 2002).

Fungos do gênero *Aspergillus* são produtores de micotoxinas, metabólicos que podem conduzir a periculosidades severas, sendo encontradas em ambientes domésticos e profissionais. Várias espécies de *Aspergillus* estão associadas com a produção de micotoxinas: o *Aspergillus ochraceus* produz a ochratoxina; *Aspergillus fumigatus* a fumitremorginas, gliotoxina e verrucologen; *Aspergillus versicolor* a esterigmatocistina; *Aspergillus flavus* e o *Aspergillus parasiticus* aflatoxinas. A esterigmatocistina também pode ser produzida pelo *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus rugulosus*, e *Aspergillus unguis* (REIJULA; TUOMI, 2003).

Dentre as micotoxinas produzidas pelos *Aspergillus*, a 5,6-dimetoxiesterigmatocistina (DMSC) é uma micotoxina que apresenta atividade carcinogênica potencial. Estudos *in vivo* verificaram que todos os ratos testados desenvolveram nódulos neoplásicos no fígado; além de carcinomas hepatocelular, sarcoma hemangioendotelial no fígado; ainda dois deles desenvolveram osteossarcoma, demonstrando assim os resultados obtidos desta experiência que a DMSC é um hepatocarcinogênico, tal qual a esterigmatocistina (MORI, et al., 1998).

Cuccia; Galarza e Monges (2000), relataram casos de aspergilose cerebral infantil, uma patogenicidade provocada pela colonização de fungos do gênero *Aspergillus* em regiões encefálicas, desenvolvendo eventuais tumores cerebrais e conseqüentes lesões cerebrais. Os pacientes relatados, apresentavam um quadro de imunossupressão, decorrente de transplantes que haviam sofrido, associada com resultados clínicos de hipertensão intracraniana.

Rodriguez et al. (1998), relataram que apesar de não ser o principal agente oportunista na onicomicose, o *Aspergillus versicolor* pode ser considerado como um patógeno emergente que causa onicomicose de dedo do pé, em pelo menos 5,8% dos

casos. Demonstrou também que o tratamento local parece não ser efetivo, apresentando o fungo alta resistência a vários agentes antifúngicos sistêmicos estudados.

Anderson et al. (1996) relatam a aspergilose nosocomial como uma complicação bem conhecida em pacientes com imunossupressão de cânceres, onde a investigação desta erupção de aspergilose nosocomial identificou possíveis fontes fúngicas contaminantes que poderiam ter sido implicado como a causa, destacando a presença e altas concentrações de *Aspergillus fumigatus*.

Galimberti et al. (1998), relatam uma invasão infrequente de *Aspergillus*, onde descreve seis pacientes imunocomprometidos com manifestações de pele causadas por *Aspergillus*, onde um paciente de transplante de coração desenvolveu aspergilose cutâneo primário; dois pacientes, um com granuloma crônico e outro sofrendo tratamento com doses altas de corticosteróides apresentaram lesões nodulares secundárias; e três pacientes com leucemia, tiveram disseminação de pele pela proximidade da órbita e invasão dos seios paranasais, sendo isolados, nos pacientes o *Aspergillus flavus*, o *Aspergillus fumigatus* e o *Aspergillus versicolor*.

Os fungos do gênero *Aspergillus* foram considerados durante muitos anos como sendo patógenos fracos, porém, com o aumento no número de pacientes neutropênicos, verificou-se um aumento dramático em casos de aspergilose invasiva severo que é normalmente fatal, despertando um grande interesse no *Aspergillus* (LATGÉ, 1999).

Além dos fungos do gênero *Aspergillus*, outros fungos também são implicados como indutores de problemas adversos de saúde em recinto fechado. A exposição ao fungo *Stachybotrys atra*, foi relacionada a casos de hemorragia pulmonar e hemossiderosis em crianças que moravam em habitações contaminadas pelo fungo (ETZEL et al., 1998; NOVOTNY; DIXITP, 2000). Outro fungo do gênero *Stachybotrys*, o *Stachybotrys chartarum*, também está associada com problemas de saúde em humanos, onde, o fungo produz componentes solúveis hábeis para induzir asma (VIANA et al., 2002), sendo relacionado ainda com problemas de hemorragias pulmonar em crianças (RAO et al., 2000).

Espécies de *Penicillium* também estão implicados como componentes da aerospóra em recinto fechado que potencialmente podem atuar como alergizantes aos moradores de casas contaminadas (KHAN, et al., 1999). Estudos demonstraram que altas concentrações de propágulos fúngicos gênero *Penicillium* no ar, durante o conserto de edifícios mofados aumentaram os problemas de saúde dos operários (RAUTIALA et al., 1996).

Infelizmente, não há nenhum padrão geralmente aceito para interpretação de níveis fúngicos no ar em recinto fechado ou ao ar livre. A melhor aproximação para o controle fúngico, é o controle da umidade ambiental, prevenindo contra o desenvolvimento fúngico essencialmente e excluindo possíveis eventos extraordinários (BURGE, 2002).

1.3 O método 3-(4,5-Dimetil-2-tiazil)-2-5difetil-2H-Tetrazólio Bromido (MTT).

O método 3-(4,5-dimetil-2-Tiazil)-2-5 difetil-2H-tetrazólio bromido (MTT) é um método bioquímico, baseado na atividade da desidrogenase (DHA). Foi desenvolvido como uma alternativa para mensuração da unidade formadora de colônia (CFU), por avaliar a viabilidade de esporos fúngicos. Em células viáveis, o tetrazólio (MTT) é reduzido a um colorido formazan, através de enzimas desidrogenase celulares (STENTELAIRE et al., 2001).

Os sais de tetrazólio são combinações orgânicas heterocíclicas que substituem a ligação natural do oxigênio no processo de redox biológico. Os sais de tetrazólio penetram rapidamente nas células intactas, diretamente pelas membranas subcelulares com atividade de desidrogenase onde eles são convertidos a derivado de formazan. (ALTMAN, 1976).

O tetrazólio MTT é descrito como um ensaio colorimétrico rápido para testar a viabilidade de fungos. Todas as espécies *in vivo* de uma gama extensiva de fungos

medicamento importantes foram testados com a redução do MTT, com resultante formação intracelular dentro de várias horas de cristais roxos claramente visíveis de MTT-formazan, que puderam ser medidos com espectrofotômetro a 550 nm. O ensaio provou ser particularmente útil, avaliando a viabilidade de fungos ativos, independente de proliferação e de crescimento unicelular ou multicelular (LEVITZ; DIAMOND, 1985).

Em particular, o método MTT é útil para calcular densidades de células em pequenos volumes de cultura e é mais preciso e seguro que métodos convencionais de contagem. O cultivo em pequenos volumes de cultura e a avaliação sensível com o ensaio de MTT permite a blindagem e testes de muitas substâncias diferentes, frações de nutrientes indispensáveis para o desenvolvimento de determinados fungos em meios de cultura (FLORIAN et al., 1999).

Comparações realizadas, utilizando o método de microtitulação recomendado pelo Comitê Nacional para Padrões de Laboratório Clínicos (NCCLS) e o método colorimétrico MTT, na análise da suscetibilidade clínica de 30 isolados pertencendo a seis espécies diferentes de fungos filamentosos contra seis drogas antifúngicas, verificaram que o crescimento hifálico, determinado visualmente pelo método NCCLS mostrou várias discrepâncias, quando comparados com as porcentagens de redução de MTT. O método MTT mostrou-se viável como um método alternativo ao método de NCCLS, sendo ainda, o método mais fácil e sensível de ser executado (MELETIADIS, et al., 2000).

O método MTT foi utilizado para verificar a eficácia antifúngica, farmacocinética, e segurança da caspofungina no tratamento e profilaxia de aspergilose invasiva pulmonar causada por *Aspergillus fumigatus*. A terapia antifúngica foi testada em coelhos neutropênicos, onde foi avaliado o efeito da echinocandina no desenvolvimento das hifas de *Aspergillus fumigatus*. O MTT amarelo foi clivado por desidrogenases do metabolismo de fungos ativos, reduzindo a derivados formazan roxo, que foram extraídos com álcool e então foram quantificados através de

espectrofotômetro, onde foi avaliada a viabilidade fúngica a diferentes concentrações da droga (PETRAITIENE, et al., 2002).

In vitro a atividade antifúngica do itraconazol e seus metabólicos de hidroxila ativo, hidroxí-itraconazol, foram avaliados contra *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* pelo método colorimétrico MTT [3-(4,5-dimetil-2-tiazil)-2,5-difenil-2H brometo de tetrazólio]. A concentração inibitória mínima (MIC) foi determinada pelo ensaio colorimétrico, observado também por ensaio visual. O método colorimétrico mostrou-se funcional para determinar os MICs das duas drogas em meios diferentes, porém, no ensaio para *Candida albicans* a visualização dos MICs ficaram difíceis de determinar em meios BHI e SAB, sendo recomendado à utilização do meio YNBG para determinação dos MICs (MIKAMI et al., 1994).

O ensaio colorimétrico MTT foi utilizado também, para analisar a citotoxicidade de esporos fúngicos coletados no ar em um setor público de um alojamento úmido. Um procedimento de bioanálise foi utilizado, envolvendo os efeitos citotóxicos dos esporos em fibroblastos humanos, cultivados em meio de cultura. O sistema de ensaio bioquímico revelou que 47% dos fungos apresentavam propriedades citotóxicas associadas, um valor que enfatiza as periculosidades potenciais da inalação ininterrupta de propágulos fúngicos toxigênicos por ocupantes de casas contaminadas (SMITH et al., 1992).

2. OBJETIVOS

O estudo proposto tem por objetivos:

Isolar e identificar os fungos filamentosos encontrados em peças anatômicas conservadas em solução de formol a 10% em laboratórios de anatomia.

Avaliar através do método 3-(4,5-Dimetil-2-Tiazil)-2,5-Difenil-2H- Tetrazólio Bromide (MTT), a resistência dos isolados a diferentes concentrações de formaldeído.

Avaliar mediante pesquisa bibliográfica se os fungos isolados oferecem riscos à saúde das pessoas expostas a eles.

3. MATERIAL e MÉTODOS.

3.1 Coleta das amostras.

As amostras fúngicas foram coletadas em peças anatômicas humanas formolizadas com períodos de incubação em solução de formol a 10% que variaram de 2 a 6 anos. Também foram obtidas amostras em recipientes de descartes, localizados sob as bancadas, contendo detritos de peças anatômicas os quais apresentavam sinais visíveis de contaminação fúngica. As amostras foram selecionadas no laboratório de anatomia da UNIVAP, dentre diferentes peças anatômicas provenientes de vários laboratórios de anatomia humana do país. As amostras foram coletadas da extremidade distal da placa ungueal do hálux, da face interna da dura-máter (região frontal), do osso parietal (parte interna), do couro cabeludo (região Parietal), da região orbicular dos olhos, abaixo do supercílio e da crista ílíaca.

