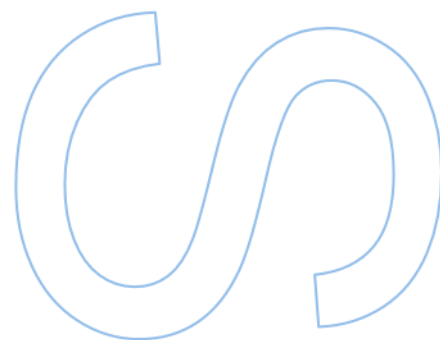
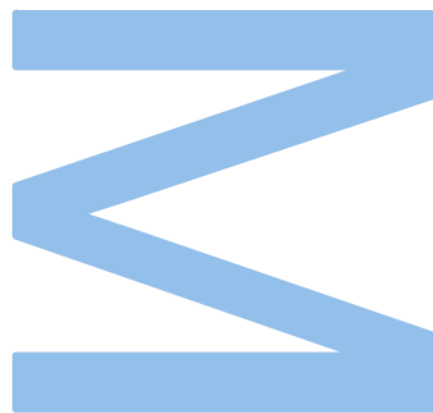


Implementação e validação de método de Pesquisa e Quantificação Total de Fungos em areias

Catarina Bessa

Mestrado em Biologia e Gestão da Qualidade da Água
Departamento de Biologia
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
2024



Implementação e validação de método de Pesquisa e Quantificação Total de Fungos em areias

Catarina Bessa

Relatório de Estágio realizado no âmbito do Mestrado em Biologia e Gestão da Qualidade da Água

Departamento de Biologia
2024

Orientador

Professora Ana Paula Mucha (Docente no Departamento de Biologia na FCUP e membro da Direção e Investigadora Principal da Equipa ECOBIOTEC do CIIMAR)

Supervisor externo na Entidade de Acolhimento

Engenheira Maria Adelaide Rocha (Responsável Técnica do laboratório das Águas e Energia do Porto)



Dedicatória

Agradeço, em primeiro lugar, á minha orientadora, Professora Ana Paula Mucha, a quem expresso o meu mais profundo agradecimento pela orientação, paciência e simpatia para comigo. A sua dedicação e conhecimento foram fundamentais para o sucesso deste trabalho. Um agradecimento especial também à Dra. Joana Fernandes, que me orientou no início do estágio, cuja ajuda foi imprescindível para começar com o pé direito.

Quero deixar o meu sincero agradecimento á Engenheira Adelaide, Doutora Carla Correia, Francisca Carvalho, Carlita Pereira, Engenheiro Augusto e Engenheira Cristina. Além de excelentes profissionais, são pessoas fantásticas que me acolheram e ensinaram com generosidade, tornando o ambiente de trabalho mais leve e acolhedor. Agradeço também a todos os colaboradores do laboratório, que me receberam de braços abertos todos os dias. Um agradecimento especial aos meus colegas e amigos Alexandre e Inês, que fizeram toda a diferença neste último, pelas risadas nos almoços e pela boa disposição diária. São amigos que certamente levarei comigo para a vida.

A todos os meus amigos, que estiveram ao meu lado desde o início desta jornada. A partilha de momentos de alegria e superação ao longo deste percurso foi essencial para a minha motivação e crescimento pessoal.

Á Mila e ao Zindo, quero agradecer por terem desempenhado um papel tão bonito na minha educação e formação como pessoa. São, sem dúvida, a minha segunda família, e esta conquista também se deve a vocês.

Á família do meu namorado, o meu agradecimento por todo o apoio que me deram, por acreditarem em mim e me ajudarem também a acreditar que este sonho seria possível.

E, por fim, um agradecimento especial aos meus pais, à minha irmã Telminha e ao Bernardo. Sempre estiveram ao meu lado, proporcionando-me tudo para que eu alcançasse este objetivo. Esta conquista é tanto vossa como minha, pois, sem o vosso amor, apoio incondicional e dedicação, nada disto teria sido possível. De coração, obrigada por acreditarem em mim e por serem a minha força em todos os momentos.

Resumo

A proteção da saúde pública em praias recreativas tem-se baseado na monitorização de microrganismos indicadores fecais em águas balneares, avaliando assim o nível de poluição fecal e, por consequência, o risco para os banhistas de exposição a microrganismos patogénicos fecais. Embora a legislação se tenha focado na água, o papel da areia costeira como um reservatório de poluentes e a presença de microrganismos na areia costeira tem vindo a fazer com que esta seja reconhecida como um potencial risco de fonte de contaminação para os banhistas.

O Programa Bandeira Azul, responsável pela certificação de praias, introduziu, por essa razão, novos critérios para o ano de 2024. Entre essas mudanças, destaca-se a obrigatoriedade de realizar análises das areias das praias. Um dos requisitos adicionados é a pesquisa mensal de fungos nas areias durante a época balnear, bem como uma análise adicional antes do início da temporada de praia, especificamente em maio. Estas medidas visam garantir a segurança e a qualidade das praias certificadas, demonstrando um compromisso renovado com a preservação ambiental e a saúde dos frequentadores. Esta abordagem mais abrangente representa um avanço significativo na gestão ambiental e sanitária das praias certificadas, considerando tanto a qualidade da água quanto a presença de microrganismos na areia. Por esta razão o laboratório da empresa Águas e Energia do Porto, já responsável pela análise da água balnear das praias da cidade do Porto, quis implementar e validar o método de pesquisa de fungos nas areias, sendo-lhes assim possível, fazer uma análise mais completa das praias.

A metodologia adotada para quantificação de fungos totais inclui a recolha de 3 amostras de areia de pontos equidistantes da praia, a lavagem desta e inoculação em placas de Malte agar em triplicado para o sobrenadante puro e para duas diluições (1/10 e 1/100), e por fim a incubação a 27,5 °C durante 5 dias e contagem das colónias. Adicionalmente, inoculou-se o sobrenadante puro em placas de Mycosel agar, para pesquisa de fungos patogénicos, as quais foram incubadas a 27,5 °C durante 21 dias.

Os dados obtidos demonstraram que o método se revela adequado ao uso pretendido, apresentando características de desempenho adequadas e enquadradas nas performances de desempenho de métodos microbiológicos com características similares. O limite de deteção do método demonstrou ser menor do que 30% do valor limite de 420 UFC/g dado pelo programa Bandeira Azul. Para dar mais consistência às conclusões refletidas no

presente estudo será necessário reforçar a parte experimental e recolha de mais dados para declarar o método válido e adequado a uso, com mais certeza estatística.

Com base na quantificação dos fungos totais e fungos patogénicos em 7 praias, recomenda-se que as 3 praias com maior incidência de fungos patogénicos, sejam alvo de monitorização mais frequente, especialmente durante os períodos de maior risco, como os meses de verão.

A comparação entre os resultados obtidos para fungos totais e fungos patogénicos demonstrou que nem sempre existe uma forte correlação entre estes dois parâmetros, pelo que se considera que seria relevante incluir a análise de fungos patogénicos em futuros programas de monitorização.

Palavras-Chave: Areia, praia, banhar, fungos totais, fungos patogénicos, implementação de método, validação de método

Abstract

The protection of public health at recreational beaches has been based on monitoring fecal indicator microorganisms in bathing waters, thus assessing the level of fecal pollution and, consequently, the risk to bathers of exposure to fecal pathogenic microorganisms. Although legislation has focused on water, the role of coastal sand as a reservoir of pollutants and the presence of microorganisms in coastal sand have led to its recognition as a potential risk of contamination for bathers.

The Blue Flag Program, responsible for beach certification, has introduced new criteria for 2024 for this reason. Among these changes, there is a notable requirement to conduct sand analyses at beaches. One of the new requirements is the monthly testing for fungi in the sand during the bathing season, as well as an additional analysis before the start of the beach season, specifically in May. These measures aim to ensure the safety and quality of certified beaches, demonstrating a renewed commitment to environmental preservation and the health of beachgoers. This more comprehensive approach represents a significant advancement in the environmental and sanitary management of certified beaches, considering both water quality and the presence of microorganisms in the sand.

For this reason, the laboratory of Águas e Energia do Porto, already responsible for the analysis of bathing water at Porto's beaches, sought to implement and validate a method for detecting fungi in the sand, allowing them to conduct a more complete analysis of the beaches.

The methodology adopted for quantifying total fungi includes taking 3 sand samples from equidistant points on the beach, washing them and inoculating them on Malt Agar plates in triplicate for the pure supernatant and for two dilutions (1/10 and 1/100), and finally incubating them at 27.5 °C for 5 days and counting the colonies. In addition, the pure supernatant was inoculated onto Mycosel agar plates to test for pathogenic fungi, which were incubated at 27.5 °C for 21 days.

The data obtained demonstrated that the method is suitable for its intended use, showing performance characteristics aligned with the performance of microbiological methods with similar features. The method's detection limit was shown to be less than 30% of the limit value of 420 CFU/g set by the Blue Flag program. To strengthen the conclusions reflected in the present study, it will be necessary to enhance the experimental part and collect more data to declare the method valid and suitable for use with greater statistical certainty.

Based on the quantification of total fungi and pathogenic fungi at 7 beaches, it is recommended that the 3 beaches with the highest incidence of pathogenic fungi undergo more frequent monitoring, especially during periods of higher risk, such as the summer months.

The comparison between the results obtained for total fungi and pathogenic fungi showed that there is not always a strong correlation between these two parameters, which is why it is considered relevant to include the analysis of pathogenic fungi in future monitoring programs.

Keywords: Sand, beach, recreational beaches, total fungi, pathogenic fungi, method implementation, method validation

Índice

Lista de Tabelas.....	viii
Lista de Figuras.....	ix
1 Introdução	1
1.1 Enquadramento e Objetivos.....	1
1.2 A Empresa	2
1.2.1 O laboratório.....	4
1.3 Tema do Estágio	7
1.4 Processo de Implementação e Validação de um método	9
1.4.1 Gama de trabalho.....	11
1.4.2 Incerteza	11
1.4.3 Exatidão (Veracidade e Precisão)	13
2 Os Fungos.....	18
2.1 Introdução	18
2.2 Diversidade e Evolução	18
2.3 Classificação e Taxonomia	20
2.4 Habitats e Condições de crescimento	22
2.5 Formas de vida e variedade.....	23
2.6 Ciclo de Vida dos Fungos.....	23
2.7 Crescimento e Reprodução Celular	25
2.8 Aplicações e Funções dos fungos	26
2.8.1 Funções Ecológicas e Ambientais.....	27
2.8.2 Contribuições Industriais e Farmacêuticas:	28
2.8.3 Pesquisas e Aplicações Biotecnológicas.....	29
2.8.4 Impactos Negativos.....	30
2.8.5 Filo <i>Ascomycota</i>	31
2.8.6 Filo <i>Basidiomycota</i>	32
2.8.7 Filo <i>Glomeromycota</i>	33
2.8.8 Filo <i>Blastocladiomycota</i>	33
2.8.9 Filo <i>Chytridiomycota</i>	34
2.8.10 Filo <i>Neocallimastigomycota</i>	34
2.9 Fungos filamentosos	35
2.10 Leveduras	37

2.11	Fungos Dermatófitos	39
2.12	Doenças relacionadas com os fungos.....	40
2.13	Existência de fungos em zonas balneares	43
3	Materiais e métodos	48
3.1	Materiais, equipamentos e meios.....	48
3.2	Descrição do método	50
3.3	Análise estatística.....	53
3.4	Controlo de Qualidade	53
4	Resultados e Discussão	56
4.1	Gama de trabalho	56
4.2	Incerteza.....	56
4.2.1	Incerteza de Medição (determinação Analítica + Colheita)	57
4.2.2	Incerteza Analítica.....	58
4.2.3	Incerteza da Contagem	60
4.3	Precisão.....	62
4.3.1	Repetibilidade	62
4.3.2	Critério de precisão	64
4.4	Veracidade.....	66
4.5	Controlo Interno	66
4.5.1	Produtividade, Seletividade, Esterilidade dos meios e Esterilidade da água	67
4.5.2	Controlo do ambiente e superfícies.....	69
4.5.3	Controlo da temperatura da estufa e do frigorífico.....	72
4.6	Quantificação de Fungos em areias de diferentes praias	73
5	Conclusões	84
6	Referências Bibliográficas.....	85
	Anexos.....	90
	Anexo 1.....	91
	Anexo 2.....	96

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Métodos de ensaio utilizados no departamento de Microbiologia do Laboratório da AEdP	7
Tabela 2 - Valores limite de fungos segundo o Programa Baneira Azul. (Adaptado do Programa da ABA) [120].	52
Tabela 3 - Tabela como calculo e resultado da produtividade do meio Malte Agar.....	67
Tabela 4 - Tabela com a seletividade, esterilidade e branco do meio Mycosel Agar.....	67
Tabela 5 - Tabela como calculo e resultado da produtividade do meio Mycosel Agar.....	68
Tabela 6 - Tabela com a seletividade, esterilidade e branco do meio Mycosel Agar.....	68
Tabela 7 - Resultados do controlo ambiental da sala dos fungos. Os números acompanhados de um “F” indicam as unidades formadoras de colónias (UFC) de fungos contadas na placa de gelose, enquanto os números sem letra correspondem às UFC de bactérias	70
Tabela 8 - Tabela com os resultados do controlo de superfícies das bancadas da sala de fungos. Os números apresentados são a contagens de UFC de bactérias em cada placa de gelose de contacto.....	71
Tabela 9 – Registo diário das temperaturas da estufa e do frigorífico/freezer.....	72
Tabela 10 - Resultados obtidos das análises micológicas (Fungos Totais e Fungos Patogénicos) em areias de diferentes praias (A-G), incluindo as amostras de duplicados de amostragem (DA), em diferentes dias.	74

Lista de Figuras

Figura 1- Organograma da Águas e Energia do Porto, 2024. Fonte: [3]	3
Figura 2 - Laboratório de análises das Águas de Energias do Porto	6
Figura 3 - Relação entre o resultado de uma medição, o valor verdadeiro e a incerteza associada. A incerteza representa a dispersão dos valores possíveis, enquanto o erro é a diferença entre o resultado medido e o valor verdadeiro.....	11
Figura 4 - Relação entre Exatidão, Veracidade e Precisão.....	14
Figura 5 - Representação gráfica da relação entre precisão e veracidade em medições, mostrando quatro cenários diferentes	15
Figura 6 - relações evolutivas entre fungos, animais, coanoflagelados e plantas com uma linha do tempo mostrando o surgimento dos opistocontes (fungos, animais e coanoflagelados) há aproximadamente 1 bilhão de anos. Acredita-se que os fungos tenham se desenvolvido como um novo reino de organismos entre 710 e 1.060 milhões de anos atrás. (Adaptado de <i>The Fungi</i> [23]).....	19
Figura 7 - Morfologia similar de células isoladas de um coanoflagelado e de um fungo quitrídio. (a) Coanoflagelado marinho, <i>Monosiga brevicollis</i> . (b) Zoósporos do quitrídio de água doce <i>Obelidium mucronatum</i> . Fonte: <i>The Fungi</i> (Watkinson et al., 2015).....	19
Figura 8 - Árvore filogenética das relações dentro do Reino Fungi (Adaptado do livro “ <i>The Fungi</i> ” [23])	21
Figura 9 - Morfologias celulares de agentes patogénicos fúngicos humanos dimórficos. As morfologias de crescimento dos Ascomycota dimórficos <i>Histoplasma capsulatum</i> (<i>Ajellomyces capsulatum</i>), <i>Blastomyces dermatitidis</i> (<i>Ajellomyces dermatitidis</i>), <i>Talaromyces marneffe</i> (<i>Penicillium marneffe</i>), <i>Coccidioides immitis</i> , <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> e <i>Sporothrix schenckii</i> (<i>Ophiostoma schenckii</i>). Fonte: <i>Fungal dimorphism: the switch from hyphae to yeast is a specialized morphogenetic adaptation allowing colonization of a host</i> [106].....	42
Figura 10 - Esquema das interações entre os banhistas, animais e o ambiente da praia, potencialmente levando à exposição de microrganismos patogénicos. Fonte: <i>Impacts of a changing earth on microbial dynamics and human health risks in the continuum between beach water and sand</i> [110].....	45
Figura 11 - Pontos de colheita na praia (auditoria da autora)	50
Figura 12 - Folha de calculo da incerteza de medição de acordo com a ISO 29201: 2012.....	57
Figura 13 - Folha de calculo da Incerteza analítica de acordo com a ISO 29201: 2012.....	59

Figura 14 - Folha de Excel com a contagem de cada Técnica Analista (CB, FC e CP), cálculo e resultado do valor da incerteza de contagem intralaboratorial.....	61
Figura 15 - Folha de Calculo da Repetibilidade do método de Detecção e Contagem de fungos totais em areia feita pela Técnica Analista CB (autora)	63
Figura 16 - Folha de Calculo da Repetibilidade do método de Detecção e Contagem de fungos totais em areia feita pela Técnica Analista FC	63
Figura 17 - Folha de cálculo do critério de precisão, a partir da Carta de Duplicados.....	65
Figura 18 - Quantificação (UFC/g) de fungos totais (barras azuis) e de fungos patogénicos (barras rosa) em cada praia (A, B, C, D, E, E e G).....	77
Figura 19 - Gráficos de regressão linear entre fungos totais (UFC/g) e fungos patogénicos (UFC/g) para as diferentes praias (A, B, C, D, E, F e G).	82

1 Introdução

1.1 Enquadramento e Objetivos

Este relatório reporta ao estágio curricular realizado entre outubro de 2023 e agosto de 2024, no âmbito da unidade curricular Projeto/Estágio do mestrado em Biologia e Gestão da Qualidade da Água da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto (FCUP), este teve lugar na empresa Águas e Energia do Porto (AEdP), mais precisamente na Área de Microbiologia, com a supervisão na empresa da Engenheira Adelaide Rocha (Coordenadora do laboratório das Águas e Energia do Porto), Dra. Carla Correia, Carlita Pereira, Francisca Carvalho, da orientadora na FCUP a Professora Ana Paula Mucha (Docente no Departamento de Biologia na FCUP e Investigadora Principal da Equipa ECOBIOTEC do CIIMAR) e da Dra. Joana Fernandes (investigadora da Equipa ECOBIOTEC do CIIMAR).

Os principais objetivos deste estágio incidiram na validação e implementação do método de ensaio de Pesquisa e Quantificação Total de Fungos em areias (Fungos filamentosos, Fungos leveduriformes e Dermatófitos) pelo método de sementeira por espalhamento baseado em Bernard, et. Al 1989, e auditoria interna ao método, pelo estudo da documentação, protocolos e metodologia necessária para a implementação, pela execução de amostras para a validação do método e pela elaboração do relatório de validação e a auditoria interna ao método. Para além disso, também possibilitou o trabalho de rotina em laboratório acreditado em contexto real e também a integração na equipa de trabalho.

Teve a duração de cerca de 11 meses, tendo iniciado no dia 9 de outubro de 2023 e terminado no dia 31 de agosto de 2024. O horário realizado compreendia 7 horas diárias, das 9 horas às 17 horas (1 hora de almoço), de segunda-feira a sexta-feira.

1.2 A Empresa

Com o intuito de melhorar a qualidade de vida dos portuenses e do ambiente da cidade do Porto, a 1 de abril de 1927 foram criados os Serviços Municipalizados de Água e Saneamento do Porto (SMAS do Porto), estes foram substituídos empresa Águas do Porto que foi constituída em outubro de 2006 por deliberação da Câmara Municipal do Porto [1]. Em novembro de 2020 a empresa ficou também responsável pela gestão da energia municipal, passando a designar-se Águas e Energia do Porto, E.M [2].

O seu objeto social é a gestão integrada e sustentável de todo o ciclo urbano da água no Município do Porto. A esta vertente juntou-se a definição e execução da estratégia energética municipal, após a alteração e republicação dos estatutos em novembro de 2020.

A empresa é responsável pela distribuição de água (sistema em baixa), drenagem e tratamento de águas residuais (sistemas em baixa e em alta), drenagem de águas pluviais, gestão das linhas de água (rios e ribeiras urbanas), gestão da frente marítima, gestão da energia e promoção da educação ambiental e da sustentabilidade.

É uma das maiores empresas portuguesas de abastecimento de água e de saneamento de águas residuais, servindo 160 476 clientes e um equivalente populacional de 500 000 habitantes. Todos os dias são fornecidos, em média, 45 130 m³ de água aos portuenses.

No que respeita ao saneamento, a Águas e Energia do Porto recolhe diariamente 57 754 m³ de águas residuais, que são conduzidas para duas ETAR (Freixo e Sobreiras) com tratamento terciário.

A Empresa é também responsável pela drenagem de águas pluviais, pela gestão de 85 km de linhas de água, pela gestão das águas balneares e da frente marítima da cidade e pela promoção da sustentabilidade e da educação ambiental através do Pavilhão da Água [2].

Em seguida é apresentado o organograma da empresa (Fig. 1) onde se pode visualizar o laboratório e a sua posição [3].

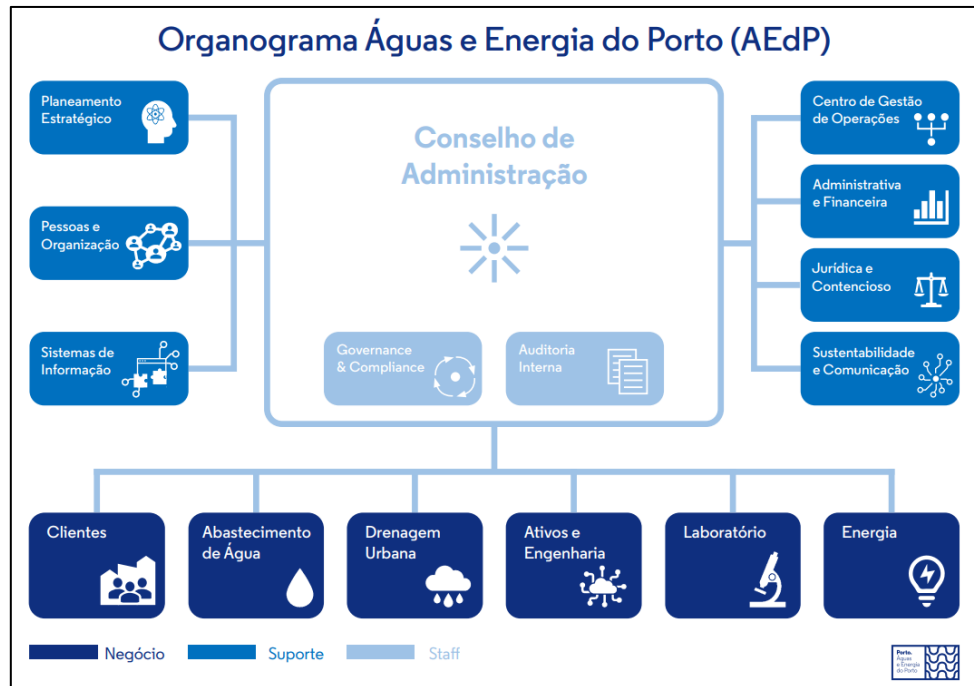


Figura 1- Organograma da Águas e Energia do Porto, 2024. Fonte: [3]

1.2.1 O laboratório

O controlo analítico da qualidade da água tanto dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos da água é assegurado pelo Laboratório de Análises (Figura 2) da empresa, que tem como principal objetivo o controlo da qualidade da água dos sistemas de abastecimento para consumo humano e dos sistemas de águas residuais. A par disso, também são realizadas análises e colheitas a águas balneares no âmbito do projeto Bandeira Azul e águas das ribeiras no âmbito da requalificação das Ribeiras do concelho do Porto.

Este encontra-se acreditado pelo Instituto Português de Acreditação (IPAC) desde 2004, de acordo com a norma NP EN ISO/IEC 17025, no entanto já era acreditado para um vasto conjunto de atividades (colheitas de amostras e métodos de ensaio) aplicadas a vários tipos de matrizes de água desde junho de 2000 pelo Instituto Português de Qualidade (IPQ). Em 2023 tinha um total de 107 procedimentos acreditados [4].

O estatuto de laboratório acreditado é assegurado através da implementação de sistemas de gestão e garantia da qualidade, sendo este auditado regularmente por equipas constituídas por avaliadores credenciados em contexto de auditorias internas e auditorias externas.

O Programa de Controlo de Qualidade da Água (PCQA) elaborado pelo laboratório é aprovado pela Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos (ERSAR) segundo o DEC-LEI Nº 69/2023. Além deste programa de controlo de qualidade de água, o laboratório elabora e cumpre um plano de controlo operacional, permitindo assim uma rigorosa avaliação da qualidade do produto distribuído, desde o ponto de entrega até à torneira do consumidor.

Além do cumprimento destes dois planos de controlo da qualidade da água de abastecimento para consumo, o laboratório dá apoio a consumidores e clientes, relativamente à análise de águas, colaborando sempre que solicitado com a Delegação de Saúde, a Agência Portuguesa do Ambiente e a ERSAR [5].

Para além disso, prima pela sua praticidade uma vez que apresenta diversos módulos que se complementam: calendarização de colheitas, amostras, introdução de resultados, validação e emissão de boletins. Para cumprimento dos requisitos do referencial normativo ISO 17025, o Laboratório tem implementado um programa de rastreabilidade de registos através do registo de todos os dados originais de ensaios/colheita e dados derivados, nomeadamente, quem faz, a que horas e quais as alterações introduzidas. No programa informático de gestão de amostras e de documentos associados são inseridos todo o tipo de amostras de água, todos os parâmetros existentes, quer no laboratório quer nos laboratórios contratados, os métodos de ensaio respetivos e a respetiva configuração (limite de

quantificação do método de ensaio (LQ), limites de deteção do método de ensaio (LD), casas decimais, incertezas, valores paramétricos existentes na legislação).

O laboratório consiste em quatro Áreas de trabalho distintas: Qualidade e Amostragem, Microbiologia e Biologia, Química Geral e Química Orgânica.

Todos os setores têm acesso a uma plataforma informática de gestão de amostras e documentos derivados (folhas de trabalho, boletins analíticos, entre outros) denominada LabWay-LIMS, que representa uma solução digital integrada para a organização e gestão da informação laboratorial.

Este software é considerado uma ferramenta essencial, uma vez que possibilita uma rápida consulta de dados, com funcionalidades de exportação que facilitam a manipulação de informações conforme as necessidades e a redução de eventuais erros de transcrição/transferência de dados, reduzindo a necessidade de transcrições através da importação direta de dados provenientes dos equipamentos. Este Software LABWAY-LIMS oferece ainda aos clientes a acessibilidade aos seus resultados e boletins por meio da plataforma AIWeb, realiza o controlo de equipamentos, a gestão de stocks e monitoriza a contratação de análises, entre outras capacidades do LabWay-LIMS. Destaca-se a praticidade deste sistema, que apresenta módulos complementares, como a calendarização de colheitas, amostragem, introdução de resultados, controlo da qualidade, validação e emissão de boletins. Todas as atividades ficam registadas, incluindo quem as efetua, o momento em que são realizadas e quaisquer alterações introduzidas. No programa são inseridos todos os tipos de amostras de água e areia, todos os parâmetros existentes, tanto no laboratório interno quanto nos laboratórios contratados, os métodos de ensaio correspondentes e as configurações específicas (limite de quantificação, limites de deteção, casas decimais, incertezas e valores paramétricos estabelecidos pela legislação vigente).

Para evitar erros de transcrição e gastos de papel o LabWay-LIMS é munido de um módulo denominado por Sampling, em que os técnicos de colheita inserem diretamente os resultados em campo e que automaticamente ficam disponíveis no software.

De uma forma geral, este software aumenta a eficiência no laboratório, reduz os registos em papel e respetiva transferência de dados e melhora a rastreabilidade das amostras.

Em 2023, o Laboratório da AEdP, foi responsável por efetuar 94293 análises, em todo o ciclo urbano da água, no cumprimento dos programas de controlo de qualidade de água e de apoio a clientes externos e internos, num total de 10589 amostras processadas. A água tem uma excelente qualidade, tanto a que chega à torneira dos consumidores (99,07 % de “Água Segura”) como a que é distribuída pela rede pública (99,72% de “Água Segura”) [2].



Figura 2 - Laboratório de análises das Águas de Energias do Porto

1.3 Tema do Estágio

O departamento de microbiologia tem vários métodos de ensaio e de colheita acreditados (Tabela 1) e está constantemente em melhoria, ao inovar os métodos utilizados e implementar novos métodos para novos parâmetros e novas colheitas.

Tabela 1 - Métodos de ensaio utilizados no departamento de Microbiologia do Laboratório da AEdP

Métodos de Ensaio	Acreditação
Enumeração de microrganismos viáveis - número de colónias a (22±2) °C – ISO 6222 (1999)	Sim
Enumeração de microorganismos viáveis – número de colónias a (36±2) °C– ISO 6222 (1999)	Sim
Quantificação de Bactérias coliformes – Meio Cromogénico- Membrana Filtrante - ISO 9308-1 -2014	Sim
Quantificação de Bactérias coliformes – Método substrato enzimático (NMP)- ISO 9308-2 (2012)	Sim
Quantificação de <i>Escherichia coli</i> – Meio Cromogénico- Membrana Filtrante - ISO 9308-1-2014	Sim
Quantificação de <i>Escherichia coli</i> – Método substrato enzimático (NMP)- ISO 9308-2 (2012)	Sim
Quantificação de <i>Escherichia coli</i> – Método Miniaturizado (NMP) - ISO 9308-3 (1998)	Sim
Quantificação de <i>Enterococos</i> – Método Miniaturizado - ISO 7899-1 (1998)	Sim
Pesquisa e Quantificação de <i>Enterococos</i> – Membrana Filtrante - ISO 7899-2 (2000)	Sim
Quantificação de <i>Clostridium perfringens</i> - Membrana Filtrante - ISO 14189 (2013)	Sim
Pesquisa e Quantificação de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> – Membrana Filtrante - ISO 16266 -2006	Sim
Pesquisa de <i>Salmonella spp</i> excepto <i>S. Tiphy</i> e <i>S.paratyphi</i> – Membrana Filtrante - PIB 7	Sim
Pesquisa e Quantificação de <i>Estafilococos</i> – Membrana Filtrante - NP 4343 (1998)	Sim
Pesquisa e Quantificação de <i>Estafilococos</i> produtores de coagulase - Membrana filtrante -NP 4343 (1998)	Sim
Quantificação de <i>Escherichia coli</i> - Método substrato enzimático (NMP) – PIB 22	Não
Quantificação de <i>Enterococos</i> - Método Miniaturizado (NMP) – PIB 21	Não

O laboratório segue também as diretrizes do Programa Bandeira Azul e os critérios deste de 2024 contêm o Critério 12 (Imperativo) - Motorização da Qualidade das Areias da Zona Balnear que engloba a pesquisa de fungos (fungos totais) e bactérias (*Enterococos* e *E. coli*), precisando assim de implementar e validar métodos de pesquisa de fungos totais, *Enterococos* e *E. coli* nas areias [6]

Deste modo, o estágio curricular que me foi proposto teve como principal objetivo a implementação e a validação de método de Pesquisa e Quantificação Total de Fungos em areias (Fungos filamentosos, Fungos leveduriformes e Dermatófitos).

No decorrer do estágio, foram realizadas atividades laboratoriais abrangendo não apenas a pesquisa de fungos, mas também a aquisição de conhecimentos em métodos relacionados a diferentes parâmetros de pesquisa, relevantes para a compreensão global do trabalho num laboratório Acreditado e com possibilidade de contacto com a realidade e rotina de um laboratório Acreditado, desde a Amostragem até à execução de diversos ensaios na área da Microbiologia e em outras áreas analíticas.

1.4 Processo de Implementação e Validação de um método

Nas últimas décadas, foi aumentando a exigência e desenvolvimento no controlo microbiológico da água para consumo, dos alimentos e também dos recursos recreativos que podem representar algum tipo de perigo para o ser humano. Como tal, existem laboratórios especializados em análises de água, alimentos e desses recursos, e esses têm de “dispor de meios e critérios objetivos, para demonstrarem, através da validação, que os métodos que executam, conduzem a resultados credíveis e adequados à qualidade pretendida” [7].

Num laboratório de microbiologia, a implementação e a validação/verificação de um método são processos distintos, apesar de interligados, cada um com os seus objetivos e procedimentos específicos. A implementação refere-se ao processo de introdução e utilização de um novo método ou técnica analítica no laboratório. Este processo envolve a escolha de um método adequado ao uso e às necessidades e objetivos do laboratório e pode envolver métodos descritos em literatura científica e desenvolvidos internamente, ou métodos descritos em protocolos e normas. Em seguida é necessário fazer a requisição e organização de todos os materiais necessário para prosseguir com a execução prática do método consoante um protocolo previamente escrito por um técnico do laboratório com os passos do método, por fim é essencial documentar todos os resultados obtidos para poder prosseguir com a validação/verificação do método de ensaio. A validação ou verificação de um método, refere-se ao processo de avaliação sistemática de um método para garantir a validade de um resultado. A validação / verificação assenta num estudo da performance e das características de desempenho de um dado método de ensaio com o objetivo de demonstrar a adequação ao uso para o fim ao qual se destina. Para este fim, genericamente e quando aplicável, estudam-se características de desempenho tais como, e entre outras: sensibilidade, especificidade/seletividade, exatidão (veracidade e precisão), limiar analíticos (limite de deteção e limite de quantificação), incerteza, robustez, gama de trabalho, linearidade. No caso específico do método de ensaio, objeto do presente documento, foi necessário realizar estudos das seguintes características de desempenho: Gama de trabalho, incerteza da contagem, analítica e de medição, precisão (repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial) e a veracidade [8].

Os métodos de ensaio podem ser “Métodos normalizados”, “Métodos internos equivalentes” ou “Métodos internos”. O primeiro, métodos normalizados, diz respeito ao método que segue estritamente a norma ou o documento normativo (NP, ISO, NF) e que cumpre com as características de desempenho da mesma. O segundo, método interno

equivalente, é aquele que tem a mesma área de aplicação (parâmetros e matrizes) de uma determinada norma e que cumpre com as características de desempenho, obtendo resultados comparáveis com a norma supracitada. Por último, o método interno, refere-se aos métodos que não estão compreendidos nas definições anteriores, referindo-se a métodos provenientes de adaptações de métodos normalizados ou de outros documentos de carácter científico ou métodos integralmente desenvolvidos pelo laboratório [9].

Quando se pretende implementar um método normalizado é feito um estudo de verificação dos parâmetros característicos de desempenho, tendo por base demonstrar que o método de ensaio cumpre com tais características de desempenho (quando existentes) do documento de referência seguido. Por outro lado, quando se está perante um método de ensaio interno equivalente a uma norma de ensaio ou referência bibliográfica tecnicamente reconhecida, também se procede a um estudo de verificação dos parâmetros característicos de desempenho, tendo por base demonstrar que o método de ensaio cumpre com tais características de desempenho (quando existentes) do documento de referência seguido. No caso de se optar por um método interno é desenvolvido um estudo de validação do método. Nos casos atrás referidos, o objetivo final é evidenciar, por meios de estudos de verificação/validação, que os resultados obtidos são credíveis face aos critérios de qualidade do Laboratório e adequados ao uso [7].

O trabalho desenvolvido ao longo deste estágio diz respeito à implementação e validação de um método Interno não normalizado, seguindo o guia relacre DRC005 (IPAC, 2019). O laboratório deve desenvolver no final um protocolo de validação do método, com o propósito de evidenciar que os métodos aplicados são adequados ao uso e que deve incluir uma descrição dos procedimentos, dados obtidos, análise dos resultados e respetivas conclusões sobre a adequação do método [7].

Como o método em questão é um método apenas de contagem total sem testes de confirmação, não se aplica a verificação de falsos negativos e falsos positivos, ou seja, não se faz o estudo da sensibilidade, da especificidade, da eficiência, da seletividade, da taxa de falsos positivos e da taxa de falsos negativos.

A validação foi realizada a partir do estudo da repetibilidade, cartas de duplicados e paralelos, cartas de incerteza, controlo dos meios, e participação num ensaio interlaboratorial.

1.4.1 Gama de trabalho

A gama de trabalho no contexto de métodos de análises microbiológicas refere-se ao intervalo de valores dentro do qual o método pode produzir resultados precisos e confiáveis. Especificamente, a gama de trabalho define o número mínimo (Limite inferior de quantificação ou LQ) e máximo (Limite superior de quantificação) de colônias que o método consegue fornecer resultados confiáveis e significativos [10]. É importante salientar que, de acordo com os requisitos legais estabelecidos no Decreto-Lei 69/2023, o valor do LQ não deve exceder 30% do valor paramétrico estabelecido por lei, ou do valor especificado ou máximo admissível [11].

1.4.2 Incerteza

A incerteza é um parâmetro associado ao resultado de uma medição que caracteriza a dispersão de valores que podem ser razoavelmente atribuídos à mensurada (valor medido) (Figura 3). No caso de incerteza expandida, é comum precedê-la do símbolo $\pm$ (Dúvida, estimativa) conforme a ISO 19036: 2019 [12].

Devido à natureza dos dados de contagem de organismos microbiológicos, que geralmente não seguem uma distribuição normal, esses resultados são, em muitos casos, logaritmizados (utilizando o logaritmo decimal ou logaritmo natural, conforme o caso) para permitir a aplicação de estatísticas normais e/ou robustas conforme na ISO 7218: 2007 [13].

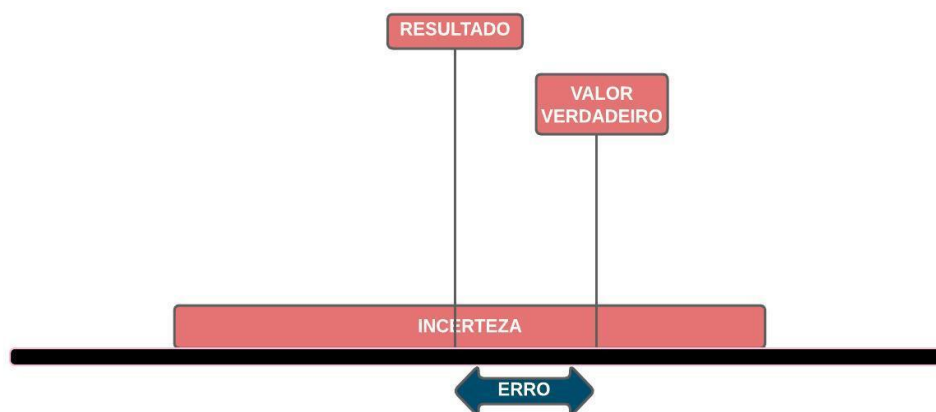


Figura 3 - Relação entre o resultado de uma medição, o valor verdadeiro e a incerteza associada. A incerteza representa a dispersão dos valores possíveis, enquanto o erro é a diferença entre o resultado medido e o valor verdadeiro.

O cálculo da incerteza para os métodos de ensaio poderá ser efetuado sobre 4 principais abordagens:

- Abordagem Modelar passo-a-passo, utilizando um modelo detalhado para cada fonte de incerteza;
- Abordagem Empírica baseada em dados de controlo da qualidade, baseada em dados históricos de controlo interno;
- Abordagem Empírica baseada em dados de ensaios inter-laboratoriais, avaliando variações entre laboratórios;
- Abordagem Empírica Global híbrida das duas anteriores que combina os dados de controle interno e os de ensaios interlaboratoriais.

O parâmetro Incerteza pode ser avaliado a partir de vários níveis: como a Incerteza da Contagem, Incerteza Analítica e a Incerteza de Medição. O estudo destas incertezas é essencial para garantir que os resultados microbiológicos sejam confiáveis e adequados ao contexto regulamentar e de qualidade exigido [12].

1.4.2.1 Incerteza de Contagem

De acordo com a norma internacional ISO 13843: 2017 [14], a incerteza da contagem exprime a dispersão de resultados de contagem e é estudada através da contagem repetida das colónias das mesmas placas num curto espaço de tempo. As observações sobre a incerteza da contagem darão a primeira impressão de potenciais problemas com a ampla utilização do método.

De acordo com a norma ISO 29201: 2012 [15], devem avaliar-se estimativas numéricas individuais ou coletivas da incerteza de contagem expressas como desvio-padrão relativo.

1.4.2.2 Incerteza Analítica

A incerteza analítica refere-se à incerteza associada especificamente ao processo analítico utilizado para obter um resultado. Esta inclui todas as variações e erros que podem ocorrer ao longo do procedimento, desde a preparação da amostra até a fase final de deteção e quantificação. Em microbiologia, por exemplo, a incerteza analítica envolve a

variabilidade que surge da contagem de colónias, da preparação do meio de cultura, da diluição de amostras, entre outros fatores [12].

Um aspeto importante da incerteza analítica é que ela está intrinsecamente ligada ao método analítico utilizado. Procedimentos complexos que envolvem múltiplas etapas podem ter uma incerteza analítica maior devido à acumulação de pequenas variações em cada fase do processo. Em microbiologia, métodos de contagem de colónias frequentemente apresentam maiores graus de incerteza analítica devido à distribuição não uniforme dos microrganismos nas amostras [16].

1.4.2.3 Incerteza de Medição

Em ambientes laboratoriais que seguem normas como a ISO/IEC 17025: 2017 [7], é obrigatório que os laboratórios forneçam uma estimativa da incerteza de medição para todos os métodos quantitativos que utilizam [17].

A incerteza de medição é um conceito mais amplo que engloba todas as possíveis fontes de incerteza no processo de medição. Em microbiologia, a incerteza de medição inclui, além da incerteza analítica, as variações provenientes do manuseio das amostras na fase de colheita, dos instrumentos utilizados para medir e contar os microrganismos, e das condições em que os testes são realizados [18].

1.4.3 Exatidão (Veracidade e Precisão)

De acordo com a norma ISO 5725: 1994 [19], a “Exatidão” de um método de medição depende tanto da “Veracidade”, que se refere à proximidade dos resultados com o valor verdadeiro, quanto da “Precisão”, que indica a consistência dos resultados (Figura 4). A “Veracidade” refere-se ao grau de concordância entre o valor médio de um grande número de resultados de ensaios e o valor de referência verdadeiro ou aceite. Por sua vez, a “Precisão” refere-se ao grau de concordância entre os resultados dos ensaios [19].



Figura 4 - Relação entre Exatidão, Veracidade e Precisão.

Segundo as normas ISO 3534-2, ISO 5725-1 e ISO/TS 13530, a “Veracidade” é normalmente expressa pelo termo “Bias” e vulgarmente designada por “Exatidão” quando aplicada a um resultado singular. O termo “Exatidão”, quando aplicado a uma série de resultados, envolve a combinação de componentes/erros aleatórios (Precisão) e sistemáticos (“Veracidade” normalmente expressa pelo termo “Bias”). Por vezes o termo “Veracidade” é usado como sendo a “Exatidão da média”, no entanto esta designação não é recomendável, assim o demonstra o esquema da Figura 5 abaixo apresentada, onde:

A) Verdadeiro e Preciso: Os dados estão concentrados e próximos do alvo, o que significa medições consistentes e corretas, logo são dados exatos.

B) Preciso, mas Não Verdadeiro: Os dados são consistentes, mas longe do valor real (não verdadeiros).

C) Verdadeiro, mas Impreciso: As medições estão próximas do valor real, mas espalhadas (baixa consistência).

D) Não Verdadeiro e Impreciso: As medições são inconsistentes e longe do valor real.

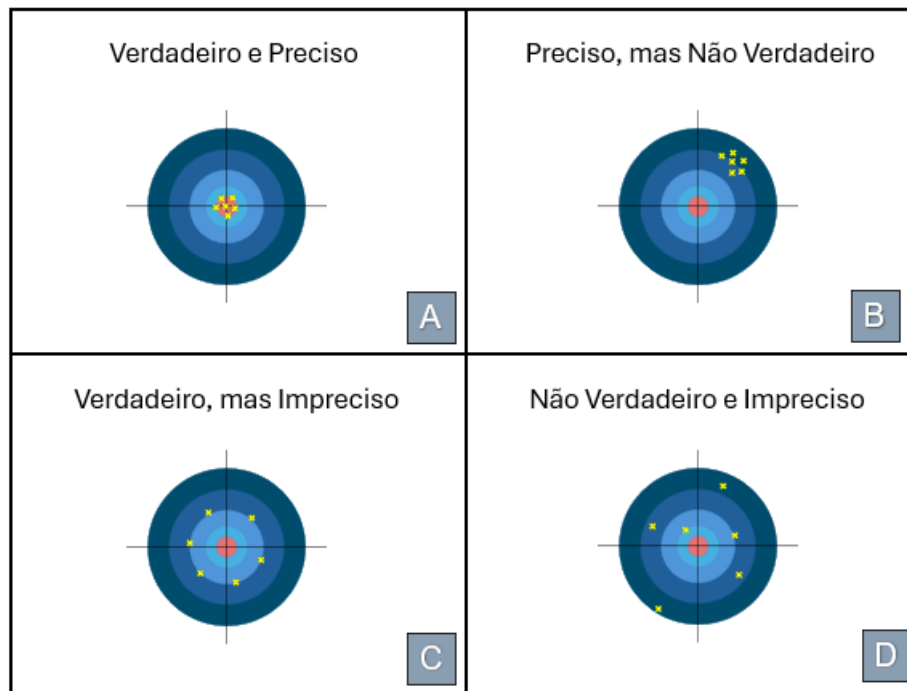


Figura 5 - Representação gráfica da relação entre precisão e veracidade em medições, mostrando quatro cenários diferentes

1.4.3.1 Veracidade

A veracidade é a diferença entre o valor obtido e o valor convencionalmente verdadeiro (Afastamento real, com sinal “+” ou com um sinal “-“). A veracidade é normalmente estudada a partir de um ensaio interlaboratorial [7].

1.4.3.2 Precisão

A precisão é um termo geral que pretende avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos sobre uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. Existem duas medidas extremas para avaliar a dispersão, designadas por repetibilidade e reprodutibilidade. Entre estas duas medidas extremas de precisão existe uma situação intermédia que se designa por precisão intermédia ou reprodutibilidade intralaboratorial [19].

A precisão intermédia ou reprodutibilidade intralaboratorial refere-se à precisão/Fidelidade avaliada, sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões,

utilizando o mesmo método, no laboratório ou em laboratórios diferentes, mas definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais), tais como: Diferentes analistas; Diferentes equipamentos; Diferentes épocas; entre outras. Esta medida de precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados num laboratório. Para determinar a precisão intermédia de um método, efetuam-se n medições em replicado, duplicado ou ensaio único, sobre a mesma amostra em condições pré-definidas [19].

A repetibilidade exprime a precisão dos resultados de um método de ensaio efetuados em condições idênticas, isto é, refere-se a ensaios sobre a mesma amostra, em condições tão estáveis quanto possível, como por exemplo: mesmo laboratório; mesmo técnico analista; mesmo equipamento e curtos intervalos de tempo [19] .

1.4.3.3 Precisão intermédia ou Reprodutibilidade intra-laboratorial

Segundo a ISO 5725-3: 1994, a precisão intermédia é supostamente uma medida intermédia de precisão entre a repetibilidade e reprodutibilidade [19]. O laboratório pode determinar e controlar a precisão intermédia por uso de amostras padrões de controlo, em rotina, fazendo variar uma ou mais condições operatórias, conforme previsto na ISO 5725-3: 1994 [19]. Normalmente este parâmetro de validação é determinado e controlado ao longo do tempo por uso de cartas de controlo ou cartas de aceitação.

O desvio padrão encontrado multiplicado por 2, isto é, para um nível de confiança de aproximadamente 95% de confiança, poderá dar informação acerca da apresentação dos resultados de ensaio. Esta informação deverá posteriormente ser complementada com a incerteza do método de ensaio [19].

1.4.3.4 Repetibilidade

Poderão também ser efetuados estudos de precisão em condição de repetibilidade, (curto espaço de tempo, pelo mesmo analista, mesmo equipamento, mesmas condições operatórias, entre outras).

Segundo a serie de normas ISO 5725: 1994 [19], a determinação da repetibilidade deve ser estudada por técnico analista. Na ISO 5725-6: 1994 [19] permite estimar e controlar a repetibilidade com base em dados de réplicas de amostras reais, recolhidos em rotina (cada réplica em condições de repetibilidade).

A repetibilidade pode, entre outras, ser determinada mediante um teste sobre uma amostra real, repetidamente 10 vezes (habitualmente e sempre que exequível no mínimo 3 vezes), ensaiadas em condições de repetibilidade (mesmo analista, mesmo equipamento, curtos espaços de tempo, etc..) e depois determinar o desvio padrão de repetibilidade, segundo a ISO 5725-2: 1994 [19].

A determinação da repetibilidade por técnico analista, poderá ser efetuada na fase de validação do método de ensaio, para comprovar o desempenho do método de ensaio nas condições reais de ensaio, por comparação dos valores de repetibilidade obtidos pelo laboratório com os referidos nas normas de ensaio em que são especificados estes valores. Depois, podem ser aproveitados esses dados de repetibilidade e serem usados como critérios de aceitação de replicados de amostras, segundo o exposto na norma ISO 5725-6: 1994 [19].

2 Os Fungos

2.1 Introdução

Os fungos são organismos eucariontes, heterotróficos, podendo ser unicelulares (leveduras) ou formados por um sistema de filamentos ramificados denominados por hifas (fungos filamentosos e cogumelos), e são predominantemente aeróbios [20]. Caracterizam-se pela ausência de clorofila e dependem de nutrientes exógenos obtidos por absorção, por isso, produzem e excretam enzimas que decompõem moléculas complexas dos substratos em moléculas mais simples e solúveis em água, estas são então absorvidas para o interior do soma (conteúdo intracelular das hifas) através da parede celular e da membrana citoplasmática. A parede celular dos fungos é composta principalmente por quitina, glucanas, galactomananas e proteínas, com a quantidade variando entre espécies e o principal esteroide das suas membranas é o ergosterol [21].

2.2 Diversidade e Evolução

Os fungos originaram-se como um grupo distinto de eucariontes unicelulares no Pré-câmbrico. Estimativas recentes da origem do reino Fungi baseadas em análises moleculares apontam que a origem deste reino esteja inserida no intervalo de 760 milhões de anos atrás a 1,06 bilhão de anos atrás (Figura 6) e que existam quase 4 milhões de espécies de fungos o que torna este reino o mais diverso do domínio Eukarya [22].

Os fósseis mais antigos ambíguos de fungos datam do Devónico Inferior (400 milhões de anos). Esporos e arbúsculos de *Glomeromycota* encontrados nas raízes de fósseis de plantas, com 460 milhões de anos, fornecem evidências de simbioses essenciais para a evolução das plantas terrestres. Os fósseis mais antigos encontrados e identificados de hifas de *Basidiomycota* têm 330 milhões de anos, no entanto, é provável que este filo tenha surgido muito antes. A origem antiga dos filos predominantes de fungos resulta em incertezas sobre o momento exato do desenvolvimento das espécies ancestrais. Baseado na simplicidade dos quitrídios, espécies de fungos que pertencem ao filo *Chytridiomycota*, e na ausência de flagelos em outros fungos, infere-se que os primeiros fungos eram simples e unicelulares, movendo-se na água por um flagelo posterior. Este flagelo posterior é comum a fungos e

animais, situando ambos no supergrupo de eucariontes denominado *Opisthokonta*, fornecendo evidências de ancestralidade comum (Figura 7) [23].