As amostras provenientes dos recipientes de descarte foram coletadas diretamente com auxílio de pinças, previamente esterilizadas em autoclave, com as quais foram recolhidos pequenos fragmentos de peças anatômicas que apresentavam sinais nítidos de contaminação fúngica de colorações esverdeadas, amarelas e brancas. As amostras cutâneas foram obtidas mediante descamação com uma lâmina estéril, nas áreas contaminadas; a amostra de unha foi obtida na parte inferior da mesma, para a obtenção de material mole do leito ungueal; as amostras ósseas foram obtidas mediante a raspagem com bisturi nas superfícies contaminadas.

As amostras foram armazenadas em tubos Eppendorf estéreis contendo tampão salina fosfato (PBS). Após serem devidamente rotuladas e embaladas, foram transportadas rapidamente até o Laboratório de Processamento de Amostras Biológicas da UNIVAP, onde foram processadas em meios de cultura.

3.2 Tampão salina fosfato (PBS).

O tampão salina fosfato (PBS), foi utilizado na coleta das amostras; e na suspensão dos sedimento, durante a obtenção dos conídios, para a análise da resistência dos mesmos em diferentes concentrações de formaldeído.

A preparação do tampão fosfato se dá com a seguinte fórmula:

- Solução A: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 2,76g para 100 ml de água;
 - Solução B: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ - 5,36g para 100 ml de água.
- ou
- Na_2HPO_4 - 2,84g para 100 ml de água.

33 ml de sol. A + 67 ml sol. B → pH 7,1.

3.3 Meios de cultura.

3.3.1 Ágar Sabouraud Dextrose.

O Ágar Sabouraud Dextrose (SDA) foi o meio utilizado na recuperação e cultivo das colônias. O SDA é um meio não seletivo que apresenta um pH ácido de 5,6 e é pobre em nutrientes, condição essencial para inibir o crescimento de bactérias, mas permite o crescimento de fungos oportunistas e patogênicos. O meio proporciona também um aumento de esporulação e uma morfologia colonial mais característica, facilitando o estudo (KERN; BLEVINS, 1999).

A preparação do meio se dá com a seguinte fórmula:

Dextrose.....	40 g
Ágar.....	15 g
Neopeptona.....	10 g

Todos os componentes foram adicionados em água destilada, em Erlenmeyer e o volume completado para 1000 ml; a seguir, foi esterilizado em autoclave a 121° C por 15 minutos. O meio ficou 24 horas na estufa a 37° C para controle, antes da distribuição nas placas de Petri.

3.3.2 Caldo Sabouraud.

O caldo Sabouraud foi utilizado na realização das análises de resistência e viabilidade dos esporos fúngicos, dos isolados, em diferentes concentrações de formaldeído.

A preparação do caldo se dá com a seguinte fórmula:

Caldo Sabouraud.....	30 g.
Água destilada.....	1000 ml.

Os componentes foram adicionados em Erlenmeyer; a seguir, foi esterilizado em autoclave a 121° C por 15 minutos. O meio ficou 24 horas na estufa à 37° C para controle, antes da realização das análises de resistência e viabilidade dos esporos fúngicos.

3.4 Obtenção de conídios.

Os conídios foram obtidos a fim de verificar a esporulação dos isolados, alertando sobre os possíveis riscos à saúde que tais partículas podem vir a oferecer a alunos, professores e técnicos de anatomia humana; e também para avaliar a resistência

dos conídios em diferentes concentrações de formol, através o método 3-(4,5-Dimetil-2-tiazil)-2-5difenil-2H-Tetrazólio Bromide (MTT).

Os isolados dos laboratórios de anatomia foram semeados por transferência de micélio, em placas de Petri contendo Ágar Sabouraud Dextrose e foram incubadas em temperatura ambiente por um período de 7 dias. Após este período de incubação em temperatura ambiente, o micélio superficial foi raspado com espátula e lavado com água destilada estéril. O lavado obtido foi colocado em um tubo de ensaio contendo PBS e foi homogeneizado em agitador de tubos, Marconi MA 162, a uma velocidade moderada e filtrado através de gaze e papel de filtro qualitativo Whatman nº 4. O filtrado foi centrifugado a 2500 rpm por 10 minutos em centrífuga Fanem modelo 242. O sedimento foi suspenso em 1 ml de PBS e a contagem dos conídios foi feita em câmara de Neubauer.

Para uso como inóculo, as suspensões de conídios obtidas dos isolados foram diluídas de modo a conter, aproximadamente 16.000 conídios a cada 10µl de suspensão. A semeadura para testar a viabilidade dos conídios foi executada em fluxo laminar, com auxílio de pipeta automática, distribuindo-se 10 µl da suspensão diretamente em placas de Petri contendo 20 ml de Ágar Sabouraud Dextrose e em tubos de cultura contendo 2 ml de caldo Sabouraud. As placas de Petri foram incubadas a temperatura ambiente, a 25°C controlados em estufa para cultura, Fanem Modelo 002 CB, durante o período de 7 dias; já os tubos de cultura foram incubados em estufa de cultura Fanem Modelo 002 CB a 37° C, durante 7 dias.

3.5 Processamento das amostras.

Para cultura e processamento das amostras foram utilizadas placas de Petri de 200 x 30 mm, por terem a vantagem de proporcionar uma superfície de crescimento mais ampla, o que facilitou os exames e os subcultivos. As placas de Petri foram lavadas com sabão neutro em água destilada e secas em estufa de secagem e esterilização Fanem mod. 320-SE, a 60° C. Logo após foram embaladas em papel

alumínio e papel craft e esterilizadas em autoclave a 15 libras de pressão a 121° C, por 15 minutos.

O trabalho de distribuição do meio de cultura foi realizado em ambiente estéril no fluxo laminar. As paredes internas e a superfície da área de trabalho do fluxo laminar foram limpas com álcool a 70 %, o equipamento e a lâmpada germicida foram acionados por 30 minutos antes da distribuição do meio de cultura nas placas. O procedimento proporciona assim um ambiente estéril, com o propósito de remover as partículas do ar originadas na área de trabalho e proteger contra a contaminação cruzada, evitando que as partículas geradas na área de trabalho se desloquem lateralmente, contaminando outros processos ou produtos.

Cada placa de Petri recebeu 20 ml de Ágar Sabouraud Dextrose com o auxílio de pipetas estéreis de 10 ml acopladas a um pipetador. As placas foram vedadas com fita adesiva para evitar a desidratação do meio e ficaram por 24 horas em estufa à 37°C para controle, antes da inoculação das amostras fúngicas.

3.5.1 Inoculação.

Em fluxo laminar previamente esterilizado, as amostras foram colocadas diretamente na superfície do meio de cultura com auxílio de uma alça de inoculação, esterilizada em bico de Bunsen, onde, alguns fragmentos foram aprofundados no meio de cultura, visando uma melhor recuperação das amostras. As placas foram vedadas com fita adesiva e foram incubadas à temperatura ambiente, 25° C controlados, durante um período necessário para o desenvolvimento das colônias.

Para uma inoculação perfeita, visando medir o diâmetro da colônia no sétimo dia de desenvolvimento, 10 µl de suspensão de conídios apresentando aproximadamente 16.000 conídios, foram inoculadas em uma placa de Petri contendo meio SDA.

3.5.2 Isolamento.

Semanalmente foram feitos repiques e novas distribuições das colônias em placas de Petri contendo meio SDA, preparadas conforme descrito anteriormente, visando o isolamento das colônias. Em fluxo laminar previamente esterilizado, com auxílio de uma alça de inoculação esterilizada em bico de Bunsen, foram feitos repiques nas colônias antigas, transferindo o material coletado diretamente para superfície do ágar, no centro dos novos meios de cultura, disseminando os fungos para novas placas, visando o isolamento e a uniformidade de novas colônias. Os repiques foram realizados em intervalos de sete dias, até que o isolamento total das colônias fosse confirmado.

3.6 Preparação de montagens para estudo.

3.6.1 Técnica de microcultivo em lâmina.

A técnica de microcultivo em lâmina, segundo Koneman et al. (2001), foi realizada inicialmente, colocando-se um pedaço circular de gaze sobre o fundo de uma placa de Petri esterilizada, a qual, recebeu o depósito sobre a gaze de um par de varetas de vidro de comprimento apropriado para caber na placa, servindo as varetas como apoio para uma lâmina de vidro de 76 x 26 mm.

Um bloco de Ágar Sabouraud Dextrose foi colocado com auxílio de uma espátula sobre a superfície central da lâmina e nele inoculado nas bordas do bloco de agar em três ou quatro lugares uma porção da colônia, com auxílio de uma alça de inoculação, esterilizada em bico de Bunsen. Uma lamínula foi aquecida passando-a rapidamente pela chama de um bico de Bunsen e colocada de imediato sobre a superfície do bloco de ágar inoculado. O aquecimento da lamínula proporcionou uma fixação entre sua face inferior e a superfície do ágar, o qual se fundiu ligeiramente pelo vidro aquecido. Com auxílio de pipeta, uma pequena quantidade de água destilada,

suficiente para saturar a gaze, foi depositada no fundo da placa. A placa foi tampada e incubada à temperatura ambiente durante um período de 5 a 7 dias.

Quando o crescimento fúngico mostrou-se visualmente suficiente, a lamínula pode ser retirada com auxílio de um palito de madeira, cuidando-se para que não se rompesse, mais do que o suficiente o micélio aderido na face inferior da lamínula. Esta operação foi realizada em gabinete de segurança, sobre um recipiente contendo um líquido de descontaminação com fenol a 5%, no qual os blocos de ágar foram descartados. A lamínula então foi colocada sobre uma gota do corante azul-de-lactofenol na superfície de outra lâmina de 76 x 26 mm e levada ao microscópio para análise.

3.6.2 Preparação por desagregação.

Utilizando duas agulhas de dissecação, uma pequena porção da colônia em estudo foi extraída, incluindo parte do ágar que se encontrava abaixo da superfície. O fragmento da colônia foi colocado em uma gota de azul-de-lactofenol sobre uma lâmina e os fragmentos do micélio foram desagregados com as agulhas e cobertos com lamínula. Para facilitar a dispersão de pequenos grânulos de ágar, a lamínula foi levemente pressionada.

3.7 Corante Azul-de-lactofenol

O corante utilizado na preparação das montagens para estudo dos isolados dos laboratórios de anatomia foi o azul-de-lactofenol. O LPCB é um corante que cora a quitina presente nas paredes celulares dos fungos, proporcionando assim, a visualização do micélio vegetativo e reprodutivo de fungos filamentosos. No corante, o fenol tem a função de matar todos os microorganismos, enquanto o ácido láctico preserva as estruturas fúngicas. Devido ao LPCB ser altamente tóxico e provocar problemas

adversos a saúde de pessoas que entram em contato com a solução, o LPCB foi manipulado em um capela de exaustão (KERN; BLEVINS, 1999).

A preparação do azul-de-lactofenol se dá com a seguinte fórmula:

Fenol concentrado.....	20 ml
Ácido láctico.....	20 ml
Glicerol.....	40 ml
Azul de tripan.....	0,05 g
Água destilada.....	20 ml

A água, ácido láctico, o glicerol e o fenol concentrado foram adicionados nesta ordem em Erlenmeyer e misturados durante uma hora. Uma vez a solução homogeneizada, o azul de tripan foi adicionado e a solução novamente homogeneizada por mais uma hora. Com auxílio de um funil o corante foi colocado em um recipiente de vidro escuro e armazenado em geladeira.