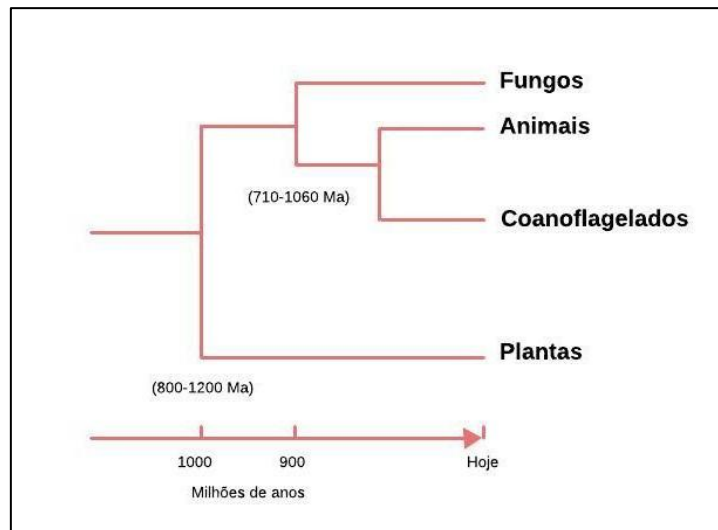


Figura 6 - Relações evolutivas entre fungos, animais, coanoflagelados e plantas com uma linha do tempo mostrando o surgimento dos opistocontes (fungos, animais e coanoflagelados) há aproximadamente 1 bilhão de anos. Acredita-se que os fungos tenham se desenvolvido como um novo reino de organismos entre 710 e 1.060 milhões de anos atrás. (Adaptado de *The Fungi* [23])

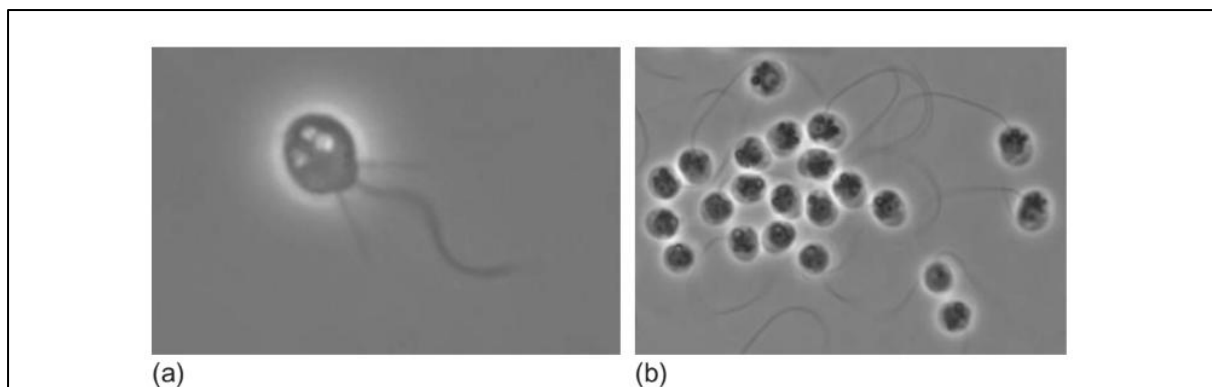


Figura 7 - Morfologia similar de células isoladas de um coanoflagelado e de um fungo quitrídio. (a) Coanoflagelado marinho, *Monosiga brevicollis*. (b) Zoósporos do quitrídio de água doce *Obelidium mucronatum*. Fonte: *The Fungi* (Watkinson et al., 2015)

2.3 Classificação e Taxonomia

Inicialmente, os pioneiros da micologia organizaram os fungos em grupos com características comuns, e esta abordagem morfológica foi bem-sucedida em esculpir os filos *Ascomycota* e *Basidiomycota* e identificação de subgrupos de gêneros intimamente relacionados. Em alguns casos, esses esquemas pré-darwinianos refletiam o parentesco evolutivo porque algumas semelhanças estruturais amplas entre os fungos refletem o parentesco. Em muitos casos, porém, estas primeiras investigações agruparam organismos não relacionados em grupos definidos por características partilhadas, como a cor dos esporos, que não tinham significado evolutivo.

Até meados do século XX, os fungos eram classificados no Reino *Plantae*, subdivisão *Thallophyta*. Em 1969, Whittaker propôs a criação do Reino Fungi, distinguindo-os de outros reinos (*Animalia*, *Plantae*, *Monera* e *Protista*). Em 1990, com base em análises de rRNA, foi proposto um sistema de classificação em três domínios: *Eucarya*, *Bacteria* e *Archae* [24], estabelecendo a ancestralidade comum para todos os seres vivos e o ser vivo *Codosiga gracilis*, um coanoflagelado, foi considerado o ancestral dos fungos e dos animais [21].

A taxonomia dos fungos evoluiu significativamente com os avanços em microscopia, bioquímica e técnicas de genética molecular, como a reação em cadeia da polimerase nos anos 1980. Muitos grupos tradicionais foram reorganizados e renomeados, e até hoje, a atribuição de espécies permanece em constante mudança.

Atualmente, os fungos pertencem ao Domínio *Eucarya*, estando mais próximos dos animais do que das plantas, compartilhando um ancestral comum.

São atualmente reconhecidos seis filos no Reino Fungi (*Basidiomycota*, *Ascomycota*, *Glomeromycota*, *Blastocladiomycota*, *Chytridiomycota* e *Neocallimastigomycota*) e um sétimo filo que foi proposto, o *Cryptomycota*, que contém o gênero de fungos aquáticos, o *Rozella* que não se encaixa geneticamente nos filos existentes (Figura 8) [23]

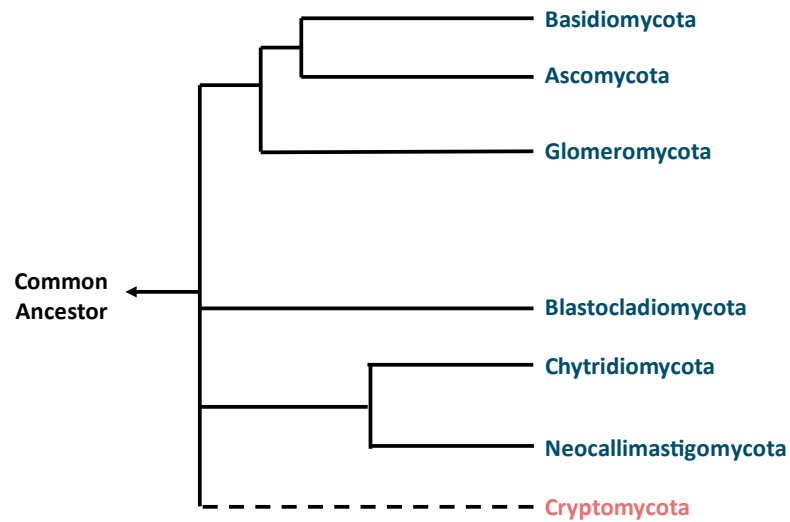


Figura 8 - Árvore filogenética das relações dentro do Reino Fungi (Adaptado do livro “The Fungi” [23])

Esta abordagem moderna reflete melhor o parentesco evolutivo entre os diferentes grupos de fungos, contribuindo para uma classificação mais precisa e baseada em evidências moleculares [23].

2.4 Habitats e Condições de crescimento

Os fungos demonstram uma notável capacidade de adaptação, permitindo-lhes habitar uma vasta gama de ambientes, que vão desde terras secas até ecossistemas marinhos e água doce, além de estarem presentes na atmosfera. A sua distribuição é global, abrangendo desde regiões temperadas até zonas polares, evidenciando uma extraordinária capacidade de adaptação a diferentes condições climáticas e geográficas [25]. Alguns fungos estão especialmente adaptados a temperaturas extremas. Os fungos psicrófilos prosperam em condições de baixas temperaturas, enquanto os fungos termófilos podem crescer a temperaturas superiores a 40°C [26].

Apesar dessa diversidade, a maioria dos fungos prefere condições quentes, com presença de açúcares, em ambientes ácidos e aeróbicos, com uma temperatura ideal geralmente em torno de 25°C. A água é crucial para o metabolismo dos fungos, sendo que a maioria requer uma elevada atividade de água (a_w) para o seu crescimento, com um mínimo aproximado de 0,65. Muitos fungos são acidófilos e prosperam em pH entre 4 e 6, embora algumas espécies possam tolerar condições mais ácidas ou alcalinas [27].

Além das condições ideais, outros fatores também influenciam o crescimento dos fungos, como a disponibilidade de nutrientes, a presença de solutos (como sal ou açúcar, que podem provocar estresse osmótico) e a radiação (incluindo luz e UV). Os fungos têm a capacidade de enfrentar diversos tipos de stresse ao ajustar o seu metabolismo e adaptar as suas membranas celulares para se manterem viáveis em condições ambientais variáveis [27].

2.5 Formas de vida e variedade

A diversidade dos fungos não se limita aos seus ambientes, mas também às suas variadas formas, ciclos de vida distintos e modos de vida. Estes organismos apresentam uma impressionante variedade de características e estruturas, adaptando-se de maneira única às exigências dos seus habitats [28].

Os corpos vegetativos dos fungos são compostos por filamentos microscópicos que interagem diretamente com o meio ambiente à escala do micrómetro (μm) [28].

Os esporos fúngicos, frequentemente na escala dos micrómetros, são produzidos em grande número e dispersam-se a longas distâncias [25].

A grande variedade de tipos de esporos (unidades reprodutivas) entre os fungos reflete a sua surpreendente diversidade evolutiva. Além disso, os diferentes mecanismos de dispersão dos esporos são indicativos do sucesso do grupo ao longo do tempo. Os esporos podem ser transportados a distâncias significativas por pressão hidrostática, correntes de ar (incluindo correntes geradas pelo próprio fungo), vibrações no solo, gotas de chuva e animais [29].

2.6 Ciclo de Vida dos Fungos

O ciclo de vida da maioria dos fungos é composto por duas fases principais de reprodução: a sexuada, com produção de meiosporos, e a assexuada, com produção de mitósporos. Esta flexibilidade reprodutiva permite que eles se ajustem eficientemente às condições ambientais, garantindo a sua sobrevivência e propagação numa grande variedade de ambientes [30].

Geralmente, uma geração sexuada é seguida por uma geração assexuada, cada uma podendo propagar-se independentemente e exibindo diferentes morfologias (pleomorfismo) [28] [31].

A maioria dos fungos reproduz-se assexuadamente, um processo que ocorre principalmente através da produção de esporos. Estes esporos, conhecidos como mitósporos, são células haploides geradas por mitose a partir de uma célula-mãe também haploide, resultando em esporos geneticamente idênticos à célula que os originou. A reprodução assexuada permite uma rápida colonização do ambiente, especialmente em

condições estáveis, onde a diversidade genética não é essencial. Os esporos assexuados podem ser dispersos por diferentes meios, como vento, água ou vetores biológicos. Alguns fungos possuem mecanismos especializados, como "canhões" que lançam os esporos a grandes distâncias, garantindo que as novas gerações não competirão diretamente com a geração parental por recursos. Um exemplo notável são os puffballs, que libertam esporos como numa nuvem quando são perturbados, aumentando as chances de encontrar um ambiente propício para a germinação. Além dos esporos, alguns fungos, como as leveduras, reproduzem-se assexuadamente por brotamento. Neste processo, a célula-filha forma-se a partir da célula-mãe, sendo geneticamente idêntica a esta. O brotamento é um método eficiente de reprodução em ambientes onde a rapidez da multiplicação é crucial para a sobrevivência. Embora a reprodução assexuada seja mais comum, a reprodução sexuada também desempenha um papel vital na vida dos fungos, e pode ocorrer em quase todas as espécies. Este processo começa com a fusão de duas hifas haploides de diferentes tipos de compatibilidade sexual. A reprodução sexuada envolve três fases principais: a plasmogamia, que consiste na fusão do citoplasma das células parentais haploides, resultando na formação de uma célula dicariótica, onde dois núcleos haploides coexistem, a cariogamia, onde os núcleos haploides se fundem para formar um núcleo diploide, criando assim diversidade genética crucial para a adaptação às mudanças ambientais e por último a meiose, onde o núcleo diploide sofre meiose, gerando esporos haploides geneticamente variados. Estes esporos, chamados meiosporos, são disseminados e, ao encontrarem condições adequadas, germinam, desenvolvendo-se num novo micélio haploide [30]. Este ciclo de vida, que alterna entre fases sexuadas e assexuadas, proporciona aos fungos uma combinação de estabilidade e variabilidade genética [28]. A fase assexuada permite a rápida colonização do ambiente, enquanto que a fase sexuada aumenta a variação genética, aumentando as chances de sobrevivência em condições adversas [30].

2.7 Crescimento e Reprodução Celular

O crescimento fúngico envolve o transporte e a assimilação de nutrientes, integrando-os nos componentes celulares, o que faz com que a biomassa aumente e ocorra a divisão celular (como nas leveduras) ou septação (como nos fungos superiores) [23] [32]. É de salientar que o brotamento e a fissão binária, apesar de serem formas de reprodução assexuada, também estão relacionadas ao crescimento dos organismos fúngicos, especialmente em leveduras [27].

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é considerada uma levedura de brotamento, devido ao seu modo específico de reprodução assexuada, onde novas células-filhas se formam a partir de uma célula-mãe por um processo conhecido como brotamento. A reprodução por brotamento começa quando a célula-mãe atinge um tamanho crítico e inicia a formação de um pequeno broto na sua superfície. O broto cresce à medida que a célula-mãe replica o seu DNA e direciona parte do seu citoplasma para o broto em crescimento. Este processo envolve a deposição de novos componentes da parede celular, principalmente glucano e quitina, na região do broto [32]. Este forma a sua própria parede celular, separada da parede celular da célula-mãe, mas ainda conectada a esta. Quando atinge um tamanho adequado, o núcleo da célula-mãe divide-se por mitose, e um dos núcleos resultantes é transportado para o broto [27]. Após a conclusão da divisão celular, o broto desenvolve-se completamente numa nova célula-filha. Em algumas condições, a célula-filha pode separar-se da célula-mãe, enquanto que noutras, pode permanecer ligada a esta, formando uma cadeia de células [27].

Já a levedura *Schizosaccharomyces pombe* é classificada como uma levedura de fissão devido ao seu modo específico de reprodução assexuada, onde as células se dividem simetricamente por um processo conhecido como fissão binária [32]. Antes da divisão, a célula de *S. pombe* cresce em comprimento até atingir um tamanho adequado para a divisão. Durante este período, a célula replica o seu DNA e prepara-se para a mitose. Após a replicação do DNA, a célula inicia a formação de um septo (uma parede celular interna) no centro da célula. Este septo divide a célula-mãe em duas partes iguais. O septo continua a crescer a partir das paredes celulares internas, eventualmente separando completamente as duas novas células-filhas [27]. Este processo é conhecido como clivagem transversal ou fissão binária, resultando na produção de duas células-filhas de tamanho aproximadamente igual. Após a formação completa do septo, as duas novas células-filhas separam-se, cada uma com o seu próprio conjunto completo de organelos e DNA [32].

Diferente do brotamento, onde a célula-filha é menor que a célula-mãe, na fissão binária as células-filhas têm aproximadamente o mesmo tamanho que a célula-mãe [27].

A septação em fungos é principalmente um mecanismo de crescimento, mas também tem implicações importantes para a reprodução e a sobrevivência do organismo. Os septos auxiliam no controlo do crescimento das hifas, permitindo uma ramificação e expansão mais eficaz do micélio, pois cada compartimento pode crescer e dividir-se independentemente [32]. A septação permite a divisão do micélio em unidades menores que se podem tornar organismos independentes [27]. Isso é especialmente relevante em condições adversas, onde a fragmentação do micélio pode resultar em novas colónias.

A septação em hifas fúngicas começa com a formação de um septo inicial, composto por uma nova parede celular interna [32]. Este septo primário cresce, e expande-se até dividir a hifa em dois compartimentos distintos. Durante este processo, materiais como quitina e glucano são depositados para reforçar a nova estrutura. A septação é finalizada quando a hifa é completamente dividida, resultando em 2 compartimentos separados, cada um com organelos e, em alguns casos, núcleos próprios [27].

Nos fungos filamentosos, como o *Aspergillus nidulans*, a septação é um processo altamente desenvolvido e vital para a estrutura e funcionamento do micélio [32]. O ciclo de duplicação nuclear, que envolve a replicação e segregação dos núcleos, é um exemplo de como a septação está intimamente ligada ao crescimento e divisão celular dos fungos. Nos *Aspergillus nidulans*, os compartimentos apicais contêm aproximadamente 50 núcleos por compartimento. O ciclo de vida dos fungos, com as suas fases de reprodução assexuada e sexuada, permite uma adaptação eficiente a diversas condições ambientais [27].

2.8 Aplicações e Funções dos fungos

Os fungos desempenham um papel de extrema importância em todos os ecossistemas e contribuem significativamente para a biodiversidade e biomassa, tendo funções fundamentais como: a decomposição de matéria orgânica, a simbiose com plantas e animais, e até mesmo a contribuição para a saúde humana e animal [33].

2.8.1 Funções Ecológicas e Ambientais

2.8.1.1 *Decomposição de Matéria Orgânica:*

A maioria dos fungos são saprófitos, desempenhando um papel crucial na decomposição de matéria orgânica [21]. Os *Basidiomycota*, em particular, são altamente eficazes na degradação da lignina, um componente estrutural das plantas, enquanto os *Ascomycota* são os principais responsáveis pela degradação dos polissacarídeos da parede celular vegetal (celulose e hemicelulose, pectinas) [34] [35] [36].

Ganoderma lucidum é um *Basidiomycota* que desempenha um papel essencial na decomposição de lignina, um componente duro da madeira e dos resíduos vegetais. A degradação da lignina por *Ganoderma lucidum* contribui para a reciclagem de nutrientes e a formação de solo fértil, já a espécie *Aspergillus niger*, é um *Ascomycota* responsável pela decomposição de polissacarídeos vegetais, como celulose e hemicelulose, esta espécie é utilizada na indústria para a produção de ácidos orgânicos e enzimas, e também atua na reciclagem de nutrientes no solo [37].

2.8.1.2 *Associações Simbióticas:*

Os fungos estabelecem relações simbióticas com outros organismos, como no caso das micorrizas, que formam associações mutualistas com as raízes das plantas para melhorar a absorção de nutrientes [21] [38]. Além disso, os líquenes, que são associações entre fungos e organismos fotossintéticos (algas ou cianobactérias), desempenham um papel pioneiro na colonização de superfícies rochosas e na formação do solo, especialmente em ecossistemas extremos como desertos e tundras [39]. O fungo *Glomus spp.* forma associações mutualistas com as raízes das plantas, conhecidas como micorrizas arbusculares, aumentando assim a capacidade da planta de absorver nutrientes, como fósforo e nitrogênio. Em troca, o fungo recebe hidratos de carbono (açúcares) produzidos pela planta através da fotossíntese. Esta simbiose é crucial para a saúde das plantas e a produtividade agrícola [40].

2.8.1.3 *Desintoxicação de Poluentes:*

Os fungos são agentes importantes na desintoxicação de poluentes orgânicos e na biorremediação de metais pesados e produtos químicos persistentes em ambientes contaminados, como águas residuais e subterrâneas. Este papel é vital para a manutenção da qualidade ambiental e a proteção dos recursos hídricos [27]. A espécie *Phanerochaete chrysosporium*, pertencente ao filo *Basidiomycota* é conhecida pela sua capacidade de

degradar poluentes orgânicos complexos, como hidrocarbonetos encontrados em derramamentos de petróleo, este fungo produz enzimas como a lignina peroxidase que têm a capacidade de partir essas moléculas tóxicas, ajudando assim, na recuperação de áreas contaminadas e na purificação ambiental [41].

2.8.2 Contribuições Industriais e Farmacêuticas:

2.8.2.1 Produção de Produtos Industriais:

O metabolismo dos fungos é explorado na produção de uma vasta gama de produtos industriais. Estes incluem alimentos e bebidas fermentadas, aditivos alimentares, antibióticos, probióticos, pigmentos, produtos farmacêuticos, biocombustíveis, enzimas, vitaminas, ácidos orgânicos e esteróis. A utilização de fungos para a produção desses produtos é um pilar significativo da indústria biotecnológica e farmacêutica [27]. É um bom exemplo o fungo *Saccharomyces cerevisiae*, conhecida como a levedura de padeiro, que é utilizada na fermentação de pães e bebidas alcoólicas, como cerveja e vinho, esta produz enzimas que partem as moléculas dos açúcares e transforma-as em dióxido de carbono e etanol [42].

2.8.2.2 Medicação e Terapias:

A descoberta da penicilina em 1928 por Alexander Fleming [43], derivada do *Penicillium chrysogenum*, marcou um avanço significativo na medicina, inaugurando a era dos antibióticos. Outros exemplos deste tipo de fármacos incluem as cefalosporinas, provenientes do fungo *Cephalosporium acremonium*, e a griseofulvina, usada contra infecções fúngicas [44]. Além dos antibióticos, existem outros fungos que produzem outros compostos com aplicações terapêuticas variadas. Por exemplo, a ciclosporina, extraída do *Tolypocladium inflatum*, é essencial na imunossupressão para transplantes de órgãos [45], as estatinas, como a lovastatina do *Aspergillus terreus*, são cruciais no tratamento da hipercolesterolemia. Adicionalmente, existem certos fungos que produzem compostos com propriedades anticancerígenas, e que podem vir a ser utilizados para o desenvolvimento de novas terapias contra o cancro [46].

2.8.3 Pesquisas e Aplicações Biotecnológicas

2.8.3.1 Modelos Eucarióticos

A sequência de genomas fúngicos tem proporcionado informações valiosas sobre a genética humana e contribuições para a ciência biomédica [47] [27].

As leveduras, especialmente a *Saccharomyces cerevisiae*, são utilizadas como modelos eucarióticos na pesquisa científica para entender processos biológicos fundamentais e doenças hereditárias, devido à sua simplicidade e à vasta quantidade de informações genéticas disponíveis. Estudos realizados com este microrganismo ajudaram a elucidar processos fundamentais como a replicação do DNA e o ciclo celular [27].

2.8.3.2 Descoberta de Novos Compostos:

A diversidade metabólica dos fungos continua a ser uma fonte rica de novos compostos bioativos. A pesquisa contínua em ambientes diversos e em novas espécies fúngicas é vital para descobrir novos antibióticos e medicamentos, especialmente face à crescente resistência antimicrobiana [47]. Um bom exemplo desta aplicação dos fungos, foi a descoberta de que o fungo da espécie *Aspergillus terreus*, produz lovastatina, uma estatina usada para controlar o colesterol e que, para além da penicilina, o fungo *Penicillium notatum* produz outros compostos bioativos que podem tratar diversas doenças. A pesquisa contínua em fungos como estes pode levar à descoberta de novos compostos bioativos com potencial terapêutico [48].

2.8.3.3 Engenharia Genética

A biotecnologia e a engenharia genética de fungos permitem a produção de novos medicamentos e a otimização das vias biossintéticas, expandindo as possibilidades para aplicações terapêuticas e industriais [47]. Um bom exemplo é o fungo *Saccharomyces cerevisiae* que é geneticamente modificado para produzir proteínas, como insulina. A engenharia genética permite modificar a levedura para produzir proteínas humanas, facilitando a produção de medicamentos essenciais [49].

2.8.4 Impactos Negativos

2.8.4.1 Micotoxinas

Certos fungos produzem micotoxinas tóxicas que podem representar uma séria ameaça para a saúde humana e animal. Exemplos incluem a aflatoxina, produzida por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, conhecida pelos seus efeitos carcinogénicos, e a ocratoxina, produzida por espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*, que pode causar danos renais significativos [50] [20] [51].

2.8.4.2 Patogenicidade

Fungos como *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* e *Cryptococcus neoformans* são patogénicos oportunistas que podem causar infeções graves, particularmente em indivíduos imunodeprimidos. Estas infeções podem variar de micoses superficiais, como candidíase oral e vaginal a graves infeções sistémicas potencialmente fatais [50] [20] [51].

2.8.5 Filo *Ascomycota*

Os *Ascomycota*, representam o maior e mais diverso filo do reino Fungi, abrangendo mais de 64000 espécies nomeadas e um grande número de fungos ainda não descritos [52]. Este grupo é caracterizado pela produção de esporos sexuais chamados ascósporos, que se formam dentro de estruturas especializadas em forma de saco chamadas ascos. Estes ascos são frequentemente contidos em corpos frutíferos denominados ascomata. Os *Ascomycota* exibem uma vasta gama de morfologias, desde formas unicelulares, como leveduras, até formas multicelulares complexas. O micélio dos *Ascomycota* é composto por hifas septadas, que são hifas divididas por septos transversais com um único e central poro. Exemplares deste filo são encontrados em quase todos os habitats terrestres e aquáticos, são extremamente importantes tanto ecologicamente quanto economicamente, pois desempenham papéis cruciais como decompositores, simbiontes, patogénicos e produtores de substâncias bioativas. O filo inclui leveduras e fungos filamentosos, fungos que se associam a algas e cianobactérias para formar líquenes, espécies micorrízicas, saprófitas e patogénicos de plantas e animais [52] [53] [54].

Muitas espécies de *Ascomycota* são conhecidas apenas pelas suas formas assexuadas (anamorfos), que produzem esporos assexuados (conídios) em caules chamados conidióforos. No entanto, fases sexuais (teleomorfos) já foram identificadas nos ciclos de vida da maioria dos *Ascomycota* estudados detalhadamente. Os esporos sexuais dos *Ascomycota*, chamados ascósporos, formam-se dentro dos ascos [55].

Dentro deste filo encontra-se a *Saccharomyces cerevisiae*, comumente conhecida como a levedura de Cerveja ou de padeiro, utilizada na fermentação para a produção de pão, cerveja e vinho [42], *Penicillium chrysogenum* fonte do antibiótico penicilina [56] [57] [58] e a espécie *Aspergillus niger* utilizado na produção de ácido cítrico e enzimas industriais [37].

2.8.6 Filo *Basidiomycota*

Os *Basidiomycota*, com cerca de 40.000 espécies descritas, são um filo dentro do reino Fungi que inclui muitas das espécies de fungos mais conhecidas. Este grupo é caracterizado pela produção de esporos sexuais chamados basidiósporos, que se formam em estruturas especializadas chamadas basídios. Os basídios são geralmente encontrados em corpos de frutificação complexos, como cogumelos e puffballs. Os corpos de frutificação dos *Basidiomycota* podem ter várias formas, mas a mais comum é a estrutura de chapéu e pé dos cogumelos, que desempenham um papel crucial na reprodução, pois dispersam os basidiósporos para novas áreas onde podem germinar e formar um novo micélio [59].

Os fungos deste filo são encontrados numa ampla gama de habitats e desempenham um papel vital nos ecossistemas como decompositores de matéria orgânica, sendo particularmente importantes na decomposição de madeira, ajudando a reciclar nutrientes no ambiente. Além de serem decompositores essenciais, muitos *Basidiomycota* formam relações simbióticas com plantas, conhecidas como micorrizas [60] [61]. Existem também algumas espécies que são comestíveis e cultivados comercialmente, enquanto outros são patogênicos para plantas e podem causar doenças agrícolas significativas [62]. Este filo engloba fungos amplamente conhecidos, como *Amanita muscaria*, conhecida pelo seu chapéu vermelho com pontos brancos, é um cogumelo tóxico e alucinogénio [63], *Agaricus bisporus* (Champignon-de-Paris) é um dos cogumelos mais consumidos no mundo, comumente cultivado para uso culinário [64], *Lentinula edodes* (Shiitake) muito apreciado na culinária asiática e reconhecido por seus benefícios nutricionais e medicinais [65] e *Armillaria mellea* (Armilária) conhecido como "fungo do mel" devido à sua cor, é um patógeno agressivo que pode causar a podridão das raízes em várias árvores [66].

2.8.7 Filo *Glomeromycota*

Os *Glomeromycota* são um filo de fungos que formam associações simbióticas com as raízes de plantas, conhecidas como micorrizas. Este tipo de relação simbiótica é fundamental para a absorção de nutrientes pelas plantas, especialmente o fósforo. Os *Glomeromycota* são conhecidos pelo seu micélio que se infiltra nos tecidos radiculares das plantas, formando arbúsculos, que são estruturas ramificadas onde ocorre a troca de nutrientes.

Estes fungos são encontrados principalmente em solos, onde formam associações com as raízes de plantas em diversos ecossistemas, desde florestas tropicais até áreas de pradaria e zonas áridas [67]. A presença de espécies do filo *Glomeromycota* é crucial para a existência e crescimento das plantas em muitos ambientes, pois ajudam na absorção eficiente de nutrientes e melhoram a resistência das plantas a condições de estresse, como seca e doenças. Esta simbiose é especialmente importante na agricultura, onde a inoculação com fungos micorrizos pode melhorar a produtividade das culturas e reduzir a necessidade de fertilizantes químicos, é o caso da espécie *Rhizophagus irregularis*, amplamente utilizada na agricultura para melhorar o crescimento das plantas [68].

2.8.8 Filo *Blastocladiomycota*

Os *Blastocladiomycota*, com menos de 200 espécies foram descritas, são um filo de fungos que se destacam pelas suas características morfológicas e reprodutivas únicas. Este grupo inclui fungos aquáticos e saprófitos, que frequentemente habitam ambientes húmidos e aquáticos, como solos saturados e águas doces. Este filo, juntamente com os filamentosos *Chytridiomycota* e *Neocallimastigomycota*, são fungos aquáticos que produzem zoósporos flagelados. É de ressaltar a ausência de flagelos na maioria dos fungos, pois nenhum flagelo é produzido pelos *Basidiomycota*, *Ascomycota*, *Glomeromycota* e zigomicetos filamentosos. Alguns estudos filogenéticos moleculares concluíram que a perda de flagelos ocorreu uma vez na linhagem fúngica, sugerindo que houve um único ancestral comum para todos os grupos não-flagelados [69].

2.8.9 Filo *Chytridiomycota*

O filo *Chytridiomycota* mais conhecidos como quitrídios, são um filo de fungos aquáticos e terrestres que se destacam pela capacidade de produzir zoósporos flagelados, o que lhes permite movimentar-se em ambientes aquáticos. Esta característica é única entre os fungos, sendo compartilhada apenas com os filos *Blastocladiomycota* e *Neocallimastigomycota* [69].

Os quitrídios podem ser unicelulares ou multicelulares, podendo existir como células isoladas ou formar estruturas complexas com hifas e apresentam uma ampla gama de formas morfológicas. Este filo reproduz-se tanto assexuadamente quanto sexuadamente. Na reprodução assexuada, produzem zoósporos flagelados que se dispersam na água e germinam em novos organismos. Na reprodução sexuada, formam-se gametas flagelados que se fundem para formar um zigoto, que então desenvolve-se num novo organismo. Alguns quitrídios também formam esporângios, que são estruturas especializadas onde os esporos são produzidos e armazenados até serem liberados [70].

Os quitrídios são encontrados em habitats de água doce, salobra e marinhos, no entanto são mais abundantes no solo, e têm uma importância ecológica significativa devido ao seu papel na decomposição de matéria orgânica e na reciclagem de nutrientes. No entanto, algumas espécies de quitrídios são patogénicas e podem causar doenças em plantas, algas e animais [70].

2.8.10 Filo *Neocallimastigomycota*

Os *Neocallimastigomycota* são um filo de fungos anaeróbicos que habitam o trato digestivo de herbívoros, como ruminantes e alguns mamíferos não ruminantes. Estes fungos desempenham um papel crucial na digestão de material vegetal complexo, mais precisamente na digestão da celulose, hemicelulose e lignina, auxiliando na degradação da fibra dietética que os herbívoros consomem. Este filo é caracterizado pela ausência de mitocôndrias e pela presença de hidrogenossomas, que são organelos responsáveis pela produção de energia em condições anaeróbicas. A reprodução nos *Neocallimastigomycota* ocorre principalmente de forma assexuada, produzem zoósporos flagelados, que podem ter um ou mais flagelos, permitindo-lhes movimentar-se no ambiente líquido do trato digestivo dos herbívoros. Embora a reprodução sexuada não tenha sido amplamente documentada, é possível que ocorra, mas ainda é pouco compreendida. Estes fungos são de grande

importância ecológica e econômica devido ao seu papel na digestão de fibras vegetais em herbívoros. Eles facilitam a degradação de materiais complexos como celulose e lignina, contribuindo para a nutrição dos animais. Esta função é especialmente vital na produção pecuária, onde a eficiência da digestão de forragens pode influenciar a saúde e a produtividade dos animais [71].

2.9 Fungos filamentosos

Podemos dividir os fungos em diferentes grupos, como: filamentosos, leveduras e saprófitos.

Os fungos filamentosos são um grupo distinto dentro do reino Fungi, caracterizados pelo crescimento em forma de filamentos longos e ramificados, conhecidos como hifas. Estas hifas podem ser septadas, ou seja, divididas em compartimentos por paredes chamadas septos, ou não septadas, formando uma rede contínua de citoplasma. Um conjunto de hifas entrelaçadas forma o micélio, que constitui a estrutura vegetativa do fungo e é responsável pela absorção de nutrientes [72].

O micélio fúngico é altamente adaptável e apresenta uma considerável plasticidade de desenvolvimento. Dependendo das condições ambientais e dos nutrientes disponíveis, diferentes regiões do micélio podem crescer, ramificar-se, fundir-se, envelhecer, esporular e exibir diversas atividades fisiológicas e bioquímicas em diferentes momentos ou mesmo em simultâneo. Esta capacidade de adaptação permite que os fungos filamentosos colonizem uma vasta gama de substratos, desde o solo e matéria orgânica em decomposição até superfícies artificiais, como vidro e plástico [73].

Os fungos filamentosos desempenham um papel crucial na natureza como decompositores de resíduos orgânicos. Através do crescimento em hifas, conseguem colonizar eficazmente os substratos, explorando-os em busca de nutrientes. Os polímeros presentes nos resíduos orgânicos, como a celulose e o amido, são primeiro degradados em moléculas menores por enzimas extracelulares segregadas pelos fungos, antes de serem absorvidos e utilizados como fonte de energia e carbono [74].

Além disso, os fungos filamentosos produzem uma vasta gama de metabolitos primários e secundários, incluindo ácidos orgânicos e compostos antimicrobianos. Estes metabolitos não só contribuem para a sua sobrevivência e crescimento, mas também têm

importantes aplicações industriais, como a produção de alimentos, medicamentos e enzimas [75].

Os fungos filamentosos têm sido amplamente explorados pela indústria devido à sua capacidade de produzir grandes quantidades de enzimas e outros compostos bioativos. Por exemplo, o *Aspergillus niger* é utilizado na produção de ácido cítrico e glucoamilase, enquanto o *Aspergillus oryzae* é empregado na fermentação de alimentos e na produção de várias enzimas [75]. Além disso, outras espécies, como *Penicillium chrysogenum* e *Aspergillus terreus*, são utilizadas na produção de antibióticos e ácidos orgânicos, respetivamente [56] [57] [58].

A indústria biotecnológica tem beneficiado da utilização de fungos filamentosos, especialmente na produção de enzimas industriais, ácidos orgânicos, metabolitos secundários e outros produtos de valor acrescentado. Estas enzimas têm aplicações em diversos setores, incluindo o fabrico de alimentos, papel e celulose, detergentes, têxteis e biocombustíveis [76].

Embora os fungos filamentosos sejam amplamente utilizados na indústria, também têm sido associados a infeções em humanos, especialmente em indivíduos imunodeprimidos. Espécies de géneros como *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* são frequentemente responsáveis por infeções oportunistas, e podem afetar órgãos como os pulmões, pele e unhas [77] [78] [79]. Estas infeções podem variar desde manifestações superficiais até doenças invasivas graves, dependendo da virulência da espécie e do estado imunológico do hospedeiro.

2.10 Leveduras

As leveduras são organismos unicelulares que se reproduzem por gemulação (budding) e pertencem principalmente aos filos *Ascomycota* e *Basidiomycota*, embora também possam ser encontradas em grupos como os deuteromicetos [80]. Caracterizam-se pela capacidade de se dividirem assexuadamente por gemulação ou fissão, e apresentam uma ampla diversidade morfológica e ecológica [27]. Em alguns casos, as gémulas não se separam da célula mãe, em vez disso, formam uma cadeia. As cadeias alongadas, constituídas por várias gémulas, podem assemelhar-se a hifas. Quando isto acontece, as cadeias recebem o nome pseudo-hifas [81] [82].

Alguns fungos patogénicos existem sob a forma de fungo filamentoso no meio ambiente, mas quando estão nos tecidos sofrem mudanças e têm o aspeto de uma levedura. Estes fungos são designados de fungos dimórficos [83] [84]. Os fungos dimórficos incluem o *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Sporothrix schenckii* e *Talaromyces marneffe* [85].

As leveduras distinguem-se pela presença ou ausência de cápsulas, pelo formato das células (esféricas, ovais ou alongadas), pela formação de pseudohifas, e pela presença de esporos sexuais.

O número de leveduras descobertas tem vindo a aumentar ano após ano. Mais de 2.500 espécies de leveduras foram publicadas até 2005. Supõe-se que apenas 1% das espécies de leveduras são atualmente conhecidas, o que representa aproximadamente 1.500 espécies. Espera-se que o número total de espécies de leveduras na Terra atinja as 150.000 [86]. A diversidade de espécies de leveduras em nichos específicos é determinada pela sua capacidade de utilizar diferentes fontes de carbono e pela sua seletividade nutricional, uma vez que apresenta uma grande especialização por habitat e por isso habitam uma ampla gama de nichos ecológicos, desde ambientes terrestres até aquáticos e aéreos e são frequentemente encontradas na superfície de frutas, vegetais e cereais, onde desempenham um papel fundamental na degradação de matéria orgânica. Além disso, algumas espécies têm relações simbióticas ou parasitárias com animais [87].

As leveduras têm um papel significativo na indústria alimentícia e biotecnológica. São utilizadas na produção de pão, vinho, cerveja, e outros produtos alcoólicos, além de vários produtos bioquímicos. *S. cerevisiae* é a espécie mais amplamente utilizada nestes processos devido à sua eficiência na fermentação alcoólica. Além disso, algumas leveduras produzem

pigmentos que têm aplicações biotecnológicas, como a astaxantina produzida por *Phaffia rhodozyma*, usada em suplementos alimentares na aquacultura para melhorar a coloração de salmões criados em cativeiro [27].

Embora sejam amplamente utilizadas e muitas vezes benéficas, algumas espécies de leveduras são responsáveis pela deterioração de alimentos e podem ser patogénicas para humanos. As infeções por *Candida spp.* têm aumentado significativamente, especialmente entre indivíduos imunodeprimidos. As leveduras podem ser encontradas em ambientes costeiros e recreativos, como praias, onde podem representar um risco para a saúde devido à sua presença na areia e na água, podendo causar infeções oportunistas [88].

2.11 Fungos Dermatófitos

Os fungos dermatófitos constituem um grupo especializado de fungos capazes de invadir tecidos queratinizados, como pele, cabelo e unhas, tanto em seres humanos como em outros animais [89] [90]. Estas infeções, conhecidas como dermatofitoses ou micoses, são geralmente limitadas à camada córnea da epiderme, uma vez que os dermatófitos não têm capacidade para penetrar em tecidos mais profundos em hospedeiros imunocompetentes [91]. As dermatofitoses são as infeções fúngicas mais comuns no mundo, afetando cerca de 25% da população global [92]. As manifestações clínicas das dermatofitoses podem variar significativamente, desde infeções ligeiras até quadros clínicos mais graves, dependendo de fatores como a resposta imunológica do hospedeiro, a virulência da estirpe fúngica, a localização anatómica da infeção e as condições ambientais[93] .

O estudo dos dermatófitos começou no século XIX com o trabalho pioneiro de David Gruby, que, em 1841, identificou a natureza fúngica das infeções cutâneas. No entanto, foi Raimond Sabouraud, um dos mais influentes micologistas médicos do início do século XX, que desenvolveu uma classificação taxonómica detalhada dos dermatófitos. Em 1910, Sabouraud publicou o seu trabalho seminal “Les Teignes”, onde categorizou os fungos em quatro géneros: *Achorion*, *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton*, baseando-se na morfologia e características culturais dos fungos [94]. Posteriormente, Chester Emmons modernizou a classificação de Sabouraud, eliminando o género *Achorion* e reconhecendo apenas três géneros principais: *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton*. Esta nova classificação foi baseada na morfologia dos esporos e outras estruturas fúngicas, o que proporcionou um sistema mais simplificado e amplamente adotado [95].

Podem também ser divididos em três grupos com base na fonte de infeção. O primeiro é antropofílico quando a infeção é transmitida de um ser humano para outro através do contacto direto [96] como acontece com *Microsporum langeronii*, que se descobriu ter causado tinea corporis em crianças de uma escola primária pública de Antananarivo (Madagáscar) [97]. O zoófilo é outro grupo de dermatófitos quando os fungos são transmitidos de animais, domésticos ou selvagens, para humanos ou outros animais [96], como *Microsporum canis* e *Trichophyton mentagrophytes* [98]. O terceiro grupo de dermatófitos é geofílico, encontrado no solo que vive em materiais queratinosos como os saprófitos e pode ser transmitido aos humanos após contacto com solo contaminado, como o *Microsporum gypseum* [96]. A infeção por um tipo de dermatófito antropofílico de dermatófitos é geralmente reconhecida pela natureza crónica com baixa inflamação, enquanto que a inflamação já é mais elevada quando a doença é causada por um dermatófitos zoofílico ou geofílico [99].

2.12 Doenças relacionadas com os fungos

Alguns fungos podem ser patogénicos, causando doenças em humanos, animais e plantas. Estas infeções, conhecidas como micoses, podem variar de condições superficiais a infeções sistémicas, que muitas vezes resultam em infeções graves, podendo mesmo levar á morte, especialmente em indivíduos imunodeprimidos [100]. Os fungos patogénicos dividem-se em dois grupos principais: fungos verdadeiramente patogénicos, capazes de causar infeções em indivíduos saudáveis, e fungos oportunistas, que afetam predominantemente indivíduos com sistemas imunitários comprometidos [101].

Estes organismos eucariotas possuem células com uma parede celular composta principalmente por quitina e glucanos [100]. A morfologia dos fungos varia entre formas unicelulares (leveduras) e formas filamentosas (bolors), sendo que alguns, como *Candida albicans*, exibem dimorfismo, alternando entre formas leveduriformes e filamentosas consoante as condições ambientais [102]

Os mecanismos de patogenicidade incluem a adesão às células hospedeiras, a produção de enzimas extracelulares que degradam tecidos, a evasão do sistema imunitário e a produção de toxinas [100]. Por exemplo, *Aspergillus fumigatus* é conhecido pela sua capacidade de crescer à temperatura corporal humana e produzir enzimas proteolíticas, facilitando a invasão dos tecidos pulmonares [103].

Existem diferentes tipos de Doenças Fúngicas conhecidas como, Micoses Superficiais e Cutâneas, Micoses Subcutâneas, Micoses Sistémicas e Micoses Oportunistas.

As micoses superficiais e cutâneas afetam a pele, o cabelo e as unhas. Dermatófitos como *Trichophyton*, *Epidermophyton* e *Microsporum* são os principais agentes causadores de doenças como tinea pedis (pé de atleta) e onicomicose (infeção das unhas) [101]. Estas infeções, embora limitadas à epiderme, podem causar desconforto significativo e complicações como celulite bacteriana secundária [102].

As micoses subcutâneas resultam da inoculação de esporos fúngicos através de feridas na pele, afetando tecidos subcutâneos, músculo e, ocasionalmente, ossos. A esporotricose, causada por *Sporothrix schenckii*, é um exemplo comum. Esta doença manifesta-se inicialmente como nódulos indolores que podem progredir ao longo dos vasos linfáticos [104].

As micoses sistémicas são causadas por fungos que podem invadir órgãos internos, resultando em doenças graves, especialmente em indivíduos imunodeprimidos. A

histoplasmose, causada por *Histoplasma capsulatum*, é um exemplo notável, sendo endêmica em certas regiões do continente americano. Outra micose sistêmica relevante é a aspergilose, causada por *Aspergillus fumigatus*, que pode variar de uma condição alérgica leve a uma infecção invasiva grave, muitas vezes fatal [103].

As micoses oportunistas ocorrem principalmente em indivíduos com sistemas imunitários debilitados, como aqueles com HIV/SIDA ou pacientes submetidos a tratamentos imunossupressores [102]. A candidíase, causada por *Candida albicans*, é uma das infecções oportunistas mais comuns, variando desde infecções superficiais a infecções sistêmicas graves [102]. A criptococose, causada por *Cryptococcus neoformans*, é outra micose oportunista significativa, especialmente em pacientes com SIDA, podendo causar meningite criptocócica, uma condição frequentemente fatal [104].

O diagnóstico das doenças fúngicas envolve técnicas laboratoriais como exames microscópicos, culturas, testes serológicos e métodos de biologia molecular, como a PCR [101]. O diagnóstico precoce é essencial, particularmente nas micoses sistêmicas e oportunistas, onde atrasos no tratamento podem resultar em elevada mortalidade [100].

O tratamento depende do tipo de fungo e da gravidade da infecção. Os antifúngicos mais utilizados incluem polienos (anfotericina B), azóis (fluconazol) e equinocandinas (caspofungina) [102]. Contudo, a resistência antifúngica está a emergir como um problema crescente, especialmente em infecções por *Candida* e *Aspergillus*, complicando o tratamento [105].

Alguns fungos desenvolveram adaptações para contornar a eficácia destas respostas de defesa do hospedeiro. Vários destes fungos residem nas células fagocíticas do hospedeiro, onde estão protegidos do resto do sistema imunitário. Uma vez que o crescimento prolongado de hifas dentro dos fagócitos levaria à rutura celular, expondo assim o fungo ao sistema imunitário do hospedeiro, vários fungos mudam da forma de crescimento de hifas multicelulares encontrada no ambiente para uma forma de crescimento de levedura unicelular num processo conhecido como mudança dimórfica. Outros fungos dimórficos utilizam a forma de célula de levedura para evitar a fagocitose e o ambiente citotóxico do sistema fagolisossoma; em vez disso, estão adaptados para tolerar as respostas imunitárias adaptativas. Assim, a troca dimórfica permite a colonização de nichos ambientais únicos dentro do hospedeiro e a falha na troca atenua quase sempre a patogenicidade nestes fungos. Outros fungos dimórficos que existem predominantemente como forma de crescimento vegetativo de levedura fora do hospedeiro, como o patogénico vegetal *Ustilago*

maydis e o patogénico humano *Candida albicans*, a mudança dimórfica de uma forma de crescimento de levedura para uma forma de crescimento filamentoso pode facilitar a penetração no tecido durante a infeção [106].

Na figura 9, estão algumas espécies de fungos que fazem a mudança dimórfica. Em geral, estes fungos crescem numa forma hifal multicelular a 25°C e passam a produzir formas de crescimento de levedura unicelulares a 37°C [106],

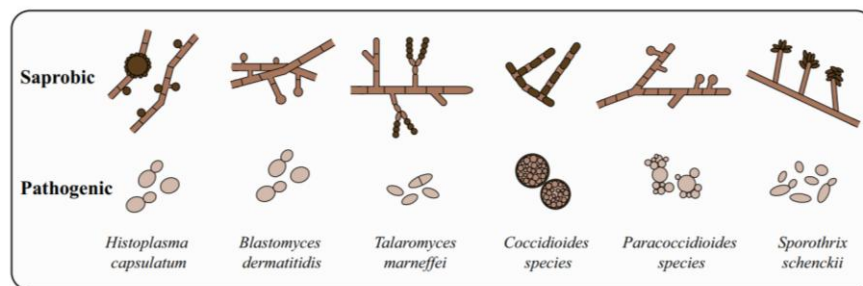


Figura 9 - Morfologias celulares de agentes patogénicos fúngicos humanos dimórficos. As morfologias de crescimento dos *Ascomycota* dimórficos *Histoplasma capsulatum* (*Ajellomyces capsulatum*), *Blastomyces dermatitidis* (*Ajellomyces dermatitidis*), *Talaromyces marneffi* (*Penicillium marneffi*), *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Sporothrix schenckii* (*Ophiostoma schenckii*). Fonte: Fungal dimorphism: the switch from hyphae to yeast is a specialized morphogenetic adaptation allowing colonization of a host [106].

2.13 Existência de fungos em zonas balneares

A dualidade dos fungos, tanto como fonte de terapias benéficas quanto como potenciais patógenos, sublinha a necessidade de um equilíbrio cuidadoso entre a exploração dos seus benefícios medicinais e a gestão dos riscos associados às infeções fúngicas e à contaminação de alimentos e/ou rações por micotoxinas. Portanto, a importância dos fungos estende-se para além da medicina, influenciando significativamente a saúde pública e a segurança alimentar. A investigação contínua e a vigilância rigorosa são essenciais para maximizar os benefícios terapêuticos dos fungos, enquanto se minimizam os riscos associados aos seus efeitos patogénicos e tóxicos. Nesse sentido o programa bandeiro azul traz a diretriz que obriga á pesquisa de fungos nas areias das praias de Portugal.

Desde recicladores a zeladores, os micróbios desempenham um papel importante na homeostasia aquática. Todas as praias albergam populações de micróbios, mas um estudo da Universidade de Rutgers determinou que nem todas as praias são iguais. A ecologia microbiana difere não só entre regiões – como as praias de água doce dos Grandes Lagos ou as praias dos oceanos Atlântico ou Pacífico – mas também entre locais na mesma praia [107].

Os fungos filamentosos e as leveduras são microrganismos omnipresentes na natureza, podendo ser encontrados em quase todos os habitats. O desenvolvimento dos microrganismos, de maneira geral, é influenciado por flutuações nas condições físicas e químicas dos respetivos habitats naturais. A compreensão da influência desses fatores ambientais proporciona uma explicação para a distribuição dos microrganismos na natureza, enquanto permite definir condições que possibilitem o controlo (otimização/inibição ou eliminação) da atividade microbiana, tanto em ambientes laboratoriais quanto industriais. Entre os fatores ambientais, considera-se o pH, a disponibilidade de água e oxigénio, bem como a natureza e a concentração dos nutrientes, como desempenho de um papel particularmente relevante no controlo do crescimento microbiano [108] [80].