3.8 Métodos de análise e identificação.

3.8.1 Análise macroscópica.

A análise macroscópica das colônias foi feita mediante observação direta, onde foram analisadas: a velocidade de crescimento no isolamento primário das colônias; o diâmetro da colônia no sétimo dia de desenvolvimento, mensurado com auxílio de um paquímetro de precisão; a coloração do micélio reprodutivo, especificando a cor dos conídios; a coloração do reverso das colônias; a topografia, descrevendo as várias configurações de elevações e vales observadas nas culturas e a textura do micélio aéreo, descrevendo a altura do micélio. Todos esses elementos foram registrados em uma prancha de identificação conforme ANEXO A, servindo apenas como orientação e não como critério absoluto na identificação.

3.8.2 Análise microscópica.

Para análise e identificação microscópica foi utilizado o microscópio Leica DMLB e feitas fotomicrografias com o sistema fotográfico Leica MPS – 30. As lâminas pesquisadas foram preparadas mediante técnica de microcultivo em lâmina e pelo processo de desagregação, conforme descrito anteriormente, onde foram analisadas: as estruturas hifálicas, verificando a presença de septos; a regularidade dos septos e a presença de células pé; as estruturas microscópicas dos conidióforos; as estruturas microscópicas das fiálides, verificando a disposição das mesmas.

3.9 Análise dos resultados.

A análise dos resultados foi feita mediante apreciação dos dados macroscópicos, obtidos a partir da observação direta e dos dados microscópicos adquiridos com ajuda de fotomicrografias. Os dados obtidos com as características morfológicas e fisiológicas do gênero foram confrontados com os dados da Comissão Internacional em *Penicillium* e *Aspergillus* (ICPA), uma comissão da União Internacional e Sociedade Microbiológica, uma instituição que tem como propósito, prover aos indivíduos interessados, informações básicas sobre o gênero *Aspergillus*, visando facilitar a pesquisa e a melhoria da precisão e identificação das espécies fúngicas. Após a comparação dos dados, pode-se determinar o gênero e a espécie dos isolados das peças anatômicas dos laboratórios de anatomia e avaliar mediante pesquisa bibliográfica se os fungos isolados oferecem riscos à saúde das pessoas expostas a eles.

3.10 Análise da resistência dos conídios a diferentes concentrações de formaldeído com o método 3-(4,5-Dimetil-2-Tiazil)-2-5Difenil-2H-Tetrazólio Bromide (MTT).

Para avaliação da resistência dos conídios em diferentes concentrações de formaldeído, pelo método colorimétrico MTT (MELETIADIS et al. 2000), em fluxo

laminar previamente esterilizado, foram distribuídos em tubos de culturas estéreis, meios de cultura (caldo Sabouraud) com diferentes concentrações de formaldeído (15%, 12,5%, 10%, 7,5%, 5%, 2,5%). Em seguida cada concentração de formaldeído foi distribuída com auxílio de pipetas, em triplicata, em placas de microtitulação de 96 poços, adicionados de inóculos com aproximadamente 16.000 conídios previamente preparados, obtendo um volume final de 90 μ l. Três poços receberam o inóculo de conídios e o volume foi completado para 90 μ l com caldo Sabouraud, para servirem de controle. Em seguida a placa de microtitulação foi incubada por 48 horas a 37°C controlados em estufa de cultura, Fanem Modelo 002 CB.

Após o tempo de incubação, cada poço recebeu 10 μ l de MTT, dissolvidos em PBS, numa concentração final de 5mg/ml. Em seguida a placa de microtitulação foi protegida da luz com papel alumínio e incubada novamente por 3 horas a 37°C. Depois das 3 horas de incubação foram adicionados em cada poço 100 μ l de solvente orgânico DMSO e 100 μ l etanol, para extrair a tintura. A placa foi embalada novamente e colocada em agitador, Marconi MA 162, por 30 minutos em agitação suave. Ao término dos 30 minutos a densidade óptica (DO) foi medida com um leitor de ELISA, Spectra Count™ PACKARD, usando um comprimento de onda de absorbância de 570nm. A porcentagem de conversão de MTT para seu derivado formazan foi calculada comparando o DO a 570nm dos poços controles com base na seguinte equação:

$$A = \frac{(570 \text{ de poços que continham droga} - \text{poço em branco})}{(570 \text{ dos poços sem drogas} - \text{poço em branco})} \times 100.$$

O MTT foi testado para avaliar possíveis efeitos inibitórios no crescimento de fungos filamentosos. Um inóculo de suspensão de conídios com aproximadamente 16.000 conídios, foi incubado em caldo Sabouraud, com diferentes concentrações de MTT que variaram de 4 para 0.06mg/ml, por 72 horas a 37°C. A inibição de crescimento foi avaliada por observação visual dos poços que continham MTT, comparado com os poços MTT-livres. O nível de inibição do crescimento fúngico demonstrou que o MTT é um reagente que não provoca efeitos inibitórios sobre o desenvolvimento fúngico (MELETIADIS et al. 2000).

3.11 Análise dos resultados do MTT.

Os isolados foram testados três vezes pelo método colorimétrico MTT com diferentes concentrações de formaldeído nas mesmas condições ambientais. A avaliação do desenvolvimento dos esporos fúngicos derivou da comparação das três análises para cada combinação da concentração de formaldeído - isolado e os resultados derivam dessas leituras.

Foi utilizado, na elaboração deste relatório técnico, o software: MSOffice Excel, versão 2002, para o gerenciamento de banco de dados, para a execução dos cálculos estatísticos, elaboração e edição de gráficos e tabelas.

4. RESULTADOS

Para identificar o gênero e a espécie dos isolados das peças anatômicas conservadas em solução de formol a 10% e os isolados dos recipientes de descarte do laboratório de anatomia, realizou-se análises macroscópicas dos caracteres fenotípicos das colônias e análises microscópicas dos caracteres fenotípicos dos fungos isolados. Para a análise macroscópica, inicialmente, os isolados foram separados em dois grupos mediante semelhanças fenotípicas das colônias.

Os isolados do primeiro grupo apresentaram as seguintes características macroscópicas, como descrito na tabela 1 e ilustrados nas figuras 1a e 1b.

TABELA 1. Características macroscópicas da colônia do primeiro grupo.

<i>Caracteres mensurados</i>	<i>Caracteres fenotípicos</i>
Velocidade de crescimento.....	Rápido.
Diâmetro no sétimo dia.....	25 mm.
Coloração do micélio reprodutivo.....	Branca, passando para amarelo, alaranjado e amadurecendo na coloração verde.
Coloração reversa.....	Amarelo claro, passando para alaranjado e finalizando em vermelho.
Topografia.....	Rugosa.
Textura.....	Pulverulenta.

Os isolados do segundo grupo, compartilhavam com os do primeiro grupo algumas características fenotípicas em comum, porém diferiam na coloração do micélio vegetativo e no reverso da colônia. Os caracteres macroscópicos estão descritos na tabela 2 e ilustrados nas figuras 2a e 2b.

TABELA 2. Características macroscópicas da colônia do segundo grupo.

<i>Caracteres mensurados</i>	<i>Caracteres fenotípicos</i>
Velocidade de crescimento.....	Rápido.
Diâmetro no sétimo dia.....	25 mm.
Coloração do micélio reprodutivo.....	Branca, passando para passando para verde acinzentado.
Coloração reversa.....	Amarelo claro, passando para marrom avermelhado.
Topografia.....	Rugosa.
Textura.....	Pulverulenta.

Quando foram analisados os caracteres fenotípicos microscópicos, constatou-se que os isolados do primeiro grupo compartilhavam as mesmas características com os isolados do segundo grupo, tratando-se de uma espécie fúngica com determinadas variações a nível macroscópico. As análises microscópicas dos isolados foram realizadas mediante apreciação de fotomicrografias, tiradas com o sistema fotográfico Leica MPS – 30. Os caracteres microscópicos estão apresentados na tabela 3 e ilustrados nas figuras 3, 4, 5 e 6.

TABELA 3. Características microscópicas dos isolados do primeiro e segundo grupo.

<i>Caracteres mensurados</i>	<i>Caracteres fenotípicos</i>
Hifas.....	Septadas hialinas, com septos uniformes.
Células pé.....	Presentes.
Conidióforos.....	Longos e lisos.
Vesículas.....	Piriforme / espatulada.
Fiálides.....	Bisseriadas, esparsamente radiadas, cobrindo a maior parte da vesícula.
Conídios.....	Globoso.

Os dados macroscópicos e microscópicos obtidos contendo as informações morfológicas e fisiológicas dos isolados foram apreciados e confrontados com os dados da Tabela 4 da Comissão Internacional em *Penicillium* e *Aspergillus* (ICPA). Após a comparação dos dados, pode-se determinar que os isolados das peças anatômicas e dos recipientes de descarte eram pertencentes ao gênero *Aspergillus* e da espécie *Aspergillus versicolor*. Um fungo oportunista pertencente ao phylum Ascomycota, o maior phylum de fungos, que inclui quase 50% de espécies fúngicas conhecidas; da classe Plectomycetes, da ordem Eurotiales, e da família Trichocomaceae (GUARRO; GENÉ; STCHIGEL, 1999).

Tabela 4: Tabela de identificação de espécies de *Aspergillus*, da Comissão Internacional em *Penicillium* e *Aspergillus* (ICPA).

	clav	pen	vers	terr	can	nig	och	flav	ams	nid	fum
coloração do micélio	-	-	-	(+)	-	-	-	-	+	-	-
exudate	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
coloração do reverso	-	+	+	+	-	+	+	-	(+)	+	+
pigmentos solúveis	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
cleistotecia	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-
células de Hülle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
estipe rugosa	-	-	-	-	-	-	(+)	+	-	-	-
estipe colorida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Vesícula											
globosa	-	(+)	-	(+)	(+)	+	+	+	(+)	-	-
piriforme	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
espatulada	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
clivada	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)
Fiálides											
uniseriada	+	+	-	-	(+)	-	-	+	+	-	+
bisseriada	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-
Conídios											
Globoso	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
elipsoidal	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	(+)
parede lisa	+	-	(+)	+	+	-	+	-	(+)	-	+
parede rugosa	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	(+)
Ascosporos	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-

Legenda

clav = *A. clavatus*.

pen = *A. penicilliodes*.

vers = *A. versicolor*.

terr = *A. terreus*.

can = *A. candidus*.

nig = *A. niger*.

och = *A. ochraceus*.

flav = *A. flavus*.

ams = *Eur. amstelodami*.

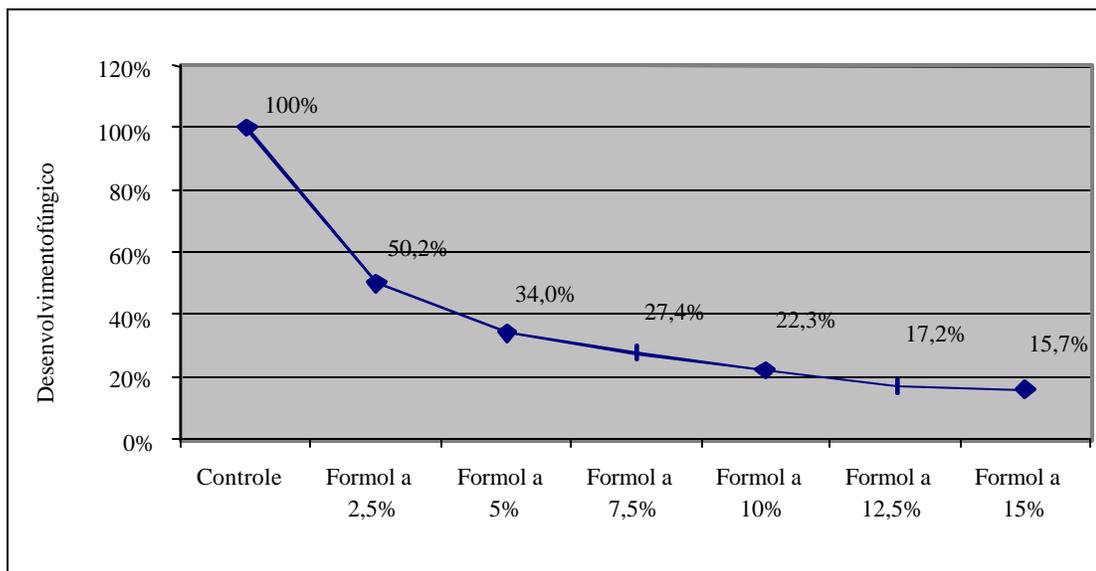
nid = *Eme. nidulans*.

fum = *A. fumigatus*.

Conforme descrito na metodologia, a contagem dos conídios foi realizada sete dias após a inoculação e a contagem dos conídios provenientes da raspagem demonstrou que o *Aspergillus versicolor* é um fungo com alto grau de esporulação, sendo potencialmente contaminante. As contagens variaram pouco de uma amostra para outra, porém, mantiveram uma média alta, da ordem de $1,7 \times 10^6$ conídios por ml.

A resistência dos conídios do *Aspergillus versicolor* foi avaliada em diferentes concentrações de formaldeído pelo método 3-(4,5-dimetil-2-tiazil)-2-5difenil-2H-tetrazólio Bromide (MTT). Os resultados do experimento estão ilustrados no gráfico 1, o qual demonstra que depois de 48 horas de exposição a diferentes concentrações de formaldeído, a inibição do desenvolvimento fúngico não foi total em nenhuma das concentrações mensuradas, demonstrando ser o *Aspergillus versicolor* um fungo resistente a pequenas concentrações de formaldeído, sendo a concentração a 10% utilizada nos laboratórios de anatomia humana, ineficiente para inibir o crescimento do fungo.

Gráfico 1: Avaliação da resistência dos isolados a diferentes concentrações de formaldeído - 48 h, pelo método MTT.



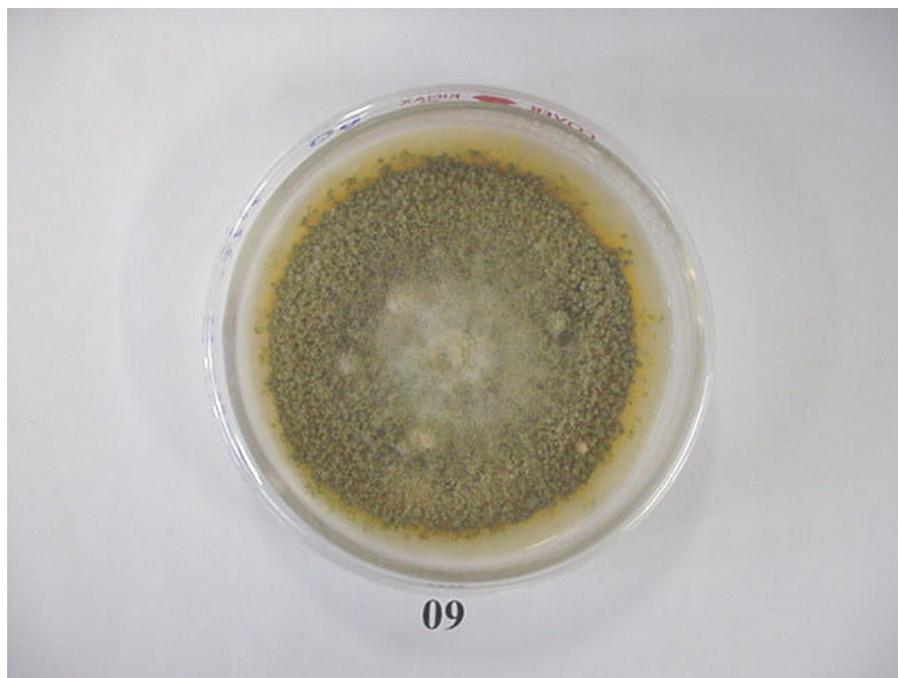


Figura 1a: Colônia isolada de amostra da crista ílíaca, apresentando coloração do micélio verde e a textura pulverulenta devido à densa produção de conídios.

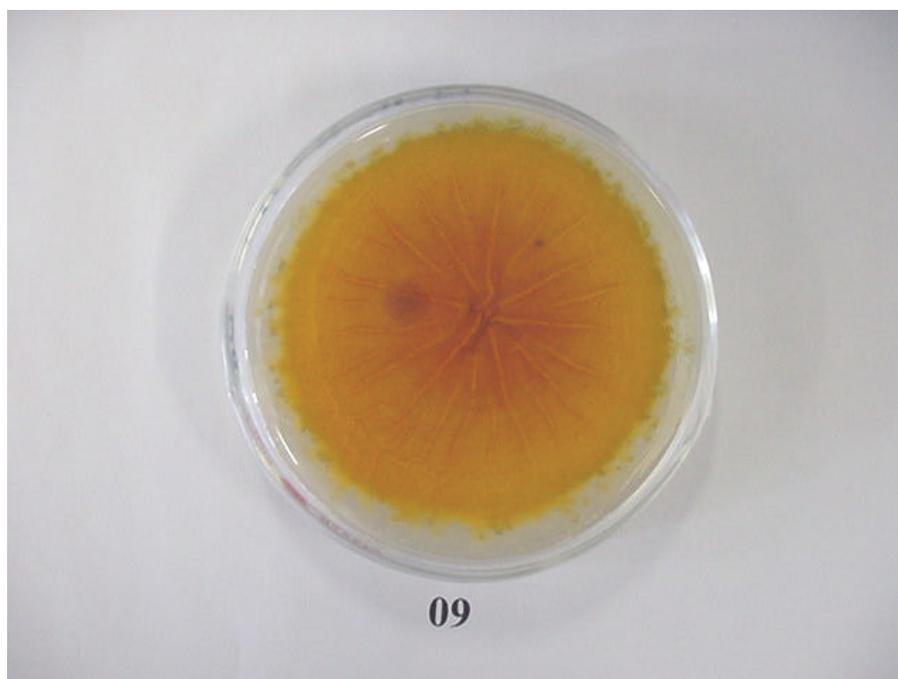


Figura 1b: Reverso da colônia isolada da crista ílíaca, com coloração amarelo, passando para avermelhado, e topografia rugosa, com sulcos profundos irradiando irregularmente a partir do centro.

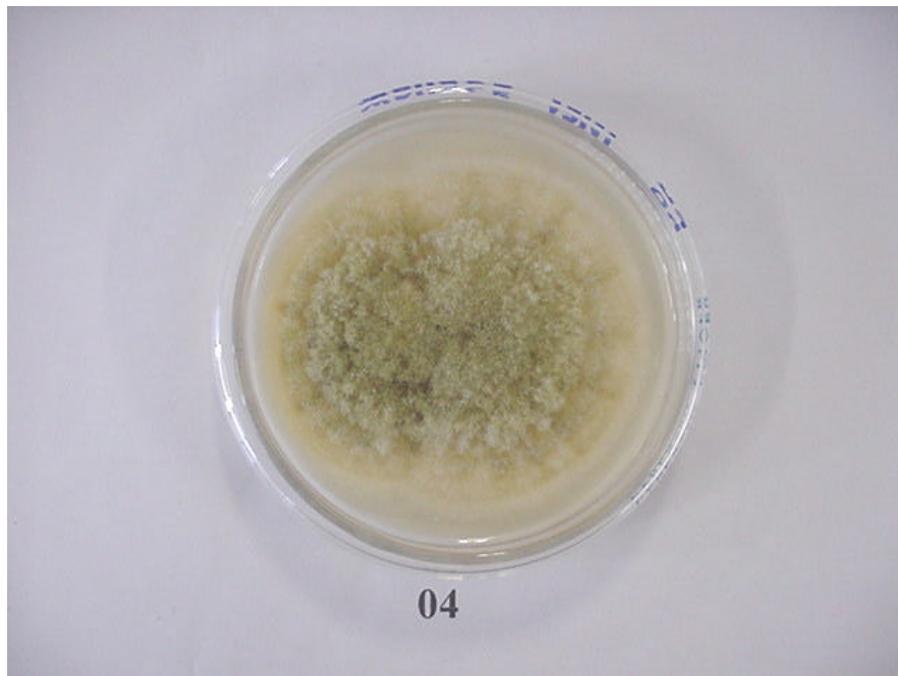


Figura 2a: colônia isolada do couro cabeludo, apresentando coloração do micélio reprodutivo inicialmente branca, passando para verde acinzentado.

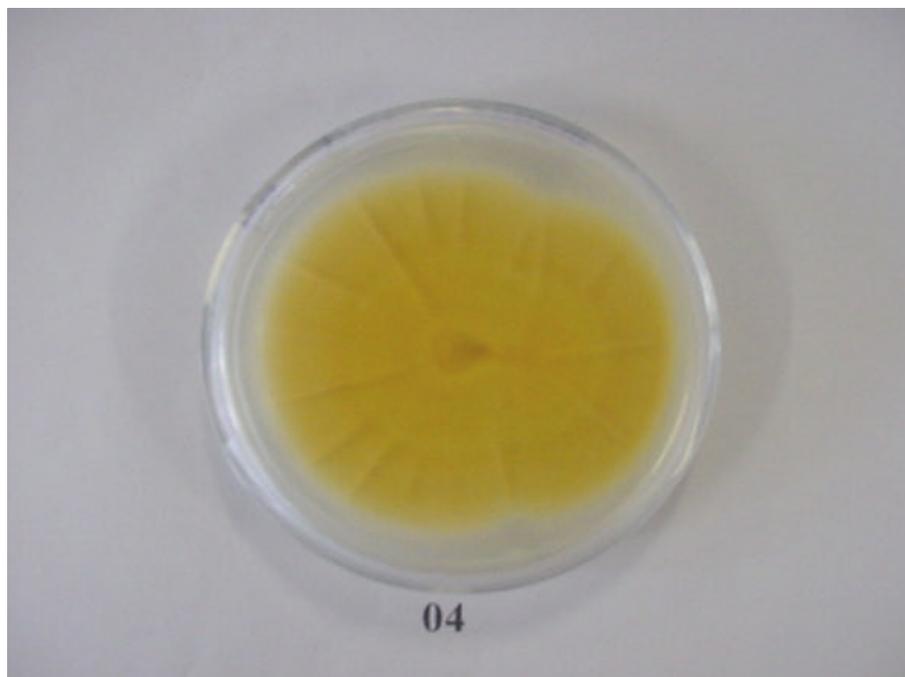


Figura 2b: Reverso da colônia isolada do couro cabeludo, demonstrando coloração amarela e topografia rugosa, com sulcos profundos irradiando irregularmente a partir do centro.