As areias, enquanto ambiente complexo, abrigam uma diversidade significativa de microrganismos adaptados a esse habitat distinto. Diversos estudos documentaram que a areia seca é habitada por uma ampla variedade de organismos, incluindo pequenos invertebrados, bactérias, fungos, vírus, algas e diatomáceas, capazes de se adaptar a ambientes em constante transformação [73].

As condições aparentemente inóspitas dos ambientes de areia da praia escondem as comunidades prósperas que aí se encontram. Fatores físicos, como a disponibilidade de água e a proteção contra a insolação; fatores biológicos, como competição, predação e formação de biofilmes; e a disponibilidade de nutrientes, todos contribuem para as características do micropsammon. As comunidades microbianas da areia incluem espécies autóctones, nativas do ambiente, e microrganismos alóctones, como bactérias indicadoras fecais e patógenos transmitidos pela água, que são introduzidos por ondas, escoamento, ar ou animais. O destino destes últimos microrganismos referidos varia entre morte, persistência transitória e/ou replicação, até ao estabelecimento de populações prósperas (naturalização) e integração na comunidade autóctone. O transporte dos micropsammon dentro do habitat ocorre tanto horizontalmente ao longo da praia como verticalmente da superfície da areia até ao lençol freático, bem como em várias escalas, incluindo fluxo intersticial dentro dos poros da areia, transporte de sedimentos para microrganismos associados a partículas e os processos em grande escala da ação das ondas e escoamento terrestre [109].

O conceito de areia da praia como um habitat microbiano e reservatório de BIF e microrganismos patogénicos começou a influenciar a forma de pensar sobre os efeitos na saúde humana associados à exposição à areia e ao uso recreativo da água das praias. Uma variedade de patógenos tem sido reportada nas areias das praias, e estudos epidemiológicos recentes encontraram algumas evidências de riscos para a saúde associados à exposição à areia. Populações persistentes ou replicantes de BIF e patógenos entéricos têm consequências para as estratégias de gestão de bacias hidrográficas/praias e padrões regulatórios para praias seguras [109].

Sabe-se que a areia, principalmente a frequentada por seres humanos e animais apresenta uma prevalência crescente de fungos, e esta pode desempenhar um papel de vetor de transmissão de agentes patogénicos oportunistas, como os dermatófitos, fungos patogénicos, que podem ser levados pelos próprios utilizadores das praias [110]. Assim, é possível atribuir parcial responsabilidade às pessoas e aos animais que frequentam as praias pela contaminação das suas areias, seja porque transportam microrganismos ou porque descartam resíduos orgânico na areia ou na água. Estes detritos fornecem os nutrientes e a umidade essenciais para a preservação e desenvolvimento de microrganismos, como leveduras, fungos filamentosos e bactérias (Figura 10) [111].



Figura 10 - Esquema das interações entre os banhistas, animais e o ambiente da praia, potencialmente levando à exposição de microrganismos patogênicos. Fonte: Impacts of a changing earth on microbial dynamics and human health risks in the continuum between beach water and sand [110].

Já foram isoladas diferentes espécies de fungos e leveduras de areias de praias balneares. As leveduras patogênicas isoladas incluem as espécies: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Rhodotorula mucilaginosa*. Os fungos filamentosos patogênicos e patogênicos oportunistas incluem *Aspergillus sp.*, *Chrysosporium sp.*, *Fusarium sp.*, *Scedosporium sp.*, *Scytalidium sp.*, *Scopulariopsis sp.*, *Penicillium sp.*, *Cladosporium sp.*, *Mucor sp.*, *Stachybotrys sp.*, *Phialemonium sp.*, *Acremonium sp.* Os géneros *Aspergillus* e *Penicillium* são os mais frequentes na areia de praias. A areia das praias balneares também serve como reservatório de dermatófitos, incluindo *Trichophyton sp.*, *Microsporum sp.*, *Chrysosporium sp.*. As leveduras negras *Exophiala dermatitidis* e *Aureobasidium melanogenum* também já foram isoladas de areia da praia [80].

As áreas costeiras destinadas a atividades balneares representam locais de grande importância, especialmente durante a época balnear, tendo uma grande afluência de pessoas e contribuindo para a criação de numerosos postos de trabalho. Contudo, estas atividades propiciam oportunidades para o contato direto com as comunidades microbianas presentes na praia, conforme destacado por [110]. Historicamente, as enfermidades que afetaram os frequentadores de praias têm sido principalmente associadas à exposição a organismos patogênicos presentes na água, tanto no mar como em água doce, no caso de praias fluviais.

No entanto, é pertinente salientar que os banhistas também entram em contacto com a areia, [112] e que as areias das praias, são um elemento passivo de poluição, que podem ser contaminadas por resíduos sólidos, excrementos de animais e pela própria água, que pode transportar microrganismos patogénicos, oportunistas e parasitas. Evidências indicam que os indicadores fecais e as bactérias patogénicas, por exemplo, podem sobreviver por períodos prolongados nos sedimentos [113], para além destes microrganismos patogénicos encontrados na areia, os fungos também prosperam na areia e estes estão associados a infeções fúngicas invasivas associadas a uma elevada taxa de mortalidade e outras doença. Este entendimento destaca a complexidade das interações microbiológicas nas praias, reforçando a importância da avaliação abrangente da qualidade ambiental e da segurança dos utilizadores de praias. Por exemplo, muitas espécies de *Candida* frequentemente encontradas na areia são patogénicos oportunistas [80].

Apesar da superfície de contato da água com a pele e mucosa humana ser superior à da areia, muitos utilizadores de praias permanecem em contacto com a areia por períodos mais prolongados do que com a água, fazendo com que estes apresentem também um risco aumentado de exposição a agentes patogénicos, como certos fungos, seja por contacto direto com a pele e membranas mucosas ou pela inalação de esporos [114]. Por isto, em 2003, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou as Diretrizes para Ambientes Aquáticos Recreativos Seguros, enfatizando a importância de examinar a areia, especialmente em latitudes mais elevadas, pois nestas regiões, devido às temperaturas mais baixas da água do mar, a população tende a passar menos tempo dentro de água e mais tempo na areia, visto que continuam a utilizar as praias para diversas atividades recreativas [115], no entanto, é relevante notar que, apesar do reconhecimento da contaminação da areia no relatório da OMS, este não estabeleceu recomendações específicas em termos de padrões [80].

Embora as águas de recreio tenham sido monitorizadas há muito tempo em termos de indicadores de poluição fecal humana e da sua suposta indicação de risco para os seres humanos devido à presença de agentes patogénicos humanos, as areias das praias têm sido historicamente negligenciadas nesta área [116] apesar de alguns estudos do fim do século XX demonstrarem a presença de fungos nas areias e apresentarem a preocupação de alguns pesquisadores á cerca deste tema. Por exemplo, [117] encontraram dermatófitos comuns em areias de praia no Havaí e [118] isolaram leveduras da água e amostras de areia recolhidas numa praia balnear na Grécia. Pelo menos um estudo isolou fungos patogénicos humanos de areias da praia, enquanto outro relatou espécies patogénicas de áreas costeiras da Califórnia [119]. Comunidades bacterianas nas areias das praias começaram a receber uma

atenção crescente devido à sua relevância para a saúde pública [109] [112] [107]. O número de estudos que deteta agentes patogénicos em areias de praia de vários locais do Mundo está a aumentar; contudo, é fundamental perceber a prevalência comparação dos diversos agentes patogénicos encontrados em areias de praia e os riscos de saúde que lhes estão associados. Uma das dificuldades em comparar a prevalência de patogénicos em areias de praia está no facto de que a ocorrência de agentes patogénicos está, possivelmente, relacionada com a proximidade local de fontes de contaminação (por exemplo, banhistas ou contaminação fecal), assim como as diferentes variáveis do meio ambiente onde a praia está inserida, por exemplo as suas características geológicas, da flora circundante, as infraestruturas de acesso e a existência de transportes, assim como atividades comerciais ou lúdicas nas águas circundantes e as características ecológicas destes patogénicos [109].

Assim sendo, uma compreensão mais aprofundada das comunidades bacterianas típicas das areias das praias poderá oferecer novos conhecimentos sobre a ecologia destes ecossistemas complexos e talvez orientar os esforços de monitorização para proteger a saúde pública [107].

O aumento do uso das zonas balneares, combinado com o desejo de salvaguardar a saúde pública, trouxe, nas últimas décadas, com maior ênfase, a questão de a areia da praia atuar como veículo de infeção. Todavia, a qualidade microbiológica da areia não estava até pouco tempo incluída na monitorização das praias [73].

Esta preocupação com os níveis de microrganismos patogénicos nas areias foi evoluindo para todos os países, e em Portugal foi estabelecido um projeto, fruto de uma parceria entre a Associação Bandeira Azul e o Instituto Nacional de Saúde e a Agência de Proteção Ambiental que tem como objetivo avaliar a qualidade microbiológica da areia em praias selecionadas, incluindo a análise da distribuição de bactérias e fungos nas areias. Além disso, sugeriu valores limite para indicadores microbiológicos selecionados. Este trabalho reflete a crescente atenção à importância da qualidade da areia, não só no contexto das diretrizes internacionais, mas também no âmbito de esquemas nacionais, como o Bandeira Azul, que visam garantir a segurança e a qualidade ambiental nas áreas recreativas de praia [111].

3 Materiais e métodos

3.1 Materiais, equipamentos e meios

Lista de materiais utilizados:

Tubos Falcon de 50 e 15 ml, luvas, arca de refrigeração, frascos estéreis de 250 ml, copos com tampa estéreis de 250 ml, espátulas estéreis, espalhadores em L estéreis, ansas estéreis, filme de vedação de laboratório, micropipetas automáticas de 200 µL, 1 ml e 10 ml e respectivas pontas estéreis, água desionizada e estéril, placas de Malte agar, placas de Mycosel agar, placas de TSA, placas de Rosa de Bengala, azul de lactofenol, laminas, lamelas e material de referência (estirpes liofilizadas de *E. coli*, *Candida albicans*, *Trichophyton interdigitale* e *Aspergillus brasiliensis*).

Lista de equipamentos utilizados:

Balança de precisão (d=0,01g), câmara de fluxo laminar, mesa de agitação, agitador vórtex, estufa, frigorífico e microscópio.

Composição e descrição dos meios de cultura utilizados:

Meio de cultura de Malte Agar

A constituição do meio Malte Agar é a seguinte: 30 g de extrato de malte, 0,05 g de Cloranfenicol e 17 g de Agar em 1000 mL de água destilada. O pH final é de $5,5 \pm 0,2$ a 25 °C.

Este meio seletivo é utilizado para isolamento, cultivo e enumeração de bolores e leveduras. As suas principais características são o pH ácido que confere um efeito seletivo, assim como a adição do antibiótico cloranfenicol que condiciona o crescimento bacteriano, favorecendo as condições ótimas de crescimento de bolores e leveduras. O extrato de malte fornece a fonte de aminoácidos, azoto, carbono, vitaminas e minerais necessários para o crescimento microbiano.

Meio de cultura de Mycosel Agar

A constituição do meio Mycosel Agar é a seguinte: 10 g de enzima digestiva de farelo de soja, 40 g de glucose, 0,05 de Cloranfenicol, 0,4 g de Cycloheximide e 15 g de Agar em 1000 mL de água destilada.

Este meio seletivo é usado para isolamento e cultivo de fungos patogénicos, incluindo os fungos dermatófitos. A enzima digestiva de farelo de soja fornece os aminoácidos, carbono, vitaminas e minerais para o crescimento de fungos. A grande concentração de glucose favorece o meio para o crescimento Micobiótico. O Cloranfenicol é um antibiótico de grande espectro que inibe o crescimento de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Cycloheximide suprime o crescimento dos fungos saprófitos.

Meio de cultura de TSA (Tryptic Soy Agar)

A constituição do meio TSA é a seguinte: Caseína peptonada e peptona de de soja que são as fontes de carbono, nitrogénio e aminoácidos essenciais para o crescimento dos microrganismos, Cloreto de sódio (NaCl) para manter o equilíbrio osmótico, Ágar que é o agente solidificante e Água para dissolver os componentes.

O meio de cultura TSA é um meio não seletivo para crescimento de bactérias e fungos sem requisitos nutricionais específicos, e para a preparação de estirpes de referência com o objetivo de participação em ensaios de controlo dos meios de cultura.

Meio de cultura Rosa de Bengala Agar

Este meio tem como componentes o corante Rosa de Bengala que dá uma coloração rosada ao meio e atua como agente seletivo, inibe o crescimento bacteriano e restringe o desenvolvimento excessivo das colónias de fungos, o que facilita a observação e a contagem, Cloranfenicol que é um antibiótico utilizado aqui para aumentar a seletividade, inibindo o crescimento bacteriano, Ágar que é o agente solidificante e geralmente inclui peptonas e glicose para fornecer os nutrientes essenciais para o crescimento fúngico.

O Rosa de Bengala Ágar é um meio de cultura seletivo utilizado principalmente para a isolamento de fungos, especialmente para o crescimento de leveduras e bolores a partir de amostras ambientais, como solos, águas e alimentos. Este meio é particularmente útil porque o corante rosa de bengala inibe o crescimento de bactérias e Uma das principais vantagens do uso do Rosa de Bengala é a sua capacidade de restringir o crescimento rápido de fungos, permitindo uma separação clara das colónias para facilitar a contagem.

3.2 Descrição do método

O trabalho foi desenvolvido no laboratório das Águas e Energia do Porto e no laboratório ECOBIOTEC (Bioremediação e Funcionamento de Ecossistemas) instalado no CIIMAR, onde iniciei a pesquisa enquanto não tinha os equipamentos necessários no laboratório da AEdP. É de salientar que, devido à confidencialidade, o que será referido é apenas o fundamental para a perceção dos resultados exibidos.

Foram recolhidas e analisadas 84 amostras (a contar com os duplicados de amostragem) desde o dia 11/01/2024 ao dia 06/08/2024. Estas foram recolhidas de 7 praias da cidade do Porto, que aqui iremos denominar de Praia A, B, C, D, E, F e G.

Os métodos utilizados foram propostos pelo Programa da Associação Bandeira Azul (ABA) de 2024 [120]. No entanto, foram modificadas ou adicionadas etapas para otimizar o procedimento. O procedimento do método é descrito com mais detalhe no Anexo 1.

As amostras de areia foram recolhidas de uma profundidade de cerca de 10 cm, com luvas estéreis, para um tubo Falcon de 50 ml. De cada praia recolheu-se areia de 3 pontos equidistantes ao longo da zona seca do areal (Figura 11).

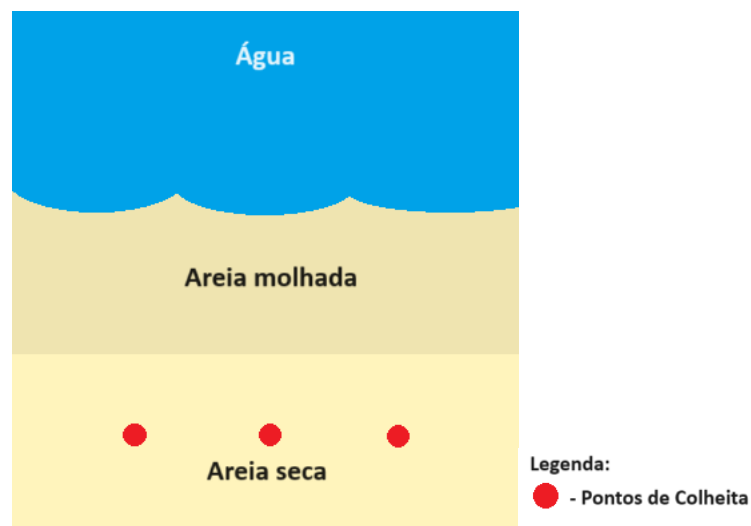


Figura 11 - Pontos de colheita na praia

As amostras foram transportadas refrigeradas para o laboratório e processadas até 18 horas após a sua chegada.

No laboratório misturou-se as 3 amostras de areia de cada praia para um frasco estéril de 250 ml, de modo a obter uma amostra composta da respetiva praia, em seguida pesou-se para dentro de um copo estéril de 250 ml 40g dessa areia (peso bruto) numa balança de precisão ($d=0,01g$).

Depois de pesada, adicionou-se á areia 40 ml de água destilada estéril. Em seguida agitou-se o copo com a areia e a água numa mesa de agitação a 100 rpm durante 30 min.

Após a agitação, foram preparadas duas diluições do sobrenadante, uma na proporção de 1/10 e outra de 1/100. Em seguida, 0,2 ml de cada amostra foram inoculados em placas de Petri de Malte agar, utilizando o método de espalhamento com o auxílio de uma espátula em L. Este procedimento foi realizado em triplicado para o sobrenadante sem diluição, para a diluição de 1/10 e para a diluição de 1/100.

Além do Malte agar, também foi utilizado o Mycosel agar (suplementado com cloranfenicol e cicloheximida) para o crescimento e identificação de dermatófitos patogénicos. Foram inoculadas placas em triplicado de Mycosel agar com 0,2 ml do sobrenadante original sem diluição. Embora não seja o objetivo deste relatório, esta abordagem foi considerada essencial, para estudar especificamente a quantificação dos fungos patogénicos, enriquecendo assim a análise das areias das praias estudadas.

De seguida colocou-se as placas inoculadas a incubar na estufa a $27,5^{\circ}C \pm 2,5^{\circ}C$ durante 5 dias para as placas de malte agar e 21 dias para as de Mycosel agar.

Para cada meio de cultura, as colónias em cada placa foram contadas. No caso das placas de Malte agar, foram consideradas as contagens das placas com a menor diluição em que foi possível fazer a contagem, já que, em muitas situações, o elevado número de colónias e a dispersão das mesmas na placa impediram a contagem precisa. A média das colónias foi calculada e multiplicada por 5, para obter a contagem por mL. O resultado foi expresso em unidades formadoras de colónias (CFU) por grama de areia, considerando que 1 mL de amostra é equivalente a 1 g de areia. Esses resultados foram inseridos no programa LabWay, que utilizou um limite de rejeição de 490 CFU/g proposto no artigo [80] e indicado como limite de rejeição pelo programa Bandeira Azul (Tabela 2). Qualquer resultado que excedesse esse valor era imediatamente sinalizado para indicação de potencial contaminação.

Tabela 2 - Valores limite de fungos segundo o Programa Baneira Azul. (Adaptado do Programa da ABA) [120].

Parâmetros	Fungos	
Método	Lavagem, espalhamento e contagem total de fungos - UFC/g de areia de zonas balneares costeiras	
Classificação	Conforme	Não conforme
Limites	Até 420 UFC/g de areia	Acima de 420 UFC/g de areia

Adicionalmente, procedeu-se ao isolamento e repicagem de colónias fúngicas até obtenção de culturas puras, com o intuito de posteriormente se fazer a identificação molecular. No entanto, não foi possível realizar a identificação molecular, uma vez que o método de extração de DNA e a técnica de PCR ainda estavam em fase de otimização. Apesar disso, as observações microscópicas das colónias, realizadas com coloração por azul de lactofenol e ampliação de 400x, permitiram visualizar estruturas morfológicas, cujas imagens estão disponíveis no Anexo 2.

Foi também realizada uma tentativa de extração de DNA diretamente da areia de uma das praias amostradas, foi utilizado o DNeasy® PowerSoil® Pro Kit (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. No entanto, a quantidade de DNA extraída foi insuficiente para proceder com a sua sequenciação.

3.3 Análise estatística

Para a implementação e validação do método de pesquisa e deteção de fungos totais em areia, foram aplicados estudos estatísticos aos seguintes parâmetros caracterizadores de validação:

- Gama de trabalho (Limite inferior de quantificação e Limite superior de quantificação);
- Incerteza: avaliada em três níveis - Incerteza da Contagem, Incerteza Analítica, Incerteza de Medição (sendo esta a soma da Incerteza Analítica e da Incerteza da Amostragem), conforme descrito nas normas ISO 29201, Guia Relacre 29 e Guia Eurachem/CITAC - Incerteza de medição resultante da amostragem: um guia para métodos e abordagens;
- Exatidão (Veracidade + Precisão): Avaliada por meio da Veracidade e Precisão, de acordo com a ISO 5725-1:2023 (na verdade a exatidão não tem um valor, mas sim a precisão e a veracidade):
 - Precisão foi determinada através da Repetibilidade e do Critério de Precisão intermédia,
 - Veracidade foi determinada por meio de Ensaio Interlaboratoriais.

Para este método, em específico, não foram estudadas outras características de desempenho de validação, tais como o linear de deteção, a sensibilidade, a especificidade, a eficiência, a seletividade, a taxa de falsos positivos e a taxa de falsos negativos, dado não se aplicarem ao presente tipo de metodologia analítica.

3.4 Controlo de Qualidade

Para além dos estudos estatísticos, o controlo interno do laboratório é essencial para assegurar a fiabilidade e precisão dos resultados obtidos. Este processo envolve a implementação de procedimentos regulares, como a utilização de amostras de controlo com valores pré-determinados, a calibração contínua dos equipamentos e a validação de métodos analíticos, de modo a monitorizar e corrigir eventuais erros ao longo de todo o processo analítico, conforme mencionado na ISO 11133: 2014 [121].

O laboratório segue um procedimento interno de controlo de qualidade rigoroso, que inclui o controlo dos meios de cultura (produtividade, seletividade e esterilidade), do ambiente

laboratorial e das superfícies de trabalho, bem como da temperatura das estufas e dos frigoríficos. As temperaturas destes equipamentos são registadas diariamente, são realizadas análises ao ambiente do laboratório semanalmente para prevenir contaminações pelo ar, e mensalmente são efetuadas análises às superfícies de trabalho. Além disso, sempre que chega um novo lote de meios de cultura, ou pelo menos uma vez por mês, são realizados testes de produtividade, seletividade e esterilidade dos meios.

O estudo da produtividade do meio Malte Agar foi realizado através da inoculação de placas deste meio e dos meios de referência para cada estirpe. Inoculou-se uma placa de meio Malte agar e de TSA com 0,2 ml de solução da estirpe de *Candida albicans* (para o estudo de fungos leveduriformes), e inoculou-se uma placa de meio Malte agar e do meio Rosa de Bengala com 0,2 ml de uma solução da estirpe *Aspergillus brasiliensis* (para fungos filamentosos). As soluções inoculadas foram previamente preparadas a partir de lentículas liofilizadas das respetivas estirpes. Após 5 dias de incubação a 27,5 °C, foram contadas as colónias e a produtividade calculada através da divisão do número de colónias de *Candida albicans* e *Aspergillus brasiliensis* no Malte Agar pelo número de colónias nos respetivos meios de referência. O meio foi considerado produtivo quando os valores obtidos se situaram entre 0,5 e 1,40, ou seja, entre 50% e 140%. A seletividade do Malte Agar foi avaliada através da incubação de placas inoculadas com *E. coli*, de forma a verificar a capacidade do meio para inibir o crescimento bacteriano. Já a esterilidade foi verificada em placas incubadas sem inóculo. Adicionalmente, foi realizado um estudo de esterilidade da água utilizada, através da inoculação de 0,2 mL de água esterilizada em placas de Malte Agar, sendo que não deveria haver crescimento após 5 dias de incubação a 27,5 °C.

O estudo da produtividade do Mycosel Agar foi semelhante, utilizando *Candida albicans* (para o estudo de fungos patogénicos leveduriformes) e *Trichophyton interdigitalis* (para o estudo de fungos patogénicos filamentosos) como estirpes de teste, e o TSA como meio de referência para ambas as estirpes. As placas foram incubadas durante 21 dias a 27,5 °C. Após esse período, foi calculada a produtividade dividindo o número de colónias de *Candida albicans* e *Trichophyton interdigitalis* no Mycosel Agar pelo número de colónias no meio de referência, sendo também considerado produtivo quando os valores estiveram entre 0,5 e 1,40. A seletividade do Mycosel Agar foi testada com *E. coli* e *Aspergillus brasiliensis*, de modo a garantir que o meio inibia o crescimento de bactérias e fungos saprófitos filamentosos. A esterilidade foi igualmente confirmada com placas sem inóculo e o estudo da água foi realizado da mesma forma que no Malte Agar.

Para o controlo ambiental, foram colocadas placas de gelose viradas para cima e abertas em cima de cada bancada e dentro da estufa, durante 15 minutos e uma placa da mesma forma dentro da câmara de fluxo laminar durante 30 min. Depois estão foram incubadas numa estufa a 30 °C durante 3 dias. Após a incubação foram feitas e registadas as contagens de bactérias e fungos em cada placa de gelose.

Já para o controlo de superfícies foram usadas umas placas de contacto de gelose, adaptadas num equipamento. Pressionou-se uma placa de gelose de contacto sobre cada bancada de trabalho 5 vezes durante 10 segundos cada vez, em seguida inoculou-se durante 3 dias na estufa a 30 °C e leu-se e registou-se as contagens de bactérias e fungos.

4 Resultados e Discussão

4.1 Gama de trabalho

Num laboratório de microbiologia acreditado, o valor "0" não é utilizado como resultado para a quantificação de microrganismos. Quando não se observam colónias, o resultado é geralmente dado como "inferior ao limite de deteção", por isso foi definido como limite inferior de quantificação do método o valor de 5 UFC/g, tendo por base que, o mínimo quantificável por placa de malte agar é de 1 colónia, ou seja, convertendo para UFC/g confere um valor de 5 UFC/g (conversão de UFC por 0,2 mililitro para UFC por mililitro = UFC por grama). Quando não se observam colónias nas placas, o resultado fornecido ao cliente não será 0 UFC/g, mas sim < 5 UFC/g.