Figura 3: célula pé, um segmento hifálico especializado que serve como ponto de origem do conidióforo. Aumento de 2500 X.

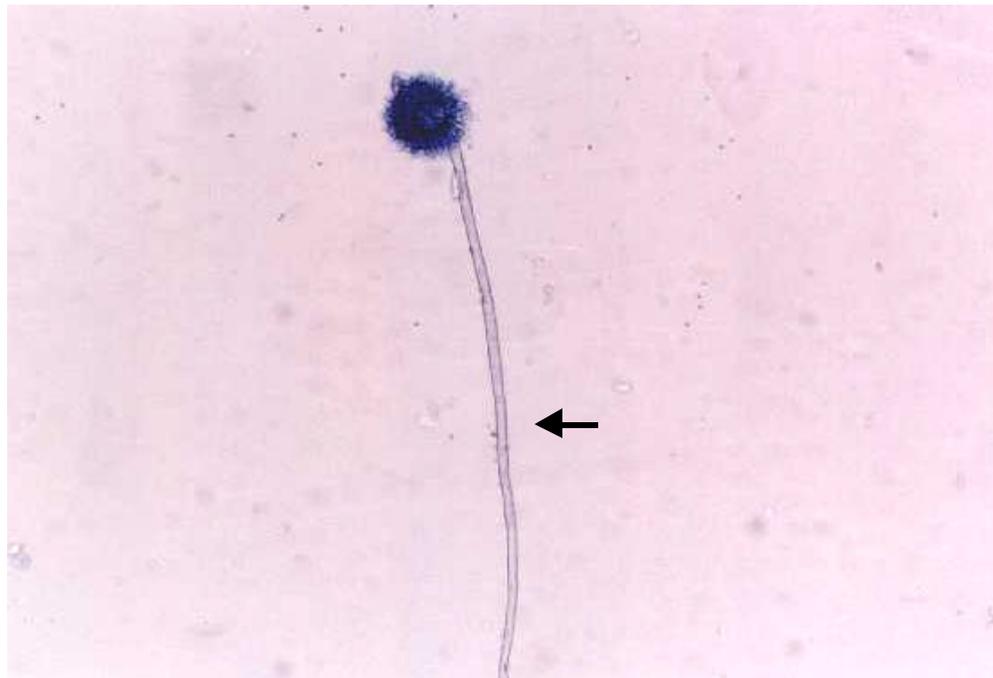


Figura 4: conidióforos longos e lisos, compostos de uma seção apical inchada denominada vesícula. Aumento de 250 X.

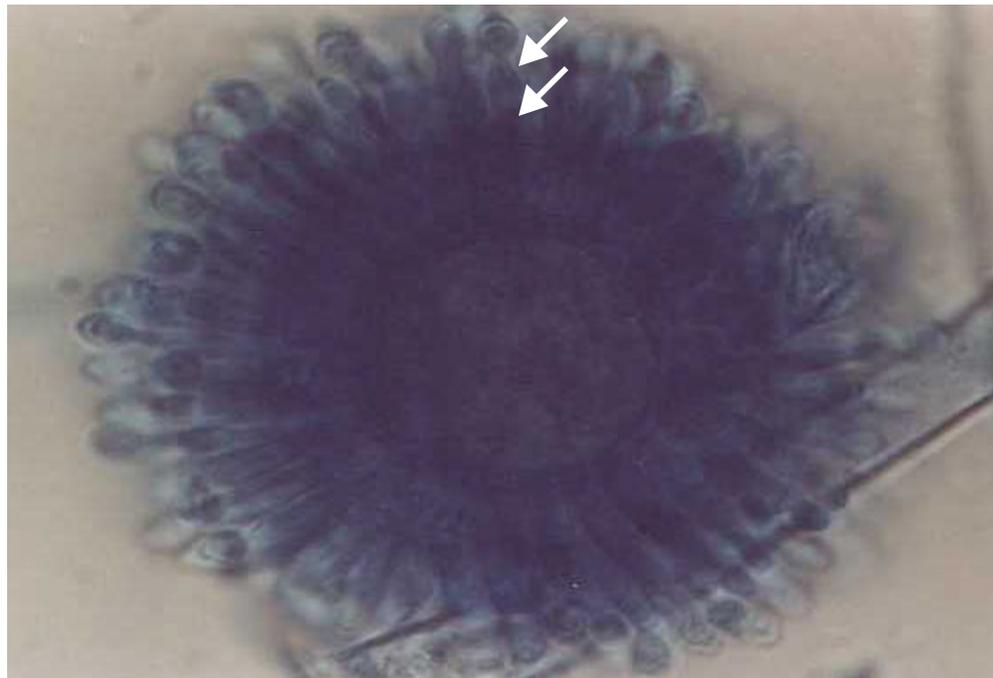


Figura 5: Fiálides bisseriadas, distribuídas esparsamente radiadas, cobrindo a maior parte da vesícula. Aumento de 2500 X.



Figura 6: Conídios apresentando forma globosa. Aumento de 2500 X.

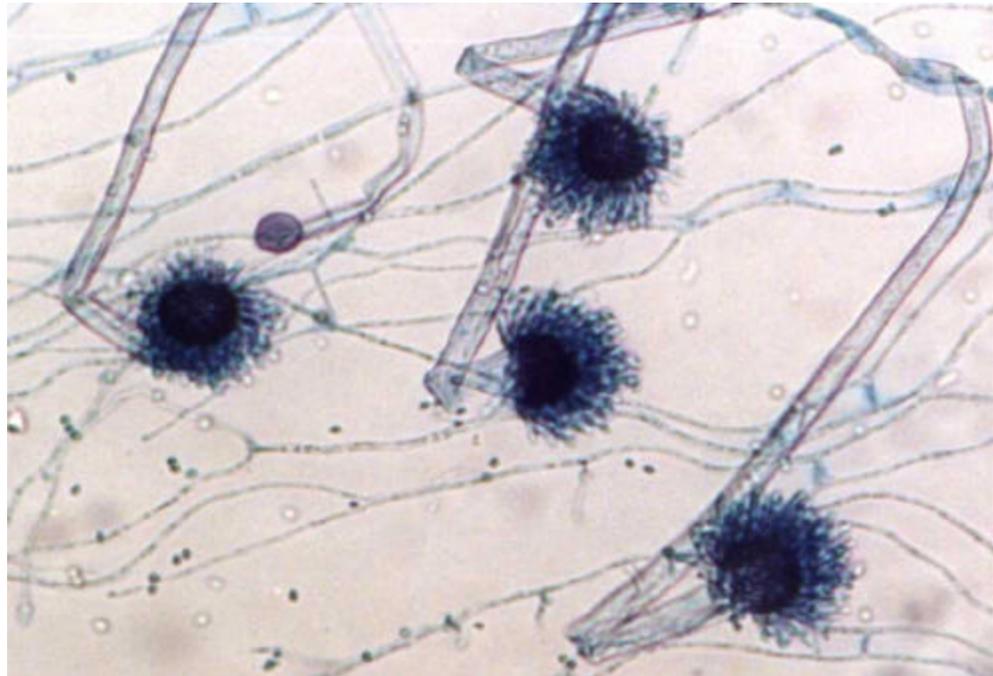


Figura 7: *Aspergillus versicolor*. Aumento de 1000X.

5. DISCUSSÃO

O isolamento de *Aspergillus versicolor*, nas peças anatômicas conservadas em solução de formol a 10% em laboratórios de anatomia humana é um fato que deve ser tratado com cautela, visto as conseqüências adversas à saúde que a exposição a esse agente pode causar, quando encontrado contaminando ambientes fechados (MEKLIN et al., 2002). Apesar de ser o *Aspergillus versicolor* um agente pertencente às espécies freqüentemente encontradas em ambientes fechados como casas e escolas (ENGELHART et al., 2002; HODGSON et al., 1998), o desenvolvimento de fungos do gênero *Aspergillus* em laboratórios de anatomia humana é o suficiente para implicá-los como causadores de doenças, pois não são contaminantes naturais da rotina nos laboratórios de anatomia humana (ANDRÉ et al., 2000).

Estudos demonstram que a presença de *Aspergillus versicolor* em ambientes escolares está associada a uma erupção de doenças alérgicas das vias respiratórias. Vários sintomas periódicos e irritantes, como asma e pneumonia de hipersensibilidade foram detectados entre os alunos e moradores de habitações contaminadas pelo *Aspergillus versicolor* (HAVERINEN et al. 1999; JARVIS; MOREY 2001), fato esse, que vem a cada dia ganhando mais interesse, pois, de acordo com estudos epidemiológicos, é possível que alguns metabólicos secundários aerolizados por esse fungo no ar, possam ser responsáveis por problemas de saúde das quais os ocupantes dos locais contaminados sofrem (PIECKOVA; KUNOVA, 2002).

Dentre os bioaerossóis liberados pelo *Aspergillus versicolor*, os conidiósporos ganham destaque, pois conforme dados obtidos na mensuração dos conídios, neste trabalho, o *Aspergillus versicolor* é um fungo com alto poder de esporulação, desta forma, podendo contaminar todo ambiente do laboratório e ocasionar riscos à saúde dos ocupantes de laboratórios contaminados pelo fungo, uma vez que, seus conidiósporos são potencialmente perigosos à saúde das pessoas expostas a eles, podendo estes induzir respostas inflamatórias e efeitos respiratórios, conforme caracterizado por Jussila et al. (2002), onde ratos expostos aos conidiósporos de *Aspergillus versicolor*, avaliados com marcadores bioquímicos e histopatologia, 24 horas após a exposição ao fungo,

demonstraram inflamação e toxicidade nos pulmões. Os resultados apresentados por Jussila et al. (2002), confirmaram assim que o “*Aspergillus versicolor* é um fungo de alta citotoxicidade” conforme proposto por (MURTONIEM et al., 2001) e que seus conidiósporos são importantes produtores de mediadores inflamatórios e indutores de sintomas respiratórios (MURTONIEM et al., 2001; MURTONIEM et al., 2002).

Experimentos verificaram que cobaias expostas por um período de dois anos aos conidiósporos de *Aspergillus versicolor* desenvolveram casos de mesotelioma pleural e carcinoma pulmonar, demonstrando assim, que o *Aspergillus versicolor* é um fungo de elevada periculosidade, capaz de causar danos severos (SUMI et al., 1987). Em outro trabalho mais recente, Sumi et al. (1994), identificaram lesões granulamentosas no pulmão inteiro, especialmente ao redor dos bronquíolos, estendendo-se dos tubos alveolares aos espaços alveolares, em cobaias expostas ao *Aspergillus versicolor* por um período de seis meses. Desta forma a exposição prolongada de alunos, professores e técnicos em anatomia, e conseqüente inalação de conidiósporos em laboratórios de anatomia humana contaminados pelo fungo, torna-se potencialmente perigoso à saúde, uma vez que os alunos nem sempre utilizam equipamentos de proteção e não conhecem os riscos reais a saúde que o ambiente contaminado oferece; enfatizando ainda, os técnicos e professores, que estão expostos por mais tempo aos conidiósporos e que com o passar dos anos “esquecem” das normas de segurança, demonstrando uma alta confiança no que fazem e ignorando os riscos a saúde.

Para agravar ainda mais a contaminação ambiental e os riscos a saúde dos alunos e profissionais da anatomia, um recente trabalho publicado por Górný et al. (2002), relata a construção de uma câmara de aerolização, que mensurou a liberação de propágulos fúngicos de diversos fungos, inclusive do *Aspergillus versicolor*, em ambientes fechados. Os resultados demonstraram que os fragmentos fúngicos são libertados das superfícies contaminadas, em números até 320 vezes mais altos que os esporos. Estes resultados aumentam ainda mais a preocupação com a saúde de pessoas com histórico de rinite e asma, expostas em ambientes contaminados, pois tais partículas apresentam uma reatividade imunológica alta, exibindo o micélio uma

reatividade imunológica ainda maior que a resposta induzida pelos esporos (FADEL et al., 1992).

Desta forma, a presença de esporos e partículas suspensas no ar é relatada claramente como o começo de alergias sazonais, onde as partículas pequenas são especialmente importantes a pacientes alérgicos porque, tais partículas podem penetrar imediatamente nos alvéolos pulmonares e provocar reações asmáticas (RANTIO; VIANDER, 1994). Nesses termos podemos relacionar casos isolados de alergia de origem desconhecida, no laboratório de anatomia, com a presença dos esporos e dos fragmentos liberados pelo fungo, fato esse que futuramente deve ser investigado, a fim de evitar novos problemas, uma vez que a presença do *Aspergillus versicolor* está caracterizada.

Outro agravante à saúde das pessoas expostas ao *Aspergillus versicolor* é a produção da micotoxina esterigmatocistina pelo fungo (LEPOM; KLOSS, 1988), uma micotoxina onipresente, precursora da aflatoxina B1, encontrada naturalmente em ambientes com problemas de proliferação de *Aspergillus versicolor* (TUOMI et al., 2000; SIVAKUMAR et al. 2001).

A esterigmatocistina é uma micotoxina implicada em vários estudos como precursora de diversos tipos de cânceres, fato esse que nos últimos anos tem despertado muito interesse. Em estudos Xie (1990), sugere que a esterigmatocistina seja um carcinógeno potencial em humanos, visto que, cobaias expostas a micotoxina, desenvolveram adenocarcinoma do pulmão em 42.9% e hiperplasia atípica do estômago glandular em 37.4%. Xie, (1993), sugere ainda que a esterigmatocistina possa ser um carcinógeno para células gástricas. Células gástricas humanas, cultivadas *in vitro*, foram tratadas com solução de extrato de *Aspergillus versicolor*, (0.117mg de esterigmatocistina por Kg cultivado de *Aspergillus versicolor*), demonstrando após os experimentos perda de inibição de contato e polaridade, ratificando ser a esterigmatocistina, um carcinógeno potencial.

Bem antes destes trabalhos, Fujii et al. (1976), em um estudo de toxicidade já havia verificado que pequenas quantidades de esterigmatocistina induzem tumores de pulmão e fígado em ratos.

Em estudos Engelhart et al. (2002), quantificaram *in vitro* a produção de esterigmatocistina por *Aspergillus versicolor* isolados em pó de tapetes de habitações contaminadas pelo fungo e concluíram que a micotoxina poderia acontecer ocasionalmente em pó de tapetes de ambiente fechados. Nestes termos também a produção de esterigmatocistina poderia ocorrer eventualmente em laboratórios de anatomia, com problemas de proliferação de *Aspergillus versicolor*, sendo preciso assim, futuras investigações para comprovar a produção de esterigmatocistina pelos fungos isolados nas peças anatômicas e nos recipientes de descarte dos laboratórios de anatomia humana, bem como, pesquisas e investigações no campo da sistemática para promover uma compreensão das reais implicações a saúde, quando eventuais exposições a micotoxinas em ambientes fechados (ROBBINS et al., 2000), uma vez que muitos trabalhos discutem sobre os riscos reais quanto à exposição as micotoxinas (PAGE; TROUT, 2001; PITT et al., 2000; SUDAKIN, 1998).

Dentre as contestações quanto aos efeitos reais produzidos pelas micotoxinas, Pitt et al. (2000) expõem que as micotoxinas e os fungos que as produzem ganham a cada dia, importância crescente como causa de doenças humanas, contudo as doenças produzidas pelos fungos permanecem mal entendidas em nível clínico. Albright, (2001), relata ainda, que há uma falta significativa de dados a respeito dos efeitos à saúde humana quanto à exposição aerotransportada de micotoxinas, visto que, muitos dos dados disponíveis são de estudos e ingestão em animais, sendo que, tais dados não parecem demonstrar um elo definitivo entre exposição a micotoxinas e doenças. Relata também que a extrapolação dos dados de toxicologia animal é questionada devido a vários fatores: 1. As variações de doses e as vias de exposição para micotoxinas, bem como as espécies animais trabalhadas, criam muita incerteza quando se tenta transferir a exposição para humanos. 2. Os animais experimentais apresentam sensibilidades variadas as diferentes toxinas fúngicas. 3. O uso de dados animal para predizer perigo a humanos, implica o desenho de muitas assunções.

Intervenções futuras onde exposição à micotoxinas é suspeita, deverão ser enfatizadas, visto a importância da avaliação de risco e comunicação de risco, quanto à exposição para fungos toxigênicos, já que é difícil investigar e confirmar determinados problemas, dados os limites atuais do conhecimento epidemiológico relativo à exposição para estes organismos e doenças relacionadas (SUDAKIN, 1998), bem como, claramente, a prevenção do desenvolvimento fúngico e eventual produção de micotoxinas nas peças anatômicas e dentro do ambiente do laboratório de anatomia é uma prioridade, juntamente com o desenvolvimento de estratégias para a eliminação de condições que podem conduzir ao desenvolvimento fúngico.

Portanto, tendo por base o descrito nos parágrafos anteriores, a proteção pessoal do sistema respiratório com máscaras, bem como o uso obrigatório de luvas, são recomendados fortemente aos alunos, professores e técnicos de anatomia humana, uma vez que os casos isolados de alergia de origem desconhecida em nosso laboratório podem ser atribuídos tanto à presença do *Aspergillus versicolor*, como ao formaldeído utilizado na conservação das peças anatômicas, já que, tanto os fungos como o formaldeído presentes no ambiente são relacionados como indutores de problemas de saúde em ambientes escolares (DAISEY; ANGELL; APTE, 2003).

A evaporação do formaldeído de cadáveres em laboratórios de anatomia humana pode produzir exposições altas entre os estudantes e instrutores (KEIL; AKBAR-KHABZADEH; KONECNY, 2001). Desta forma, Uba et al. (1989) relatam uma incidência de broncoconstrição e sintomas respiratórios, sintomas agudos de irritação nos olhos em estudantes de medicina expostos ao formaldeído em um período de sete meses de aula. Relatam ainda, casos de asma e irritações respiratórias entre os alunos com predisposição histórica.

Desta forma levantamos um questionamento, sobre as aulas de anatomia, que geralmente são geminadas, fato esse que expõem os alunos por um período médio de 100 minutos, tempo suficiente para desencadear na maioria dos alunos irritações nos olhos e nas vias respiratórias superiores, fatos confirmado assim por Sauder et al. (1987). No mesmo trabalho, Sauder et al. (1987), demonstraram ainda que a

broncoconstrição em asmáticos não ocorre num período menor ou igual à meia hora de exposições a 3 ppm de formaldeído. Desta forma uma reflexão nos leva a crer que a exposição prolongada de alunos com histórico de asma, ao formaldeído no laboratório de anatomia, poderia, juntamente com os fungos ser responsável pela indução de casos alérgicos, enfatizando-se assim a necessidade de novos estudos.

Em outros estudos, Grafstrom (1990), verifica a ação tóxica respiratória e carcinógena dos aldeídos em animais de laboratório, destacando o formaldeído como um indutor de efeitos patobiológicos associados com carcinogênese, ratificado por Dallas, et al. (1992) que verificaram efeitos genotóxicos significantes, localmente em macrófagos alveolares pulmonares, sugerindo assim, que exposições prolongadas e repetitivas a altas concentrações de formaldeído, possam ser carcinógenas para ratos, podendo desta forma equiparar o perigo para humanos expostos ao formaldeído por períodos prolongados, como sugerido por Laforest et al. (2000), que demonstrou uma relação significativa, ente o câncer hipofaríngeo e as exposições a determinadas concentrações de formaldeído.

Desta forma, para maior proteção e segurança, Chia et al. (1992), sugerem que escolas médicas deveriam adotar medidas mais concretas para reduzir a exposição de estudantes ao formaldeído. Enquanto isso, embora não seja a prática na maioria das escolas médicas, os estudantes deveriam ter acesso pronto a óculos de proteção e máscaras ao trabalhar em laboratórios de dissecação.

Observando o gráfico 1, referente à análise da resistência dos conidiósporos do *Aspergillus versicolor* em diferentes concentrações de formaldeído pelo método MTT, pode-se observar que o formaldeído não inibiu totalmente o desenvolvimento fúngico, em nenhuma das concentrações avaliadas, no período de 48 horas de exposição, demonstrando assim, que a solução de formol a 10% utilizada no processo de fixação dos cadáveres, peças anatômicas e vísceras utilizadas no laboratório de anatomia é ineficiente para eliminar toda atividade microbiana, contradizendo Burke e Sheffner (1976) que afirmaram que às práticas de embalsamamento reduzem o perigo de

transmissão potencial de agentes microbianos infecciosos dentro do ambiente imediato de restos humanos embalsamados.

Mediante a segurança nos resultados produzidos pelo método de MTT, que habilita a quantificação precisa da proliferação hifálica dos fungos, bem como avalia com segurança a viabilidade dos esporos fúngicos (STENTELAIRE et al., 2001; MELETIADIS, et al., 2000), a confirmação que desinfecção pela solução de formaldeído a 10% não é total, sugere que estudos futuros deverão ser elaborados visando o desenvolvimento e a adequação de novas fórmulas, visando o registro de melhores resultados na conservação das peças anatômicas e melhor desinfecção, uma vez que, fungos do gênero *Aspergillus*, que foram encontrados contaminando as peças anatômicas e os recipientes de descarte, tanto neste trabalho, como no trabalho apresentado por André et al. (2000), apresentam uma certa resistência aos efeitos antimicrobianos de determinadas concentrações de formaldeído conforme mencionado por Spicher; Peters, (1976).