Para o limite superior de quantificação do método, foi considerado o valor de 150.000 UFC/g. Este valor baseia-se no facto de que o número máximo de colónias quantificáveis numa placa de Malte agar é de 300 UFC por 0,2 mililitros. Para converter este valor em mililitros, o que neste caso equivale a 1 grama, multiplica-se por 5, obtendo-se 1.500 UFC/g. Como a diluição máxima feita foi 1/100, multiplica-se ainda pelo fator de diluição 100, resultando num valor final de $1,5 \times 10^5$ UFC/g.

4.2 Incerteza

A incerteza foi avaliada em três níveis - Incerteza da Contagem, Incerteza Analítica, Incerteza de Medição (sendo esta a soma da Incerteza Analítica e da Incerteza da Amostragem), conforme descrito nas normas ISO 29201:2012 [15], Guia Relacre 29 [122] e Guia Eurachem/CITAC - Incerteza de medição resultante da amostragem: um guia para métodos e abordagens [123].

4.2.1 Incerteza de Medição (determinação Analítica + Colheita)

A incerteza de medição traduz o conjunto de toda a cadeia de medição e rastreabilidade desde o ato da colheita até à finalização do ensaio.

Para estimativa da incerteza de medição foram colecionados um conjunto de resultados de duplicados analíticos de amostras colhidas pela área de Amostragem do laboratório. Cada amostra foi colhida em duplicado no ato da amostragem e posteriormente ensaiada no laboratório da AEdP por uma Técnica Analista, neste caso a autora (CB), produzindo os resultados a seguir apresentados na folha de calculo (Figura 12).

Nº da Amostra	Data	Técnica Analista	Resultados				Variância de reprodutibilidade (u^2_R)	Variância da distribuição (u^2_d)		Variância operacional (u^2_o)	u^2_o Medição (Amostragem+Analítica)
			n_{ci} (amostra)	n_{cz} (Dup. Amostragem)	Lg n_{ci}	Lg n_{cz}		média ($n_{ci} - n_{cz}$)	$(0,1886)/n_{ci}$		
1	15/03/2024	CB	42	60	1,6232	1,7782	0,0120	51	0,0037	0,0083	0,0100
2	03/05/2024	CB	180	152	2,2553	2,1818	0,0027	166	0,0011	0,0016	0,0019
3	08/05/2024	CB	70	67	1,8451	1,8261	0,0002	69	0,0028	-0,0026	-0,0031
4	15/05/2024	CB	214	284	2,3304	2,4533	0,0076	249	0,0008	0,0068	0,0082
5	29/05/2024	CB	684	600	2,8351	2,7782	0,0016	642	0,0003	0,0013	0,0016
6	12/06/2024	CB	584	234	2,7664	2,3692	0,0789	409	0,0005	0,0784	0,0941
7	26/06/2024	CB	450	317	2,6532	2,5011	0,0116	384	0,0005	0,0111	0,0133
8	31/07/2024	CB	90	95	1,9542	1,9777	0,0003	93	0,0020	-0,0018	-0,0021
9	01/08/2024	CB	75	45	1,8751	1,6532	0,0246	60	0,0031	0,0215	0,0258
10	02/08/2024	CB	570	595	2,7559	2,7745	0,0002	583	0,0003	-0,0002	-0,0002
MÉDIAS							0,0140		0,0015	0,0124	0,0149

Variância da distribuição (variância intrínseca)	u^2_d	0,0015	
Variância da distribuição relativa (variância intrínseca relativa)	$u^2_{d,rel}$	0,0080	($u^2_d \cdot 5,3019$) conversão em escala logarítmica natural
Incerteza intrínseca	u_d	0,0389	
Incerteza intrínseca relativa	$u_{d,rel}$	9%	
Variância Operacional da Medição	u^2_o	0,0149	
Variância operacional relativa	$u^2_{o,rel}$	0,0792	($u^2_o \cdot 5,3019$) conversão em escala logarítmica natural
Incerteza operacional	u_o	0,1222	
Incerteza operacional relativa	$u_{o,rel}$	28%	

Para calcular a incerteza combinada de um novo resultado $u_c(y)$:

Incerteza combinada de um novo resultado	
Resultado (n_z)	$u_c(y)$
Ex: 200	0,1260

$$\text{Resultado Inferior a 10 ufc } u_{c(lg)} = \sqrt{\frac{0,1886}{n_z}}$$

$$\text{Resultado Superior a 10 ufc } u_{c(lg)} = \sqrt{\frac{0,1886}{n_z} + u_{o(lg)}^2}$$

Incerteza combinada relativa do resultado $u_c(y)$	29%
Incerteza combinada relativa expandida	58%

Figura 12 - Folha de calculo da incerteza de medição de acordo com a ISO 29201: 2012

Verifica-se que a incerteza expandida da medição, a que no futuro é dada ao cliente como incerteza do método de ensaio, é de 58%, e que a incerteza de medição é de 29%, considerando-se adequada ao uso já que não existem especificações de incertezas típicas de foro legal, normativo ou de especificações de clientes e pelo facto de estar enquadrada dentro dos valores normais de incertezas de medição dos outros métodos de microbiologia.

Para dar consistência estatística às conclusões do presente estudo, consideramos que será desejável aumentar a população de dados neste estudo em específico.

4.2.2 Incerteza Analítica

Para estimativa da incerteza analítica foram colecionados um conjunto de resultados de duplicados analíticos de amostras colhidas pela área de Amostragem do laboratório. Cada amostra colhida foi rececionada, posteriormente duplicada no laboratório e ensaiadas por 3 Técnicas Analistas (a autora (CB) e as Técnicas Analistas do laboratório da AEdP (FC) e (CP)) em paralelo, produzindo os resultados a seguir apresentados na Figura 13.

Nº da Amostra	Data	Técnico Analista (c1)	Técnico Analista (c2)	Resultados				Variação de reprodutibilidade (u^2_R)	Variação da distribuição (u^2_d)		Variação operacional (u^2_o)
				n_{c1}	n_{c2}	Lg n_{c1}	Lg n_{c2}	$(Lg\ n_{c1}-Lg\ n_{c2})^2/2$	média ($n_{c1}: n_{c2}$)	$(0,1886)/n_{ci}$	$(u^2_R-u^2_d)$
1	12/06/2024	CB	FC	12	14	1,0792	1,1461	0,0022	13	0,0145	-0,0123
2	13/06/2024	CB	FC	122	100	2,0864	2,0000	0,0037	111	0,0017	0,0020
3	13/06/2024	FC	CP	122	129	2,0864	2,1106	0,0003	126	0,0015	-0,0012
4	13/06/2024	CP	CB	125	99	2,0969	1,9956	0,0051	112	0,0017	0,0034
5	10/07/2024	CB	FC	445	400	2,6484	2,6021	0,0011	423	0,0004	0,0006
6	15/07/2024	CP	CB	120	105	2,0792	2,0212	0,0017	113	0,0017	0,0000
7	15/07/2024	CB	FC	120	135	2,0792	2,1303	0,0013	128	0,0015	-0,0002
8	15/07/2024	FC	CP	145	160	2,1614	2,2041	0,0009	153	0,0012	-0,0003
9	16/07/2024	FC	CB	425	435	2,6284	2,6385	0,0001	430	0,0004	-0,0004
10	17/07/2024	CP	FC	102	96	2,0086	1,9823	0,0003	99	0,0019	-0,0016
11	17/07/2024	FC	CB	119	102	2,0755	2,0086	0,0022	111	0,0017	0,0005
12	17/07/2024	CP	CB	111	99	2,0453	1,9956	0,0012	105	0,0018	-0,0006
13	18/07/2024	CP	FC	260	220	2,4150	2,3424	0,0026	240	0,0008	0,0018
14	18/07/2024	FC	CB	210	200	2,3222	2,3010	0,0002	205	0,0009	-0,0007
15	18/07/2024	CP	CB	230	220	2,3617	2,3424	0,0002	225	0,0008	-0,0007
16	29/07/2024	CP	FC	370	390	2,5682	2,5911	0,0003	380	0,0005	-0,0002
17	29/07/2024	FC	CB	380	395	2,5798	2,5966	0,0001	388	0,0005	-0,0003
18	29/07/2024	CP	CB	395	390	2,5966	2,5911	0,0000	393	0,0005	-0,0005
19	31/07/2024	CP	FC	215	240	2,3324	2,3802	0,0011	228	0,0008	0,0003
20	31/07/2024	FC	CB	240	230	2,3802	2,3617	0,0002	235	0,0008	-0,0006
21	31/07/2024	CP	CB	215	230	2,3324	2,3617	0,0004	223	0,0008	-0,0004
22	01/08/2024	CP	FC	75	60	1,8751	1,7782	0,0047	68	0,0028	0,0019
23	01/08/2024	FC	CB	55	75	1,7404	1,8751	0,0091	65	0,0029	0,0062
24	01/08/2024	CP	CB	80	75	1,9031	1,8751	0,0004	78	0,0024	-0,0020
25	02/08/2024	CP	FC	520	585	2,7160	2,7672	0,0013	553	0,0003	0,0010
26	02/08/2024	FC	CB	520	570	2,7160	2,7559	0,0008	545	0,0003	0,0004
27	02/08/2024	CP	CB	425	495	2,6284	2,6946	0,0022	460	0,0004	0,0018
28	05/08/2024	CP	FC	220	200	2,3424	2,3010	0,0009	210	0,0009	0,0000
29	05/08/2024	FC	CB	230	210	2,3617	2,3222	0,0008	220	0,0009	-0,0001
30	05/08/2024	CP	CB	210	260	2,3222	2,4150	0,0043	235	0,0008	0,0035
MÉDIAS								0,0017		0,0016	0,0000

Variação da distribuição (variância intrínseca)	u^2_d	0,0016
Variação da distribuição relativa (variância intrínseca relativa)	$u^2_{d,rel}$	0,0085 ($u^2_d \cdot 5,3019$) conversão em escala logarítmica natural
Incerteza intrínseca	u_d	0,0401
Incerteza intrínseca relativa	$u_{d,rel}$	9%
Variação Operacional da Medição	u^2_o	0,0000
Variação operacional relativa	$u^2_{o,rel}$	0,0003 ($u^2_o \cdot 5,3019$) conversão em escala logarítmica natural
Incerteza operacional	u_o	0,0070
Incerteza operacional relativa	$u_{o,rel}$	2%

Para calcular a incerteza combinada de um novo resultado $u_c(y)$:

Incerteza combinada de um novo resultado	
Resultado (n_z)	$u_c(y)$
Ex: 200	0,0315

$$\text{Resultado Inferior a 10 ufc } u_{c(lg)} = \sqrt{\frac{0,1886}{n_z}}$$

$$\text{Resultado Superior a 10 ufc } u_{c(lg)} = \sqrt{\frac{0,1886}{n_z} + u_{o(lg)}^2}$$

Incerteza combinada relativa do resultado $u_c(y)$ **7%**

Incerteza combinada relativa expandida **15%**

Figura 13 - Folha de calculo da Incerteza analítica de acordo com a ISO 29201: 2012

Não existem especificações normativas, legais ou exigidas pelos clientes ou de outras fontes, para a incerteza-alvo analítica máxima admissível para este método de ensaio e tipo de matriz das amostras ensaiadas e objeto dos estudos de validação. Na ausência de tais especificações e tendo por base a validação experimental da incerteza estimada, verifica-se que a Incerteza combinada analítica de 7% é largamente inferior á incerteza da Medição (29%), revelando-se adequada ao uso.

4.2.3 Incerteza da Contagem

De acordo com a norma internacional ISO 13843: 2017, a incerteza da contagem exprime a dispersão de resultados de contagem e foi estudada através da contagem repetida das colónias das mesmas placas num curto espaço de tempo. As observações sobre a incerteza da contagem darão a primeira impressão de potenciais problemas com a ampla utilização do método.

De acordo com a norma ISO 29201, avaliar-se-á a repetibilidade e a reprodutibilidade intralaboratorial da contagem, ou seja, devem avaliar-se estimativas numéricas individuais ou coletivas da incerteza de contagem expressas como desvio-padrão relativo.

O laboratório iniciou o estudo da incerteza da contagem de acordo com a metodologia sugerida na ISO 29201, para tal as 3 Técnicas Analistas (a autora e duas técnicas do laboratório da AEdP) efetuaram a contagem das várias placas, de forma a calcular a média (m), o desvio padrão (s) e a variância relativa ($u^2=s/m$) de cada contagem, tendo-se determinado a Incerteza da contagem de 6%, conforme cálculos em seguida apresentados na Figura 14.

Placa	Técnica Analista CB	Técnica Analista FC	Técnica Analista CP	m	s	μ rel, L	μ^2 rel, L
1	9	10	9	9	0,58	0,062	0,004
2	15	14	14	14	0,58	0,040	0,002
3	35	33	37	35	2,00	0,057	0,003
4	26	26	27	26	0,58	0,022	0,000
5	21	20	22	21	1,00	0,048	0,002
6	22	22	21	22	0,58	0,027	0,001
7	23	23	22	23	0,58	0,025	0,001
8	28	24	26	26	2,00	0,077	0,006
9	22	20	21	21	1,00	0,048	0,002
10	27	26	27	27	0,58	0,022	0,000
11	37	33	33	34	2,31	0,067	0,005
12	37	29	29	32	4,62	0,146	0,021
13	23	17	18	19	3,21	0,166	0,028
14	27	23	23	24	2,31	0,095	0,009
15	31	30	25	29	3,21	0,112	0,013
16	35	34	31	33	2,08	0,062	0,004
17	66	66	67	66	0,58	0,009	0,000
18	70	71	69	70	1,00	0,014	0,000
19	71	72	70	71	1,00	0,014	0,000
20	65	64	65	65	0,58	0,009	0,000
21	55	52	57	55	2,52	0,046	0,002
22	40	39	41	40	1,00	0,025	0,001
23	22	22	21	22	0,58	0,027	0,001
24	30	31	32	31	1,00	0,032	0,001
25	35	34	35	35	0,58	0,017	0,000
26	27	25	26	26	1,00	0,038	0,001
27	37	35	36	36	1,00	0,028	0,001
28	26	26	25	26	0,58	0,022	0,001
29	28	27	28	28	0,58	0,021	0,000
30	45	44	44	44	0,58	0,013	0,000
soma							0,109

m (μ^2 rel, L)	RaizQ (m (μ^2 rel, L))	Incerteza da contagem
0,004	0,060	6,0%

Figura 14 - Folha de Excel com a contagem de cada Técnica Analista (CB, FC e CP), cálculo e resultado do valor da incerteza de contagem intralaboratorial.

Não existem especificações normativas, legais ou exigidas pelos Clientes ou de outras fontes, para a incerteza-alvo de Contagem máxima admissível para este método de ensaio e tipo de matriz das amostras ensaiadas e objeto dos estudos de validação. Na ausência de tais especificações e tendo por base a validação experimental da incerteza estimada, verifica-se que a incerteza combinada de contagem intralaboratorial de 6% é largamente inferior à incerteza da Medição (29%), revelando-se adequada ao uso.

4.3 Precisão

A precisão foi estudada a partir do estudo da repetibilidade e do critério de precisão.

4.3.1 Repetibilidade

A estudo da repetibilidade do método, foi avaliada com base na análise de 10 replicados da mesma da amostra, em condições de repetibilidade, isto é, o mesmo técnico, no mesmo dia, na mesma estufa e na mesmo intervalo de tempo. Foram efetuadas 3 séries de 10 replicados de uma amostra de areia. Calculou-se para cada série a média, a variância, a variância operacional relativa e a repetibilidade para cada Técnica Analista. Este cálculo foi realizado por duas Técnicas Analistas, a autora (CB) e a Técnica Analista do laboratório da AEdP (FC), os resultados estão expressos nas Figuras 15 e 16.

Repetibilidade Areias - Detecção e Contagem de fungos totais (Técnica Analista CB)						
Replicas	Amostra 1 (12/06/2024)		Amostra 2 (10/07/2024)		Amostra 3 (15/07/2024)	
	UFC/g	χ^2	UFC/g	χ^2	UFC/g	χ^2
1	5	25	385	148225	185	34225
2	12	144	465	216225	160	25600
3	9	81	365	133225	140	19600
4	9	81	395	156025	155	24025
5	4	16	395	156025	115	13225
6	9	81	305	93025	210	44100
7	7	49	380	144400	120	14400
8	10	100	445	198025	185	34225
9	12	144	390	152100	175	30625
10	5	25	370	136900	170	28900
Média	8,2		389,5		161,5	
SD	2,859681412		43,55392571		30,00463	
Var	8,177777778		1896,944444		900,2778	
N	10		10		10	
Dis.Pois	8,975609756		43,83183569		50,17028	
Vorel	-0,00033049		0,009936339		0,028325	
Desempenho do Método (Repetibilidade)	2%		10%		17%	

Média (Vor)	0,012643591
Desempenho do Método (Repetibilidade)	11%

Figura 15 - Folha de Calculo da Repetibilidade do método de Detecção e Contagem de fungos totais em areia feita pela Técnica Analista CB (autora)

Repetibilidade Areias - Detecção e Contagem de fungos totais (Técnica Analista FC)						
Replicas	Amostra 1 (12/06/2024)		Amostra 2 (10/07/2024)		Amostra 3 (15/07/2024)	
	UFC/g	χ^2	UFC/g	χ^2	UFC/g	χ^2
1	7	49	440	193600	190	36100
2	10	100	455	207025	165	27225
3	9	81	450	202500	135	18225
4	12	144	440	193600	140	19600
5	9	81	470	220900	205	42025
6	15	225	475	225625	115	13225
7	15	225	305	93025	170	28900
8	10	100	400	160000	135	18225
9	14	196	335	112225	135	18225
10	9	81	380	144400	145	21025
Média	11		415		153,5	
SD	2,828427125		58,357138		28,19082	
Var	8		3405,555556		794,7222	
N	10		10		10	
Dis.Pois	6,545454545		73,85542169		46,59609	
Vorel	-0,02479339		0,017364236		0,027214	
Desempenho do Método (Repetibilidade)	16%		13%		16%	
Média (Vor)	0,006594937					
Desempenho do Método (Repetibilidade)	8%					

Figura 16 - Folha de Calculo da Repetibilidade do método de Detecção e Contagem de fungos totais em areia feita pela Técnica Analista FC

Não existem especificações normativas, legais ou exigidas pelos Clientes ou de outras fontes, para a repetibilidade máxima admissível para este método de ensaio e tipo de matriz das amostras ensaiadas e objeto dos estudos de validação. O desempenho da Técnica Analista FC e da Técnica Analista CB (autora) é de 8 % e 11%, respetivamente. Na ausência de especificações e face aos resultados obtidos verifica que estes resultados de repetibilidade são inferiores ao da incerteza combinada de medição (29%), pelo que se considera que as técnicas estão aptas para a realização do método de ensaio e o método é considerado adequado ao uso em relação a este parâmetro caracterizador de desempenho de validação.

4.3.2 Critério de precisão

O critério de precisão do método foi avaliado a partir da dispersão de resultados obtidos através da replicação de ensaios em duplicado sobre as mesmas amostras, ao longo do tempo e por diferentes Técnicas Analistas, isto é, em condições de Precisão Intermédia, de forma a introduzir o máximo de variabilidade nos resultados recolhidos e tratados (Figura 17).

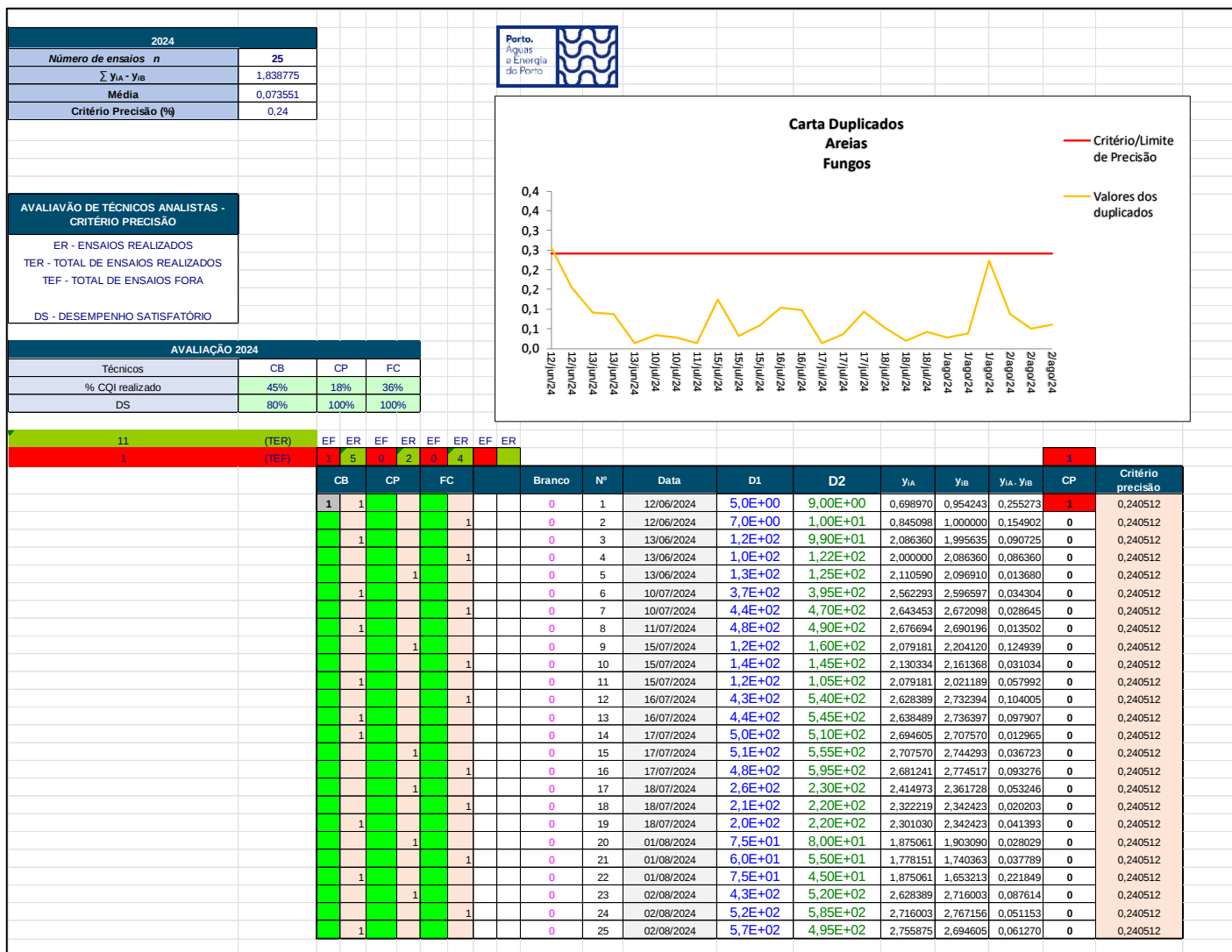


Figura 17 - Folha de cálculo do critério de precisão, a partir da Carta de Duplicados

Não existem especificações normativas, legais ou exigidas pelos Clientes ou de outras fontes, para a Precisão intermédia máxima admissível para este método de ensaio e tipo de matriz das amostras ensaiadas e objeto dos estudos de validação. Na ausência de especificações e face aos resultados obtidos, verifica-se que o critério de Precisão de 25% é inferior à incerteza da Medição (29%), revelando-se adequada ao uso.

4.4 Veracidade

Para a validação da Veracidade de um método é necessário fazer pelo menos 1 ensaio interlaboratorial.

Foi realizado um ensaio interlaboratorial organizado e coordenado pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA). Este ensaio estava inicialmente previsto para maio, contudo, só foi enviado em agosto, sendo que os resultados só foram disponibilizados em outubro.

O resultado obtido neste ensaio interlaboratorial foi de classificação – Bom, o que comprova a veracidade do método em estudo, visto que para um método ser verdadeiro bastava ter uma classificação, de no mínimo, Suficiente.

Esta classificação demonstra que o resultado fornecido pelo laboratório da AEdP estava muito próximo do valor referência/real da amostra disponibilizada pelo EIL.

4.5 Controlo Interno

De forma a assegurar a fiabilidade dos resultados obtidos, foram feitos o controlo dos meios de cultura (produtividade, seletividade e esterilidade) e também esterilidade da água estéril utilizada (Tabelas 3, 4, 4 e 6), do ambiente laboratorial (Tabela 7) e das superfícies/bancadas de trabalho (Tabela 8), bem como da temperatura da estufa e do frigorífico (Tabela 9) utilizados no método em causa.

4.5.1 Produtividade, Seletividade, Esterilidade dos meios e Esterilidade da água

Tabela 3 - Tabela como calculo e resultado da produtividade do meio Malte Agar

Produtividade						
Data	Estirpe	Meio Cultura (No)	Meio Referência para <i>C. Albicans</i> (Ns)	Meio Referência para <i>Aspergillus brasiliensis</i> (Ns)	Valor da Produtividade	
		Malte Agar	TSA	Rosa de Bengala	N _o /N _s	%
10/07/24	<i>Candida Albicans</i>	12	10		1,200	120
	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	37		58	0,638	64
17/07/24	<i>Candida Albicans</i>	14	16		0,875	88
	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	13		11	1,182	118
26/07/24	<i>Candida Albicans</i>	18	20		0,900	90
	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	17		13	1,308	131
07/08/24	<i>Candida Albicans</i>	19	23		0,826	83
	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	23		24	0,958	96

Tabela 4 - Tabela com a seletividade, esterilidade e branco do meio Mycosel Agar

	Selectividade		Esterilidade		Branco
Data	<i>E.Coli</i>		Incubação s/inoculo		H2O
10/07/24	0		0		0
17/07/24	0		0		0
26/07/24	0		0		0
07/08/2024	0		0		0

Após a análise da tabela 3, é possível concluir que o meio Malte agar teve uma boa produtividade tanto para a estirpe *Candida Albicans*, como para a estirpe *Aspergillus brasiliensis*, visto que todos estão dentro do valor da produtividade em percentagem tem de ser $\geq 50\%$ e $<140\%$.

Da análise da tabela 4, podemos verificar que o meio mostrou ser altamente seletivo, inibindo completamente o crescimento de bactérias contaminantes como *E. coli*, não houve crescimento sem inóculo, indicando que as condições de esterilidade foram mantidas e o

controlo com água esterilizada foi eficaz, sem contaminação observada. Isso confirma que a água utilizada no experimento estava devidamente esterilizada e não houve interferência no crescimento das colónias.

Tabela 5 - Tabela como calculo e resultado da produtividade do meio Mycosel Agar

Produtividade					
Data	Estirpe	Meio Cultura (No)	Meio Referência (Ns)	Valor da Produtividade	
		Mycosel Agar	TSA	N _o /N _s	%
17/07/24	<i>Candida Albicans</i>	11	16	0,688	69
	<i>Trichophyton interdigitalis</i>	48	40	1,200	120
26/07/24	<i>Candida Albicans</i>	14	20	0,700	70
	<i>Trichophyton interdigitalis</i>	48	67	0,716	72

Tabela 6 - Tabela com a seletividade, esterilidade e branco do meio Mycosel Agar

Data	Selectividade			Esterilidade		Branco
	<i>E.Coli</i>	<i>Aspergillus brasiliensis</i>		Incubação s/inoculo		H2O
17/07/24	0	0		0		0
26/07/24	0	0		0		0

Após a análise da tabela 5, é possível concluir que o meio Mycosel agar teve uma boa produtividade tanto para a estirpe *Candida Albicans*, como para a estirpe *Trichophyton*, visto que todos estão dentro do valor da produtividade em percentagem tem de ser $\geq 50\%$ e $<140\%$.

Da análise da tabela 6, podemos verificar que o meio mostrou-se altamente seletivo, inibindo completamente o crescimento de bactérias contaminantes como *E. coli* e fungos saprófitos como o *Aspergillus brasiliensis*, não houve crescimento sem inóculo, indicando que as condições de esterilidade foram mantidas e o controlo com água esterilizada foi eficaz,

sem contaminação observada. Isso confirma que a água utilizada no experimento estava devidamente esterilizada e não houve interferência no crescimento das colónias.

4.5.2 Controlo do ambiente e superfícies

Para o controlo ambiental, foram colocadas placas de gelose viradas para cima e abertas em cima de cada bancada e dentro da estufa, durante 15 minutos e uma placa da mesma forma dentro da câmara de fluxo laminar durante 30 min. Depois estão foram incubadas numa estufa a 30 °C durante 3 dias. Após a incubação foram feitas e registadas as contagens de bactérias e fungos em cada placa de gelose (Tabela 7).

Tabela 7 - Resultados do controlo ambiental da sala dos fungos. Os números acompanhados de um “F” indicam as unidades formadoras de colónias (UFC) de fungos contadas na placa de gelose, enquanto os números sem letra correspondem às UFC de bactérias

Data	Hora	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Data da leitura
		Sala de Fungos Bancada direita	Sala de Fungos Bancada esquerda	Sala Fungos Câmara Fluxo Lam.	Sala Fungos Estufa	
11/03/2024	10:00	0	0	0	0	14/03/2024
18/03/2024	10:00	0	0	0	0	21/03/2024
25/03/2024	9:00	1F	1	0	0	28/03/2024
05/04/2024	10:00	0	0	0	0	08/04/2024
08/04/2024	9:30	1F	1	0	0	11/04/2024
15/04/2024	9:00	0	1	0	0	18/04/2024
22/04/2024	10:00	0	0	0	0	25/04/2024
29/04/2024	9:30	0	1F	0	0	02/05/2024
06/05/2024	10:00	0	0	0	0	09/05/2024
13/05/2024	10:00	1F	1	0	0	16/05/2024
20/05/2024	9:30	0	0	0	0	23/05/2024
27/05/2024	9:30	1F	0	0	0	31/05/2024
03/06/2024	10:00	2+1F	0	0	0	06/06/2024
17/06/2024	9:30	2F	2F	0	0	20/06/2024
25/06/2024	10:30	0	2	0	0	28/06/2024
01/07/2024	10:00	1	2F	0	0	04/07/2024
08/07/2024	9:30	0	1F	0	0	11/07/2024
16/07/2024	10:30	1F	0	0	0	19/07/2024
22/07/2024	9:30	0	0	0	0	25/07/2024
29/07/2024	10:30	0	1	1	0	01/08/2024
05/08/2024	10:00	1F	0	0	0	08/08/2024
13/08/2024	10:30	3	1	0	0	16/08/2024
19/08/2024	9:30	0	0	0	0	22/08/2024
26/08/2024	10:00	1+1F	3+1F	0	0	29/08/2024

Com base na informação da tabela 7, podemos concluir que a qualidade do ambiente da sala de fungos, embora apresente variações sazonais, está dentro dos parâmetros considerados normais quando comparada com os dados dos últimos anos do laboratório. Apesar de haver flutuações nas contagens de UFCs de bactérias e fungos, esses valores permanecem dentro de um intervalo esperado para este tipo de ambiente controlado. As áreas como a câmara de fluxo laminar e a estufa demonstram uma boa eficácia no controlo de contaminação, enquanto as bancadas (Placas 1 e 2) apresentam ligeiros aumentos, que podem ser geridos com procedimentos regulares de higienização e monitorização.

Já para o controlo de superfícies foram usadas umas placas de contacto de gelose, adaptadas num equipamento. Pressionou-se uma placa de gelose de contacto sobre cada bancada de trabalho 5 vezes durante 10 segundos cada vez, em seguida inoculou-se durante 3 dias na estufa a 30 °C e leu-se e registou-se as contagens de bactérias e fungos (Tabela 8).

Tabela 8 - Tabela com os resultados do controlo de superfícies das bancadas da sala de fungos. Os números apresentados são a contagens de UFC de bactérias em cada placa de gelose de contacto

Data	Hora	Placa 1	Placa 2	Data da Leitura
		Sala de Fungos	Sala de Fungos	
		Bancada direita	Bancada esquerda	
15/01/2024	10:00	0	0	18/01/2024
05/02/2024	9:30	0	0	08/02/2024
05/03/2024	10:00	0	0	08/03/2024
05/04/2024	10:00	1	1	08/04/2024
06/05/2024	10:00	0	0	09/05/2024
25/06/2024	10:30	0	0	28/06/2024
01/07/2024	10:00	0	0	04/07/2024
13/08/2024	10:00	0	0	16/08/2024

A Tabela 8 demonstra que, ao longo de oito meses, só foram detetadas 1 UFC de bactéria em cada bancada no mês de abril e nos restantes 7 meses não foram detetadas mais nenhuma UFC de bactéria nas superfícies das bancadas da sala de fungos, o que indica um elevado nível de controlo da esterilidade. Estes resultados evidenciam que os procedimentos de higienização e desinfeção implementados são eficazes, garantindo a manutenção de um ambiente adequado para a realização das análises microbiológicas, sem risco de contaminação cruzada. Desta forma, assegura-se a fiabilidade dos ensaios realizados na sala de fungos ao longo do período estudado.

4.5.3 Controlo da temperatura da estufa e do frigorífico

Foram registadas diariamente as temperaturas da estufa e do frigorífico (Tabela 9).

Tabela 9 – Registo diário das temperaturas da estufa e do frigorífico/freezer

DATA	Temperatura da estufa (°C)	Temperatura do frigorífico/freezer (°C)	Continuação	DATA	Temperatura da estufa (°C)	Temperatura do frigorífico/freezer (°C)
11/03/2024	27,5	4,3/-20,0		20/05/2024	27,7	4,7/-20,0
12/03/2024	27,5	4,4/-20,0		21/05/2024	27,4	4,9/-20,0
13/03/2024	27,7	4,2/-20,0		22/05/2024	27,6	5,0/-20,0
14/03/2024	27,5	4,2/-20,0		23/05/2024	27,6	4,9/-19,8
15/03/2024	27,5	4,1/-20,0		24/05/2024	27,7	4,7/-20,0
18/03/2024	27,5	4,7/-20,0		27/05/2024	27,5	5,3/-19,8
19/03/2024	27,5	4,3/-21,0		28/05/2024	27,6	5,3/-20,0
20/03/2024	27,5	4,1/-21,0		29/05/2024	27,6	5,1/-20,0
21/03/2024	27,5	5,4/-21,0		31/05/2024	27,5	4,9/-20,0
22/03/2024	27,7	5,3/-20,0		03/06/2024	27,4	4,5/-20,0
25/03/2024	27,7	5,1/-20,0		04/06/2024	27,5	5,7/-19,8
26/03/2024	27,7	5,2/-21,0		05/06/2024	27,7	5,0/-20,0
27/03/2024	27,7	4,8/-20,0		06/06/2024	27,7	5,1/-19,9
28/03/2024	27,7	4,4/-21,0		07/06/2024	27,7	4,9/-20,0
02/04/2024	27,5	5,1/-20,0		11/06/2024	27,5	5,0/-20,0
03/04/2024	27,5	5,3/-21,0		12/06/2024	27,5	4,7/-19,8
04/04/2024	27,5	4,6/-20,0		13/06/2024	27,7	4,9/-19,8
05/04/2024	27,5	4,3/-20,0		14/06/2024	27,7	4,5/-19,8
08/04/2024	27,5	4,4/-21,0		17/06/2024	27,5	4,7/-20,0
09/04/2024	27,5	4,5/-21,0		18/06/2024	27,5	4,5/-20,0
10/04/2024	27,5	4,4/-20,0		19/06/2024	27,5	4,6/-20,0
11/04/2024	27,5	4,4/-20,0		20/06/2024	27,5	4,5/-21,0
12/04/2024	27,6	4,9/-20,0		21/06/2024	27,5	4,7/-20,0
15/04/2024	27,5	4,5/-21,0		25/06/2024	27,5	5,0/-20,1
16/04/2024	27,6	4,3/-20,0		26/06/2024	27,5	5,3/-20,0
17/04/2024	27,6	4,5/-20,0		27/06/2024	27,3	4,5/-20,0
18/04/2024	27,6	4,4/-20,0		28/06/2024	27,5	5,0/-19,9
19/04/2024	27,6	4,8/-20,0		01/07/2024	27,4	5,0/-19,9
22/04/2024	27,6	4,4/-20,0		02/07/2024	27,4	5,1/-19,9
23/04/2024	27,6	4,5/-21,0		03/07/2024	27,5	5,0/-19,8
24/04/2024	27,6	4,5/-21,0		04/07/2024	27,5	4,8/-20,0
26/04/2024	27,6	4,5/-20,0		05/07/2024	27,3	4,6/-19,9
29/04/2024	27,5	4,6/-20,0		08/07/2024	27,4	5,0/-21,0
30/04/2024	27,5	4,4/-21,0		09/07/2024	27,5	4,6/-19,9
02/05/2024	27,5	4,6/-21,0		10/07/2024	27,5	5,0/-21,0
03/05/2024	27,5	4,5/-21,0		11/07/2024	27,5	5,0/-19,9
06/05/2024	27,5	4,5/-21,0		12/07/2024	27,4	5,0/-21,0
07/05/2024	27,5	4,6/-20,0		15/07/2024	27,5	5,0/-19,9
08/05/2024	27,5	4,4/-20,0		16/07/2024	27,7	5,4/-20,0
09/05/2024	27,5	4,5/-19,9		17/07/2024	27,5	4,4/-20,0
10/05/2024	27,5	4,5/-20,0		18/07/2024	27,7	4,7/-20,0
11/05/2024	27,5	4,5/-20,0		19/07/2024	27,3	5,0/-20,0
12/05/2024	27,5	4,5/-21,0		22/07/2024	27,7	5,3/-20,0
13/05/2024	27,5	4,4/-19,9		23/07/2024	27,3	5,3/-20,0
14/05/2024	27,7	4,5/-20,0		24/07/2024	27,4	5,0/-21,0
15/05/2024	27,7	5,2/-19,8		25/07/2024	27,6	4,8/-20,0
16/05/2024	27,5	4,7/-19,9		26/07/2024	27,8	5,4/-20,0
17/05/2024	27,6	4,7/-20,0		29/07/2024	27,7	5,2/-20,0
18/05/2024	27,7	4,6/-19,9		30/07/2024	27,5	5,3/-19,8
19/05/2024	27,7	4,4/-20,0		31/07/2024	27,5	4,8/-20,0

Com base nas observações da tabela 9 e nas faixas de temperatura estabelecidas, os resultados do controle de temperatura parecem estar dentro do esperado tanto para a estufa quanto para o frigorífico/freezer, com apenas pequenas variações que, na maioria dos casos, estão dentro das margens toleráveis. Essas condições, se mantidas, devem garantir a estabilidade das variáveis controladas no seu experimento.

4.6 Quantificação de Fungos em areias de diferentes praias

Apesar de o programa de monitorização da Associação Bandeira Azul exigir apenas o estudo de fungos totais nas areias das praias, considerámos pertinente incluir a análise de fungos patogénicos, visto que estes podem ser mais prejudiciais para a saúde humana, e a sua abundância pode não ser adequadamente avaliada ao estudar apenas os fungos totais.

Foram realizadas análises para determinar o número de UFC/g de fungos totais (filamentosos, leveduriformes e patogénicos) e foi feita a análise específica do número de UFC/g de fungos patogénicos para cada uma das praias analisadas. No total, foram analisadas 84 amostras, cada uma identificada pelo seu respetivo ID, gerado pelo laboratório. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 10 e nas Figuras 18 e 19, abaixo apresentadas.

Tabela 10 - Resultados obtidos das análises micológicas (Fungos Totais e Fungos Patogénicos) em areias de diferentes praias (A-G), incluindo as amostras de duplicados de amostragem (DA), em diferentes dias.

Data	ID da Amostra	Praia	Fungos Totais UFC/g	Fungos Patogénicos UFC/g
11/01/2024	2400318	F	0	0
11/01/2024	2400319	F DA	0	0
15/03/2024	2402448	B	42	34
15/03/2024	2402449	B DA	60	37
19/04/2024	2403733	A	52	14
19/04/2024	2403734	B	47	24
19/04/2024	2403735	C	9	0
19/04/2024	2403736	D	2	0
19/04/2024	2403737	E	17	12
19/04/2024	2403738	F	12	4
03/05/2024	2404112	A	64	45
03/05/2024	2404113	B	180	105
03/05/2024	2404114	B DA	152	289
03/05/2024	2404115	C	39	10
03/05/2024	2404116	D	60	20
03/05/2024	2404117	E	25	25
03/05/2024	2404118	F	62	15
03/05/2024	2404124	G	30	19
08/05/2014	2404282	A	147	120
08/05/2014	2404283	B	70	54
08/05/2014	2404284	B DA	67	55
08/05/2014	2404285	C	582	67
08/05/2014	2404286	D	5	4
08/05/2014	2404287	E	2	0
08/05/2014	2404288	F	60	37
08/05/2014	2404289	G	115	90
16/05/2024	2404702	A	94	60
16/05/2024	2404703	B	249	117
16/05/2024	2404704	B DA	214	112
16/05/2024	2404705	C	59	62
16/05/2024	2404706	D	74	39
16/05/2024	2404707	E	110	84
16/05/2024	2404708	F	82	105
16/05/2024	2404709	G	180	342
29/05/2024	2405259	A	80	50
29/05/2024	2405260	B	684	194
29/05/2024	2405261	B DA	600	174
29/05/2024	2405262	C	52	47
29/05/2024	2405263	D	57	25
29/05/2024	2405264	E	50	45
29/05/2024	2405265	F	617	175
05/06/2024	2405406	A	50	25
05/06/2024	2405407	B	17	12
05/06/2024	2405408	B DA	0	7
05/06/2024	2405409	C	9	4

05/06/2024	2405410	D	90	0
05/06/2024	2405411	E	10	7
05/06/2024	2405425	F	550	220
12/06/2024	2405678	A	550	105
12/06/2024	2405679	B	584	200
12/06/2024	2405680	B DA	234	60
12/06/2024	2405681	C	217	30
12/06/2024	2405682	D	17	0
12/06/2024	2405683	E	100	112
12/06/2024	2405684	F	100	27
12/06/2024	2405685	G	17	17
18/06/2024	2405955	A	284	122
18/06/2024	2405956	B	167	45
18/06/2024	2405957	C	72	5
18/06/2024	2405958	D	147	137
18/06/2024	2405959	E	132	57
18/06/2024	2405960	F	219	60
18/06/2024	2405961	G	92	45
18/06/2024	2405977	G DA	107	27
26/06/2024	2406214	A	14017	294
26/06/2024	2406215	B	450	117
26/06/2024	2406216	B DA	317	87
26/06/2024	2406217	C	24	14
26/06/2024	2406218	D	2	4
26/06/2024	2406219	E	25	12
26/06/2024	2406220	F	2	2
26/06/2024	2406221	G	9	0
23/07/2024	2407289	A	6500	150
23/07/2024	2407290	B	72	35
23/07/2024	2407292	C	122	85
23/07/2024	2407293	D	64	49
23/07/2024	2407294	E	49	72
30/07/2024	2407526	A	1050	75
30/07/2024	2407527	B	784	64
30/07/2024	2407528	C	55	19
30/07/2024	2407529	D	297	150
30/07/2024	2407530	E	105	65
30/07/2024	2407531	F	1150	29
30/07/2024	2407533	G	84	24

Nas amostras analisadas, observou-se uma ampla variação nos níveis de fungos totais e patogénicos. O valor mais elevado de fungos totais foi de 14.017 UFC/g, e o valor mais baixo foi de 0 UFC/g. Em relação aos fungos patogénicos, os níveis variaram entre 0 e 342 UFC/g.

A média de 405 UFC/g de fungos totais encontrada nas praias analisadas está significativamente acima da média de 27 UFC/g reportada para as praias de Norte a Sul de

Portugal em 2023 [124]. Este valor elevado, comparado com o valor de referência, sugere uma possível contaminação ou proliferação anormal de fungos nas praias estudadas.

É importante contextualizar que o valor limite estabelecido para uma praia estar em não conformidade é de 420 UFC/g, o que coloca a média obtida nas praias próximas deste limiar, gerando uma preocupação quanto à qualidade microbiológica das areias. Apesar disso, a média de 405 UFC/g foi fortemente influenciada por um pico extremo de 14017 UFC/g na amostra (2406214) da praia A. Esse valor pode ter sido extrapolado por algum fator, como a presença de resíduos orgânicos nas amostras, que podem ter proporcionado um ambiente propício para a proliferação massiva de fungos e não ser representativo de toda a areia dessa praia.

No início do período de análise, em 11/01/2024, ambas as amostras (2400318 e 2400319) apresentaram contagens de Fungos Totais e Fungos Patogénicos iguais a zero, sugerindo que as praias não estavam contaminadas por fungos naquele momento. Este resultado pode ser atribuído às condições climáticas típicas de janeiro, como as temperaturas mais baixas e a menor atividade nas praias, o que pode ter contribuído para a baixa ou inexistente proliferação de fungos nas areias. Alternativamente, é possível que a performance dos métodos analíticos utilizados nessa fase inicial ainda não estivesse totalmente otimizada, o que pode ter influenciado os resultados.

Os resultados obtidos neste estudo revelaram um aumento significativo da contaminação fúngica nos meses mais quentes, possivelmente devido às condições climáticas favoráveis, nomeadamente as temperaturas mais elevadas, que criam um ambiente propício ao crescimento de fungos. Durante o verão, a atividade nas praias também é mais intensa, com um maior número de banhistas, animais e aves, o que pode ter contribuído para a introdução e dispersão de fungos nas areias. Esta variação sazonal é visível nos dados, e com elevados picos de contagem de fungos a ocorrerem nos períodos de maior calor.

Estes resultados estão em concordância com estudos prévios, como o de Zheng et al. (2023), que demonstraram que os fungos saprófitos, responsáveis pela decomposição de matéria orgânica, registam um aumento substancial durante o verão devido à intensa atividade humana e às condições climáticas favoráveis. O estudo sugere que tanto os fatores sazonais como as atividades antropogénicas são determinantes na proliferação de fungos nas praias [125]



Figura 18 - Quantificação (UFC/g) de fungos totais (barras azuis) e de fungos patogénicos (barras rosa) em cada praia (A, B, C, D, E, E e G).

Os resultados obtidos na Figura 18 indicam que, na maioria das praias analisadas, as contagens de fungos totais (representadas pelas barras azuis) foram superiores às de fungos patogénicos (representadas pelas barras vermelhas), o que é biologicamente coerente, uma vez que os fungos patogénicos estão incluídos no grupo dos fungos totais. Esta tendência sugere que, apesar da presença comum de fungos nas areias das praias estudadas, nem todas as espécies presentes são patogénicas, refletindo uma possível variação natural na diversidade das espécies fúngicas, o que está coerente com o artigo de Novak Babič et al. (2022), que identificou uma elevada diversidade fúngica nas areias de praias da Eslovénia. No estudo, foram isoladas mais de 64 espécies, incluindo saprófitas e apenas algumas espécies com potencial patogénico, associados a infeções humanas oportunistas [126]. Este comportamento reforça que, embora haja uma abundância de fungos no ambiente costeiro, a maioria desempenha papéis ecológicos na decomposição de matéria orgânica e nem sempre está diretamente relacionada a riscos patogénicos para a saúde pública [125].

No entanto, em alguns casos, verificou-se que as contagens de Unidades Formadoras de Colónias por grama (UFC/g) de fungos patogénicos superaram as de fungos totais, o que é inconsistente do ponto de vista lógico. Estas discrepâncias podem ser explicadas por possíveis limitações associadas ao meio de cultura utilizado, o Mycosel Agar, que pode ter favorecido o crescimento de organismos não-patogénicos, no meio de cultura Mate Agar, que pode ter suprimido o crescimento de algumas espécies de fungos, ou por eventuais erros humanos durante a contagem das colónias ou ao longo do processo experimental.

A Praia A destaca-se de todas outras praias estudadas pelas suas elevadas concentrações de fungos, com uma média de 2081 UFC/g de fungos totais e 96 UFC/g de fungos patogénicos. Esta praia é a única cujo valor médio de fungos totais ultrapassa o limite de 420 UFC/g, proposto pela Associação Bandeira Azul Europa para praias em conformidade. As contagens particularmente altas no mês de julho podem ser atribuídas a condições ambientais mais favoráveis para o crescimento de fungos, como a maior disponibilidade de matéria orgânica, temperaturas mais elevadas e uma maior interação com possíveis fontes de contaminação. É consistente com as observações de Soffritti et al. (2023), que analisou a contaminação microbiológica das areias de uma praia do Mar Adriático Norte. Este estudo verificou que as areias urbanas podem servir de reservatório para uma variedade de microrganismos, incluindo fungos potencialmente patogénicos, e que os fatores ambientais, como a temperatura elevada e a interação com fontes de contaminação urbana, como águas residuais e lixo, desempenham um papel importante na proliferação fúngica. Assim como na

Praia A, foram observadas altas contagens de fungos em períodos de verão, o que está associado a condições ideais de crescimento para fungos devido ao aumento da matéria orgânica e da temperatura [127]. Já o estudo de Brandão et al. (2022) também aponta, a presença de fontes de contaminação, como resíduos urbanos e maior atividade humana, como um contributo significativo para o aumento das contagens de fungos [128]

As Praias B e F também apresentaram médias elevadas, com a Praia B registando uma média de 279 UFC/g de fungos totais e 83 UFC/g de fungos patogénicos, e a Praia F uma média de 259 UFC/g de fungos totais e 61 UFC/g de fungos patogénicos. Ambas as praias mostraram um aumento significativo nos níveis de fungos totais, com picos expressivos no final de julho, embora em menor escala em comparação com a Praia A. Estes resultados sugerem que fatores semelhantes, como a movimentação humana ou características ambientais locais, podem estar a contribuir para a proliferação de fungos.

Por outro lado, as Praias C, D, E e G apresentaram médias consideravelmente mais baixas: a Praia C com médias de 123 UFC/g de fungos totais e 34 UFC/g de fungos patogénicos, a Praia D com 74 e 39 UFC/g, a Praia E com 57 e 45 UFC/g e a Praia G com 75 e 77 UFC/g, respetivamente. Estes valores sugerem uma pressão ambiental ou humana menor, o que, do ponto de vista da saúde pública, pode ser benéfico, reduzindo o risco de contaminação.