Em outro trabalho, Ezeonu et al. (1995), promoveram a germinação de conídios e o crescimento de *Aspergillus versicolor*, onde foram descobertos, uréia, formaldeído e produtos orgânicos não identificados nos extratos de crescimento, ratificando assim, que o *Aspergillus versicolor* é um fungo que apresenta resistência a determinadas concentrações de formaldeído.

Tais resultados levaram a crer que os fungos presentes nas peças anatômicas conservadas em solução de formaldeído a 10%, não morrem quando ficam submersos na solução dentro das cubas, mas, poderiam estar num estado de dormência. Porém quando as peças são retiradas das cubas e ficam sobre as bancadas por períodos indeterminados, enquanto os estudos são efetuados, o formaldeído das peças começa a evaporar, diminuindo sua concentração e, em uma curva inversa à concentração do formaldeído, os conidiósporos do *Aspergillus versicolor* começariam a germinar, contaminando assim o ambiente do laboratório, proporcionando desta forma, um risco à saúde dos ocupantes.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste trabalho e na bibliografia consultada, conclui-se que:

1. Foi constatada a presença de *Aspergillus versicolor*, tanto nas peças anatômicas como no material de descarte;
2. A espécie encontrada mostrou-se resistente às concentrações de 2,5 a 15% de formaldeído, durante o período de 48 horas, enfatizando assim a necessidade da substituição da solução de formaldeído por outras soluções conservadoras que, se possível, sejam inócuas à saúde ou, ao menos, a ela ofereçam menor risco.
3. Face aos graus de risco para a saúde o *Aspergillus versicolor* oferece, apontados na bibliografia consultada torna-se imprescindível a adoção de medidas preventivas de proteção para os usuários dos laboratórios de anatomia.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBRIGHT, D. M. Human health effects of airborne mycotoxin exposure in fungi-contaminated indoor environments. **Park Ridge.**, v. 46, n. 11, p. 26-28, 2001.

ALTMAN, F. P. Tetrazolium salts and formazans. **Prog Histochem Cytochem**, v. 9, n. 3, p. 1-56, 1976.

ANDERSON, K. et al., Aspergillosis in immunocompromised paediatric patients: associations with building hygiene, design, and indoor air. **Thorax.**, v. 51, n. 3, p. 256-261, 1996.

ANDRÉ, G. A. et al., Isolamento e identificação dos patógenos microbiológicos encontrados em laboratório de anatomia humana. **Brazilian Journal of Morphological Sciences.**, v. 17, p. 63, 2000.

BOZZA, S. et al., Dendritic Cells Transport Conidia and Hyphae of *Aspergillus fumigatus* from the Airways to the Draining Lymph Nodes and Initiate Disparate Th Responses to the Fungus. **The Journal of Immunology.**, v.168, n. 3, p. 1362-1371, 2002.

BURGE, H. A. An update on pollen and fungal spore aerobiology. **Journal Allergy Clin Immunol.**, v. 110, n. 4, p. 544-52, 2002.

BURKE, P. A; SHEFFNER, A. L. The antimicrobial activity of embalming chemicals and topical disinfectants on the microbial flora of human remains. **Health Lab Sci.**, v. 13, n. 4, p. 267-270, 1976.

CALVO, A. M. et al., Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development. **Microbiology and Molecular Biology Reviews.**, v. 66, n. 3, p. 447-459, 2002.

CHIA, SE. et al., Medical students' exposure to formaldehyde in a gross anatomy dissection laboratory. **J Am Coll Health.**, v.41, n. 3, p. 115-119, 1992.

COCKRILL, B. A; HALES, C. A. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. **Annu. Med. Rev.**, v. 50, p. 303-316, 1999.

CUCCIA, V; GALARZA, M; MONGES, J. Cerebral Aspergillosis in Children Report of Three Cases. **Pediatric Neurosurgery.**, v. 33, n. 1, p. 43-48, 2000.

DAISEY, J. M; ANGELL, W. J; APTE, M. G. Indoor air quality, ventilation and health symptoms in schools: an analysis of existing information. **Indoor Air.**, v. 13, n. 1, p. 53-64. 2003.

DALES, R. E. et al., Respiratory health effects of home dampness and molds among Canadian children. **American Journal of Epidemiology.**, v. 134, n. 2, p. 196-203, 1991.

DALES, R. E. et al., Influence of Ambient Fungal Spores on Emergency Visits for Asthma to a Regional Children's Hospital. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 162, n. 6, p. 2087-2090, 2000.

DALLAS, C. E. et al., Cytogenetic analysis of pulmonary lavage and bone marrow cells of rats after repeated formaldehyde inhalation. **J Appl Toxicol.**, v. 12, n. 3, p. 199-203, 1992.

EDUARD, W. et al., Short term exposure to airborne microbial agents during farm work: exposure-response relations with eye and respiratory symptoms. **Occup Environ Med.**, v. 58, n. 2, p. 113-118, 2001.

ENGELHART, S. et al., Occurrence of Toxigenic *Aspergillus versicolor* Isolates and Sterigmatocystin in Carpet Dust from Damp Indoor Environments. **Applied and Environmental Microbiology.**, v.68, n. 8, p. 3886-3890, 2002.

ETZEL, R. A. et al. Acute pulmonary hemorrhage in infants associated with exposure to *Stachybotrys atra* and other fungi. **Arch Pediatr Adolesc Med.**, v.152, n. 8, p.757-762, 1998.

EZEONU, I. M. et al., Effects of extracts of fiberglass insulations on the growth of *Aspergillus fumigatus* and *A. versicolor*. **Mycopathologia.** v.132, n.2, p.65-69, 1995.

FADEL, R. et al., *Alternaria* spore and mycelium sensitivity in allergic patients: in vivo and in vitro studies. **Ann Allergy.**, v.69, n. 4 p. 329-335, 1992.

FISCHER, G.; DOTT, W. Relevance of airborne fungi and their secondary metabolites for environmental, occupational and indoor hygiene. **Arch Microbiol.**, v. 179, n. 2, p. 75-82, 2003.

FLORIAN, M. et al., The MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] Assay Is a Fast and Reliable Method for Colorimetric Determination of Fungal Cell Densities. **Applied and Environmental Microbiology.**, v. 65, n. 8, p. 3727-3729, 1999.

FRANKLIN, P; DINGLE, P; STICK, S. Raised Exhaled Nitric Oxide in Healthy Children Is Associated with Domestic Formaldehyde Levels. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 161, n. 5, p. 1757-1759, 2000.

FUJII, K, et al. Tumor induction by a single subcutaneous injection of sterigmatocystin in newborn mice. **Cancer Research.**, v. 36, n. 5, p. 1615-1618, 1976.

GALIMBERTI, R. et al., Cutaneous aspergillosis: a report of six cases. **Br J Dermatol.**, v. 139, n. 3, p. 522-526, 1998.

GÓRNY, L. R. et al., Fungal Fragments as Indoor Air Biocontaminants. **Applied and Environmental Microbiology.**, v.68, n.7, p.3522-3531, 2002.

GRAFSTROM, R. C. In vitro studies of aldehyde effects related to human respiratory carcinogenesis. **Mutat Res.**, v. 238, n. 3, p. 175-184, 1990

GUARRO, J; GENÉ, J; STCHIGEL, A. M. Developments in Fungal Taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews.**, v. 12, n. 3, p. 454-500, 1999.

HAVERINEN, U. et al., An approach to management of critical indoor air problems in school buildings. **Environ Health Perspect.**, v.107, n. 3, p, 509-514, 1999.

HENDRY, K. M.; COLE, E. C, A review of mycotoxins in indoor air., **Journal Toxicol Environ Health.**, v. 38, n. 2, p. 183-198, 1993.

HODGSON, M. J. et al., Building-associated pulmonary disease from exposure to *Stachybotrys chartarum* and *Aspergillus versicolor*. **Journal Occup Environ Med.**, v. 40, n. 3, p. 241-249, 1998.

HUSMAN, T. Health effects of indoor-air microorganisms. **Scand J Work Environ Health.**, v. 22, n. 1, p. 5-13, 1996.

ICPA Comissão Internacional em *Penicillium* e *Aspergillus*: disponível em:<
<http://www.cbs.knaw.nl/IPCA/icpahome.htm>>. Acesso em: 02/05/2003.

IKEDA, A. et al., Arterial embalming method of the cadaver and its application to research. **Kaibogaku Zasshi.**, v. 68, n. 4, p. 410-421, 1993.

JAKAB, G. J. et al., Respiratory aflatoxicosis: suppression of pulmonary and systemic host defenses in rats and mice. **Toxicol Appl Pharmacol.**, v. 125, n. 2, p. 198-205, 1994.

JARVIS ,J. Q; MOREY, P. R. Allergic respiratory disease and fungal remediation in a building in a subtropical climate. **Appl Occup Environ Hyg.**, v. 16, n. 3, p. 380-388, 2001.

JARVIS, B. B. et al., Study of Toxin Production by Isolates of *Stachybotrys chartarum* and *Memnoniella echinata* Isolated during a Study of Pulmonary Hemosiderosis in Infants. **Applied and Environmental Microbiology.**, v. 64, n. 10, p. 3620-3625, 1998.

JEDRYCHOWSKI, W; FLAK, E. Respiratory tract symptoms in school children exposed to indoor and outdoor air pollution. **Pneumonol Alergol Pol.**, v. 65, n. 1, p. 11-12, 1997.

JOHANNIING, E. et al., Health and immunology study following exposure to toxigenic fungi (*Stachybotrys chartarum*) in a water-damaged office environment. **Int Arch Occup Environ Saúde.**, v. 68, n. 4, p. 207-218, 1996.

JUSSILA, J. et al., Inflammatory responses in mice after intratracheal instillation of spores of *Streptomyces californicus* isolated from indoor air of a moldy building. **Toxicol Appl Pharmacol.**, v. 71, n. 1, p. 61-69, 2001.

JUSSILA, J. et al., Spores of *Aspergillus versicolor* Isolated from Indoor Air of a Moisture-Damaged Building Provoke Acute Inflammation in Mouse Lungs. **Inhal Toxicol.**, v.14, n. 12, p. 1261-1277, 2002.

JUSSILA, J. et al., Systemic Immunoresponses in Mice after Repeated Exposure of Lungs to Spores of *Streptomyces californicus*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.**, v. 10, n. 1, p. 30-37, 2003.

KEIL, C. B; AKBAR-KHABZADEH, F; KONECNY, K. A. Characterizing formaldehyde emission rates in a gross anatomy laboratory. **Appl Occup Environ Hyg.**, v. 16, n. 10, p. 967-972, 2001.

KERN, M. E; BLEVINS, K. S. **Micologia médica, texto e Atlas**. 2. ed. São Paulo: Edit. Premier, 1999. p. 35-55.

KHAN, Z. U. et al., *Aspergillus* and other moulds in the air of Kuwait. **Mycopathologia.**, v. 146, n. 1, p. 25-32, 1999.

KILPELAINEN, M. et al., Home dampness, current allergic diseases, and respiratory infections among young adults. **Thorax.**, v. 56, n. 6, p. 462-467, 2001.

KONEMAN, E. et al., **Diagnóstico microbiológico**. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. p. 996-1020.

KRZYZANOWSKI, M.; QUACKENBOSS, J. J; LEBOWIT, M. D. Chronic respiratory effects of indoor formaldehyde exposure. **Environ Res.**, v. 52, n. 2, p. 117-125, 1990.

LAFORREST, L. et al., Laryngeal and hypopharyngeal cancers and occupational exposure to formaldehyde and various dusts: a case-control study in France. **Occup Environ Med.**, v. 57, n. 11, p. 767-773, 2000.

LATGÉ, J. P. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. **Clinical Microbiology Reviews.**, v. 12, n. 2, p. 310-350, 1999.

LEPOM, P.; KLOSS, H. Production of sterigmatocystin by *Aspergillus versicolor* isolated from roughage. **Mycopathologia.**, v. 101, n. 1, p. 25-29, 1988.

LEVITZ, S. M; DIAMOND, R. D. A rapid colorimetric assay of fungal viability with the tetrazolium salt MTT. **J Infect Dis.**, v. 152, n. 5, p. 938-945, 1985.

MEKLIN, T. et al., Indoor air microbes and respiratory symptoms of children in moisture damaged and reference schools. **Indoor Air.**, v. 12, n. 3, p. 175-183, 2002.

MELETIADIS, J. et al., Comparison of NCCLS and 3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazyl)-2,5-Diphenyl-2H-Tetrazolium Bromide (MTT) Methods of In Vitro Susceptibility Testing of Filamentous Fungi and Development of a New Simplified. **Method Journal of Clinical Microbiology.**, v. 38, n. 8, p. 2949-2954, 2000.

MIGLIORE, L. et al., Micronuclei and nuclear anomalies induced in the gastrointestinal epithelium of rats treated with formaldehyde. **Mutagenesis.**, v. 4, n. 5, p. 327-334, 1989.

MIKAMI, Y. et al., Comparison of in vitro antifungal activity of itraconazole and hydroxy-itraconazole by colorimetric MTT assay. **Mycoses.**, v. 37, n. (1-2), p. 27-33, 1994.

MONTEIRO. C. R. et al., Allergic fungal sinusitis: an update. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.**, v. 68, n.5, p.736-742, 2002.

MORI, H. et al., Potential carcinogenicity of 5,6-dimethoxysterigmatocystin in rats. **Carcinogenesis.**, v. 9, p. 1039-1042, 1998.

MURTONIEMI, T. et al., Induction of cytotoxicity and production of inflammatory mediators in raw264.7 macrophages by spores grown on six different plasterboards. **Inhal Toxicol.**, v. 13, n. 3, p.233-247, 2001.

MURTONIEMI, T. et al., Effect of liner and core materials of plasterboard on microbial growth, spore-induced inflammatory responses, and cytotoxicity in macrophages. **Inhal Toxicol.**, v. 14, n. 11, p. 1087-1101, 2002.

NIEDOSZYTKO, M; CHELMINSKA, M; CHELMINSKI, K. Fungal allergy Part I. **Pol Merkuriusz Lek.**, v. 12, n. 69, p. 241-244, 2002.

NOVOTNY, W. E; DIXITP, A. Pulmonary hemorrhage in an infant following 2 weeks of fungal exposure. **Arch Pediatr Adolesc Méd.**, v. 154, n. 3, p. 271-275, 2000.

OLONITOLA, O. S. et al., Fungal spores in the homes of asthmatic patients in Zaria, Nigeria. **Ann Allergy.**, v. 73, n. 3, p. 273-274, 1994.

OTTO, D. et al., Neurobehavioral and sensory irritant effects of controlled exposure to a complex mixture of volatile organic compounds. **Neurotoxicol Teratol.**, v. 12, n. 6, 649-52, 1990.

PAANANEN, A. et al., Inhibition of Human NK Cell Function by Valinomycin, a Toxin from *Streptomyces griseus* in Indoor Air. **Infection and Immunity.**, v. 68, n. 1, p. 165-169, 2000.

PAGE, E. H; TROUT, D. B. The role of *stachybotrys* mycotoxins in building-related illness. **AIHAJ.**, v. 62, n. 5, p. 644-648, 2001.

PETRAITIENE, R. et al., Antifungal Efficacy of Caspofungin (MK-0991) in Experimental Pulmonary Aspergillosis in Persistently Neutropenic Rabbits: Pharmacokinetics, Drug Disposition, and Relationship to Galactomannan Antigenemia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.**, v. 46. n. 1, p. 12-23, 2002.

PIECKOVA, E.; KUNOVA, Z. Indoor fungi and their ciliostatic metabolites. **Ann Agric Environ Med**, v. 9, n.1, p. 59-63, 2002.

PITT, J. I. et al., Mycotoxins and toxigenic fungi. **Med Mycol.**, v. 38, n. 1, p. 41-46, 2000.

RAO, C. Y. et al., Reduction of Pulmonary Toxicity of *Stachybotrys chartarum* Spores by Methanol Extraction of Mycotoxins. **Applied and Environmental Microbiology.**, v. 66, n. 7, p. 2817-2821, 2000.

RANTIO, L. A; VIANDER, M. K.A. Airborne birch pollen antigens in different particle sizes. **Clin Exp Allergy.**, v. 24, n. 1, p. 23-28, 1994.

RAUTIALA, S. et al., Exposure to airborne microbes during the repair of moldy buildings. **Am Ind Hyg Assoc J.**, v. 57, n. 3, p. 279-284, 1996.

REIJULA, K.; TUOMI, T. Mycotoxins of aspergilli; exposure and health effects. **Front Biosci.**, v. 1, n. 8, p. 232-235, 2003.

ROBBINS, C. A. et al. Health effects of mycotoxins in indoor air: a critical review. **Appl Occup Environ Hyg.**, v. 15, n. 10, p. 773-784, 2000.

RODRIGUES, H. **Técnicas anatômicas**. 2. ed. Vitória: Arte visual. 1998, p. 53-90.

RODRIGUEZ, T. et al., *Aspergillus versicolor* as cause of onychomycosis: report of 12 cases and susceptibility testing to antifungal drugs. **J Eur Acad Dermatol Venereol.**, v. 11, n. 1, p. 25-31, 1998.

ROWAN, N. J. et al., Prediction of Toxigenic Fungal Growth in Buildings by Using a Novel Modelling System. **Applied and Environmental Microbiology.**, v. 65, n.11, p. 4814-4821, 1999.

SANTILLI, J.; ROCKWELL W. Fungal contamination of elementary schools: a new environmental hazard. **Ann Allergy Asthma Immunol.**, v. 90, n. 2, p. 203-208, 2003.

SAUDER, L. R. et al., Green DJ, Chatham MD, Kulle TJ. Acute pulmonary response of asthmatics to 3.0 ppm formaldehyde. **Toxicol Ind Health.**, v. 3, n. 4, p. 569-578. 1987.

SIVAKUMAR, V. et al., Lipid peroxidation as a possible secondary mechanism of sterigmatocystin toxicity. **Hum Exp Toxicol.**, v. 20, n. 8, p. 398-403, 2001.

SMEDJE, G.; NORBACK, D.; EDLING, C. Asthma among secondary schoolchildren in relation to the school environment. **Clin Exp Allergy.**, v. 27, n. 11, p. 1270-1278, 1997.

SMITH, J. E. et al., Cytotoxic fungal spores in the indoor atmosphere of the damp domestic environment. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 15, n. (1-3), p. 337-343, 1992.

SOLOMON, W. R. Assessing fungus prevalence in domestic interiors. **J Allergy Clin Immunol.**, v. 56, n.3, p. 235-242, 1975.

SOUBANI, A. O; CHANDRASEKAR, P. H. The Clinical Spectrum of Pulmonary Aspergillosis. **Chest.**, v. 121, p.1988-1999, 2002.

SPICHER, G.; PETERS, J. Microbial resistance to formaldehyde. I. Comparative quantitative studies in some selected species of vegetative bacteria, bacterial spores, fungi, bacteriophages and viruses. **Zentralbl Bakteriol.**, v. 163, n. 5-6, p. 486-508, 1976.

STAIB, F. Pathogenic fungi in human dwellings. **Mycoses.**, v. 35, n. 11-12, p. 289-292, 1992.

STENTELAIRE, C. et al., Development of a rapid and highly sensitive biochemical method for the measurement of fungal spore viability. An alternative to the CFU method. **Enzyme and Microbial Technology.**, v. 29, p. 560-566, 2001.

SUDAKIN, D.L. Toxigenic fungi in a water-damaged building: an intervention study. **Am J Ind Med.**, v. 34, n. 2, p. 183-190, 1998.

SUMI, Y. et al., Tumors and other lesions induced in germ-free rats exposed to *Aspergillus versicolor* alone. **Jpn J Cancer Res.** v. 78, n. 5, p. 480-486, 1987.

SUMI, Y. et al., Granulomatous lesions in the lung induced by inhalation of mold spores. **Virchows Arch.**, v. 424, n. 6, p. 661-668, 1994.

SURUDA, A. et al., Cytogenetic effects of formaldehyde exposure in students of mortuary science. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention.** v. 12, n. 5, p. 453-460, 1993.

TOMEE, J. F.; WERF, T. F. Pulmonary aspergillosis. **The Netherlands Journal of Medicine.**, v. 59, n. 5, p. 244-258, 2001.

TUOMI et al., Mycotoxins in Crude Building Materials from Water-Damaged Buildings. **Applied and Environmental Microbiology.** v. 66, n.5, p. 1899-1904, 2000.

UBA, G. et al., Prospective study of respiratory effects of formaldehyde among healthy and asthmatic medical students. **Am J Ind Med.**, v. 15, n. 1, p. 91-101, 1989.

VIANA, M. E. et al., An Extract of *Stachybotrys chartarum* Causes Allergic Asthma-like Responses in a BALB/c Mouse Model. **Toxicological Sciences.**, v.70, n. 1, p. 98-109, 2002.

VUJANOVIC, V. et al., Airborne fungal ecological niche determination as one of the possibilities for indirect mycotoxin risk assessment in indoor air. **Environ Toxicol.**, v. 16, n. 1, p. 1-8, 2001.

WU, L. Y. et al., Effect of tree and grass pollens and fungal spores on spring allergic rhinitis: a comparative study. **Ann Allergy Asthma Immunol.**, v. 83, n. 2, p. 137-143, 1999.

XIE, T.X. Sterigmatocystin induced adenocarcinoma of the lung and atypical hyperplasia of glandular stomach in mice. **Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.**, v. 12, n. 1, p. 21-23, 1990.

XIE, T. X. Effects of extract solution of *Aspergillus versicolor* on human fetal gastric cells in vitro. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi.** v.73, n.2, p.78-80, 1993.

ANEXO A: Prancha de identificação com os caracteres macroscópicos e microscópicos.

COLETA

Data: ____/____/____

Local: _____

CULTURA

Meio: _____

Temperatura: _____

MORFOLOGIA MACROSCÓPICA

Cor: _____

.....

Reverso: _____

.....

Topografia: _____

Textura: _____

Crescimento: _____

MORFOLOGIA MICROSCÓPICA

Hifas: _____

Célula Pé: _____

Conidióforos: _____

Vesículas: _____

Fiálides: _____

Conídios: _____