Nos resultados obtidos, observou-se que algumas praias apresentaram valores de UFC/g de fungos totais extremamente elevados, ultrapassando as 1000 UFC/g, o que indica uma contaminação micológica da areia muito elevada, visto que o valor limite para uma praia estar em conformidade são 420 UFC/g de areia. Entre os dados analisados, o valor mais elevado foi registado na praia A, no dia 26/06/2024, com um pico de 14017 UFC/g de fungos totais e 294 UFC/g de fungos patogénicos. Esse resultado representa um nível de contaminação severo, com a presença significativa de fungos no ambiente. Pensa-se que essa alta contagem possa ter sido influenciada pela presença de areia contaminada com fezes de aves ou outros animais, como cães, que muitas vezes são levados para a praia. Esses resíduos podem ter promovido a proliferação de fungos, resultando em valores tão elevados. Embora a maioria desses organismos possam ser saprófitas, ou seja, decompositores de matéria orgânica, o valor de UFC/g de fungos patogénicos também foi o mais elevado registado em todo o estudo, sendo assim, os valores observados levantam preocupações sobre possíveis impactos na saúde pública, especialmente para frequentadores com imunidade baixa. Noutra amostra, também da praia A, recolhida e analisada no dia 23/07/2024, foi registado os valores de 6500 UFC/g e 150 UFC/g de fungos

patogênicos, demonstrando que essa praia continua a apresentar condições favoráveis à proliferação de fungos. Ainda na praia A, no dia 30/07/2024, foram encontradas 1050 UFC/g de fungos totais e 75 UFC/g de fungos patogênicos. A persistência de níveis elevados de contaminação fúngica ao longo do tempo aponta para um problema ambiental crônico que deve ser investigado.

Um ponto crítico também foi identificado na Praia F, no dia 30/07/2024, onde os níveis de fungos totais atingiram 1150 UFC/g, um valor bastante elevado. No entanto, os fungos patogênicos apresentaram uma concentração significativamente mais baixa, com 29 UFC/g, o que indica que, embora a contaminação fúngica geral seja preocupante, a presença de organismos potencialmente prejudiciais para a saúde é relativamente baixa. Apesar dos níveis reduzidos de fungos patogênicos, é importante realçar que a exposição a uma alta concentração de fungos totais pode provocar irritações ou reações alérgicas em indivíduos mais sensíveis.

Outro ponto crítico foi identificado na Praia B, também no dia 30/07/2024, com um valor de 784 UFC/g de fungos totais e 64 UFC/g de fungos patogênicos, refletindo um padrão semelhante ao observado na Praia F.

A presença contínua de altos níveis de fungos totais, especialmente na praia A, indica um ambiente propício para o desenvolvimento desses organismos, possivelmente relacionado a fatores como alta umidade, acúmulo de matéria orgânica em decomposição e drenagem inadequada. Esses fatores podem estar a criar condições ideais para o crescimento de fungos, que podem, por sua vez, comprometer a qualidade ambiental e a saúde dos frequentadores dessas praias.

Analisando as variações ao longo do tempo, é notório que na Praia A ocorre um aumento significativo tanto dos fungos totais como dos patogênicos a partir de meados de junho, com um destaque especial para os dias 26/06/2024, 23/07/2024 e 30/07/2024, onde as contagens atingem os valores mais elevados. Este comportamento pode estar associado a fatores sazonais, tais como o aumento da temperatura, a humidade ou a maior utilização das praias durante a época balnear, criando condições propícias para o crescimento e proliferação dos fungos.

A Praia B também teve um pico acentuado no dia 30/07/2024, onde os níveis de fungos totais superaram os 700 UFC/g. Na praia D e F também foi registado o valor mais elevado de fungos totais no dia 30/07/2024 (297 UFC/g na praia D e 1150 UFC/g na praia F).

Estas observações sugerem que as condições ambientais e/ou antropogénicas neste período podem ter favorecido o aumento da contaminação fúngica.

Por outro lado, praias como a C, E e G revelam variações menos pronunciadas ao longo do período estudado, com flutuações pontuais nas contagens de fungos. Tal comportamento sugere que fatores específicos a nível local, como as características da areia, a quantidade de matéria orgânica, o uso recreativo ou a proximidade a fontes de contaminação, podem influenciar significativamente a proliferação de fungos nessas praias.

A análise de correlação entre a abundância de fungos totais e patogénicos (Figura 19) foi realizada com o objetivo de verificar se os valores de fungos totais, normalmente estudados nos programas de monitorização, são suficientes para estimar a presença de fungos patogénicos, que têm maior relevância para a saúde pública. Esta análise permite compreender se há uma correlação direta ou se existem outros fatores que influenciam o crescimento de fungos patogénicos.

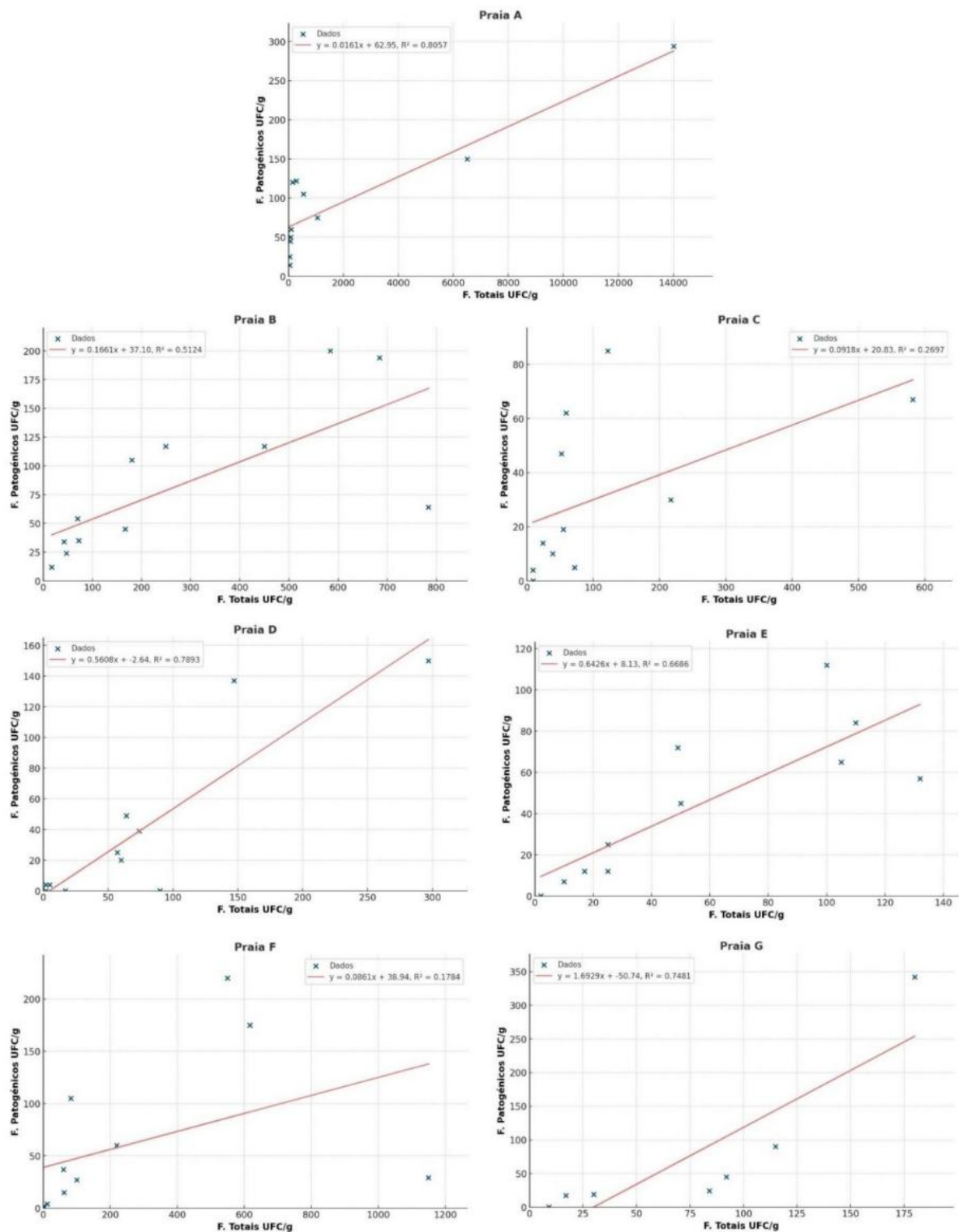


Figura 19 - Gráficos de regressão linear entre fungos totais (UFC/g) e fungos patogênicos (UFC/g) para as diferentes praias (A, B, C, D, E, F e G).

Analisando os gráficos da Figura 19, conclui-se que nas Praias A, D e G, a correlação entre a abundância de fungos totais e fungos patogênicos é forte, com valores de R^2 acima de 0.75, indicando que a quantidade de fungos totais explica bem a variação nos fungos patogênicos. Nas Praias C e F mostram uma correlação fraca, sugerindo que há outros fatores que influenciam o crescimento de fungos patogênicos nessas praias. Já nas Praias B e E têm correlações moderadas, com R^2 em torno de 0.5-0.6, sugerindo que os fungos totais são importantes, mas não os únicos fatores relevantes.

Apesar da correlação forte em algumas praias (A, D e G), os valores de fungos totais não são sempre um bom indicador da abundância de fungos patogênicos. Nas praias com correlações fracas e moderadas, o estudo dos fungos patogênicos torna-se essencial, visto que a sua monitorização isolada pode revelar riscos para a saúde que não seriam detetados apenas com a análise de fungos totais. Assim sendo, seria importante incluir a pesquisa de fungos patogênicos nos programas de monitorização das areias.

5 Conclusões

Face aos dados obtidos até ao momento e ao tratamento estatístico realizado, considera-se que, este se revela adequado ao uso pretendido. Esta conclusão é possível dado que não existem legislações específicas, normativas ou requisitos de clientes para este tipo de métodos, nem valores legais a cumprir. Além disso, o método apresenta características de desempenho, incertezas e precisão, semelhantes a outros métodos microbiológicos, o seu limite de deteção é inferior a 30% do valor limite de 420 UFC/g estabelecido pelo programa Bandeira Azul e obteve a classificação de Bom no ensaio interlaborial, o que comprova a veracidade do método.

Para dar mais consistência às conclusões aqui refletidas será necessário reforçar a parte experimental e fazer recolha de mais dados para declarar o método válido e adequado a uso, com mais certeza estatística. Face ao exposto, considera-se que o laboratório necessita, principalmente de fazer mais duplicados de amostragem para calcular a incerteza de medição (analítica + amostragem).

Com base na quantificação dos fungos totais e fungos patogénicos nas diferentes praias, recomenda-se que as praias com maior incidência de fungos patogénicos, nomeadamente as praias A, B e F, sejam alvo de monitorização mais frequente, especialmente durante os períodos de maior risco, como os meses de verão.

A comparação entre os resultados obtidos para fungos totais e fungos patogénicos demonstrou que nem sempre existe uma forte correlação entre estes dois parâmetros, pelo que se considera que seria relevante incluir a análise de fungos patogénicos em futuros programas de monitorização.

A implementação de políticas de gestão ambiental e programas de educação pública são igualmente essenciais para reduzir a contaminação das areias das zonas balneares por fungos. Tais medidas podem incluir a promoção de boas práticas na gestão de resíduos, restrição de animais domésticos nas praias nos meses de maior afluência, e a gestão eficaz das infraestruturas de saneamento, para mitigar a proliferação fúngica nas áreas costeiras.

6 Referências Bibliográficas

1. Porto, Á.d., *Águas do Porto. (s.d.). Contextualização histórica. Águas do Porto.* <https://aguasdoporto.pt/abastecimento-de-agua/contextualizacao-historica>. s.d.
2. Porto, Á.d. *Águas do Porto. (s.d.). Empresa. Águas do Porto.* <https://aguasdoporto.pt/empresa>. s.d.
3. Porto, Á.d. *Águas do Porto. (2024). Organograma Águas e Energia do Porto 2024. Águas do Porto.* https://aguasdoporto.pt/files/uploads/cms/organograma_aedp_2024.pdf. 2024.
4. AEdP, *Águas e Energia do Porto (2023). Lab_Relatório de Atividades 2023_RC_RS_2023. Nome da Instituição. 2023.*
5. Porto, Á.d. *Águas do Porto. (s.d.). Qualidade da água. Águas do Porto.* <https://aguasdoporto.pt/qualidade-da-agua/qualidade>. s.d.
6. ABAE. *Associação Bandeira Azul da Europa. (2023). Critérios Bandeira Azul Praias 2024 - Regulamento Anexo I. Disponível em* <https://bandeiraazul.abaae.pt/wp-content/uploads/sites/2/2023/11/Criterios-BA-Praias-2024-Regulamento-Anexo-I-1.pdf>. 2023.
7. ISO/IEC, *International Organization for Standardization. (2017). ISO/IEC 17025:2017: General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. 2017.*
8. ISO, *International Organization for Standardization. (2021). ISO 16140-3:2021: Microbiology of the food chain — Method validation — Part 3: Protocol for the verification of reference and validated alternative methods implemented in a single laboratory. 2021.*
9. IPAC, *Instituto Português da Acreditação. (2019). Procedimento para acreditação de laboratórios DRC005 de 2019-11-06. 2019.*
10. ISO, *International Organization for Standardization. (2016). ISO 16140-2:2016: Microbiology of the food chain — Method validation — Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method. 2016.*
11. Portugal, *Portugal. (2023). Decreto-Lei n.º 69/2023, de 17 de agosto. Diário da República n.º 155/2023, Série I de 2023-08-17. 2023.*
12. ISO, *International Organization for Standardization. (2019). ISO/TS 19036:2019: Microbiology of the food chain — Estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations. 2019.*
13. ISO, *International Organization for Standardization. (2007). ISO 7218:2007: Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations. 2007.*
14. ISO, *International Organization for Standardization. (2017). ISO 13843:2017: Water quality — Requirements for establishing performance characteristics of quantitative microbiological methods. 2017.*
15. ISO, *International Organization for Standardization. (2012). ISO 29201:2012: Water quality — The variability of test results and the uncertainty of measurement in microbiological testing of water. 2012.*
16. Jarvis, B., *Chapter 10 - Measurement uncertainty in microbiological analysis, in Statistical Aspects of the Microbiological Examination of Foods (Third Edition), B. Jarvis, Editor. 2016, Academic Press. p. 185-194.*
17. Forster, L.I., *Conclusions on measurement uncertainty in microbiology. Journal of AOAC International, 2009. 92 1: p. 312-9.*
18. Lombard, B., *Estimation of measurement uncertainty in food microbiology: The ISO approach. Accreditation and Quality Assurance, 2006. 11: p. 94-100.*

19. ISO, *International Organization for Standardization*. (1994). *ISO 5725:1994: Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Parts 1 to 6*. 1994.
20. Abreu, J., A.d.S. Róveda, and J. Pamphile, *Fungos de interesse: Aplicações biotecnológicas fungi of interest: Biotechnological applications*. Revista UNINGÁ Review, 2015. **21**(1): p. 55-59.
21. Azevedo, E. and M. Barata, *Diversidade no reino Fungi e aplicações à Indústria*. Revista de Ciência Elementar, 2018. **6**(4).
22. Hawksworth, D.L. and R. Lücking, *Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species*. Microbiology Spectrum, 2017. **5**(4): p. 10.1128/microbiolspec.funk-0052-2016.
23. Watkinson, S.C., L. Boddy, and N. Money, *The fungi*. 2015: Academic Press.
24. Woese et al., C.R., Kandler, O., & Wheelis, M. L., Woese, C. R., Kandler, O., & Wheelis, M. L. (1990). *Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **87**(12), 4576–4579. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.12.4576>. 1990.
25. Peay, K.G., P.G. Kennedy, and T.D. Bruns, *Fungal Community Ecology: A Hybrid Beast with a Molecular Master*. BioScience, 2008. **58**(9): p. 799-810.
26. Tortora, G.J., C.L. Case, and B.R. Funke, *Microbiologia-12ª Edição*. 2016: Artmed Editora.
27. Walker, G.M. and N.A. White, *Introduction to fungal physiology*. Fungi: biology and applications, 2017: p. 1-35.
28. Simon-Nobbe, B., et al., *The spectrum of fungal allergy*. International archives of allergy and immunology, 2007. **145**(1): p. 58-86.
29. Spricigo, M.C., *Uma breve história dos fungos na evolução da Terra*. 2022.
30. CK-12Foundation, *CK-12 Foundation*. (2019). *CK-12 Biology for High School FlexBook®*. CK-12 Foundation. <https://www.ck12.org/book/ck-12-biology-flexbook/>. 2019.
31. Brito, S.C.C., *Fungos em areias e águas costeiras e interiores em Portugal-relevância para a saúde humana e bem-estar*. 2019.
32. Money, N.P., *Fungi: a very short introduction*. 2016: Oxford University Press.
33. Bar-On, Y.M., R. Phillips, and R. Milo, *The biomass distribution on Earth*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2018. **115**(25): p. 6506-6511.
34. da Silva, E.A., et al., *Combinação de extratos enzimáticos de basidiomicetos e ascomicetos para hidrólise do cacho vazio de dendê*. 2017.
35. Manici, L.M., et al., *The enzyme patterns of Ascomycota and Basidiomycota fungi reveal their different functions in soil*. Applied Soil Ecology, 2024. **196**: p. 105323.
36. Bruniera, L.B., et al., *Purificação e caracterização da enzima LACASE obtida de cultura submersa de Pleurotus ostreatus*. Revista Terra & Cultura: Cadernos de Ensino e Pesquisa, 2021. **13**(26): p. 58-70.
37. de França Passos, D., N. Pereira Jr, and A.M. de Castro, *A comparative review of recent advances in cellulases production by Aspergillus, Penicillium and Trichoderma strains and their use for lignocellulose deconstruction*. Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry, 2018. **14**: p. 60-66.
38. Bennett, A.E. and K. Groten, *The costs and benefits of plant–arbuscular mycorrhizal fungal interactions*. Annual Review of Plant Biology, 2022. **73**(1): p. 649-672.
39. Grimm, M., et al., *The lichens' microbiota, still a mystery?* Frontiers in Microbiology, 2021. **12**: p. 623839.
40. Berude, M., et al., *Micorrizas e sua importância agroecológica*. Enciclopédia Biosfera, 2015. **11**(22).
41. Fulekar, M., et al., *Bioremediation of organic pollutants using Phanerochaete chrysosporium, in Fungi as bioremediators*. 2012, Springer. p. 135-157.
42. Walker, G.M. and G.G. Stewart, *Saccharomyces cerevisiae in the production of fermented beverages*. Beverages, 2016. **2**(4): p. 30.

43. Pereira, A.L. and J.R. Pita, *Alexander Fleming (1881-1955): da descoberta da penicilina (1982) ao prémio Nobel (1945)*. História: revista da Faculdade de Letras da Universidade do Porto, 2018. **6**.
44. Deshmukh, S.K., S.A. Verekar, and S.V. Bhavé, *Endophytic fungi: a reservoir of antibacterials*. Frontiers in microbiology, 2015. **5**: p. 715.
45. Wu, Q., et al., *Mechanism of cyclosporine A nephrotoxicity: Oxidative stress, autophagy, and signalings*. Food and chemical toxicology, 2018. **118**: p. 889-907.
46. Chimento, A., et al., *Cholesterol and its metabolites in tumor growth: therapeutic potential of statins in cancer treatment*. Frontiers in endocrinology, 2019. **9**: p. 807.
47. Köhler, J.R., et al., *Fungi that infect humans*. Microbiology spectrum, 2017. **5**(3): p. 10.1128/microbiolspec.funk-0014-2016.
48. Subhan, M., R. Faryal, and I. Macreadie, *Exploitation of Aspergillus terreus for the production of natural statins*. Journal of Fungi, 2016. **2**(2): p. 13.
49. Wang, G., M. Huang, and J. Nielsen, *Exploring the potential of Saccharomyces cerevisiae for biopharmaceutical protein production*. Current opinion in biotechnology, 2017. **48**: p. 77-84.
50. Echevarría, L. and M.N. Iqbal, *Identification of Fungi and Yeasts from the Sands of the Pyramids of Giza, in Cairo, Egypt*. PSM Biological Research, 2021. **6**(1): p. 13-18.
51. Kim, J.-Y., *Human fungal pathogens: why should we learn?* 2016, Springer. p. 145-148.
52. Bennett, R.J. and B.G. Turgeon, *Fungal Sex: The <i>Ascomycota</i>*. Microbiology Spectrum, 2016. **4**(5): p. 10.1128/microbiolspec.funk-0005-2016.
53. Gould, A.B., *Fungi: Plant Pathogenic*, in *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)*, M. Schaechter, Editor. 2009, Academic Press: Oxford. p. 457-477.
54. Pang, K.-L., et al., *Pathogenic fungi of marine animals: A taxonomic perspective*. Fungal Biology Reviews, 2021. **38**: p. 92-106.
55. Webster, J., & Weber, R., *Ascomycota (ascomycetes)*, in *Introduction to Fungi*, J. Webster and R. Weber, Editors. 2007, Cambridge University Press: Cambridge. p. 226-249.
56. Laich, F., F. Fierro, and J.F. Martín, *Production of penicillin by fungi growing on food products: identification of a complete penicillin gene cluster in Penicillium griseofulvum and a truncated cluster in Penicillium verrucosum*. Applied and environmental microbiology, 2002. **68**(3): p. 1211-1219.
57. Jahromi, M.F., et al., *Research Article Lovastatin Production by Aspergillus terreus Using Agro-Biomass as Substrate in Solid State Fermentation*. 2012.
58. Egbuta, M.A., M. Mwanza, and O.O. Babalola, *Health risks associated with exposure to filamentous fungi*. International journal of environmental research and public health, 2017. **14**(7): p. 719.
59. Ghobad-Nejhad, M., et al., *Basidiomycete fungi: From biosystematics and biodiversity to biotechnology*. 2023, Frontiers Media SA. p. 1128319.
60. He, M.-Q., et al., *Species diversity of Basidiomycota*. Fungal diversity, 2022. **114**(1): p. 281-325.
61. Coelho, M.A., et al., *Fungal sex: the Basidiomycota*. The fungal kingdom, 2017: p. 147-175.
62. Ayimbila, F. and S. Keawsompong, *Nutritional Quality and Biological Application of Mushroom Protein as a Novel Protein Alternative*. Current Nutrition Reports, 2023. **12**(2): p. 290-307.
63. Meisel, E.M., et al., *Two cases of severe amanita muscaria poisoning including a fatality*. Wilderness & Environmental Medicine, 2022. **33**(4): p. 412-416.
64. Atila, F., M.N. Owaid, and M.A. Shariati, *The nutritional and medical benefits of Agaricus bisporus: A review*. 2017.
65. Ahmad, I., et al., *Therapeutic values and nutraceutical properties of shiitake mushroom (Lentinula edodes): A review*. Trends in Food Science & Technology, 2023. **134**: p. 123-135.
66. Devkota, P. and R. Hammerschmidt, *The infection process of Armillaria mellea and Armillaria solidipes*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2020. **112**: p. 101543.

67. Oehl, F., et al., *Advances in Glomeromycota taxonomy and classification*. IMA Fungus, 2011. **2**(2): p. 191-199.
68. Kühn, I.E., *Ação de bioestimulantes na mitigação dos efeitos do déficit hídrico na cultura da soja*. 2023.
69. Macedo, E.C., *Principais grupos de fungos: uma interpretação com base em sua sistemática filogenética*. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo, 2017.
70. Kaczmarek, A. and M.I. Boguś, *Fungi of entomopathogenic potential in Chytridiomycota and Blastocladiomycota, and in fungal allies of the Oomycota and Microsporidia*. IMA Fungus, 2021. **12**(1): p. 29.
71. Pratt, C.J., et al., *Anaerobic fungi in the tortoise alimentary tract illuminate early stages of host-fungal symbiosis and Neocallimastigomycota evolution*. Nature Communications, 2024. **15**(1): p. 2714.
72. Sibirny, A.A., Sibirny, A. A. (Ed.). (2017). *Biotechnology of yeasts and filamentous fungi*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-58829-2>. 2017.
73. Brito, S., *Fungos em areias e águas costeiras e interiores em Portugal: relevância para a saúde humana e bem-estar*. 2019.
74. Wösten, H.A., *Filamentous fungi for the production of enzymes, chemicals and materials*. Current opinion in biotechnology, 2019. **59**: p. 65-70.
75. Li, D., et al., *Methods for genetic transformation of filamentous fungi*. Microbial cell factories, 2017. **16**: p. 1-13.
76. Meyer, V., et al., *Current challenges of research on filamentous fungi in relation to human welfare and a sustainable bio-economy: a white paper*. Fungal biology and biotechnology, 2016. **3**: p. 1-17.
77. Walsh, T., et al., *Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens*. Clinical Microbiology and Infection, 2004. **10**: p. 48-66.
78. Person, A.K., et al., *Aspergillus niger: an unusual cause of invasive pulmonary aspergillosis*. Journal of medical microbiology, 2010. **59**(7): p. 834-838.
79. Ahmadi, B., et al., *A case of onychomycosis caused by Aspergillus candidus*. Medical mycology case reports, 2012. **1**(1): p. 45-48.
80. Brandão, J., et al., *Mycosands: Fungal diversity and abundance in beach sand and recreational waters—Relevance to human health*. Science of the Total Environment, 2021. **781**: p. 146598.
81. Veses, V. and N.A.R. Gow, *Pseudohypha budding patterns of Candida albicans*. Medical Mycology, 2009. **47**(3): p. 268-275.
82. Gancedo, J.M., *Control of pseudohyphae formation in Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiology Reviews, 2001. **25**(1): p. 107-123.
83. Geis, P.A., *Cosmetic microbiology: A practical approach*. 2020: CRC Press.
84. Cronjé, N., et al., *Attempted molecular detection of the thermally dimorphic human fungal pathogen Emergomyces africanus in terrestrial small mammals in South Africa*. Medical Mycology, 2018. **56**(4): p. 510-513.
85. Khardori, N., *Bench to bedside: diagnostic microbiology for the clinicians*. Microbiology, 2017. **25**(2): p. 151-153.
86. Barriga, E.J.C., et al., *Yeasts biodiversity and its significance: case studies in natural and human-related environments, ex situ preservation, applications and challenges*. Changing diversity in changing environment, 2011. **14**: p. 55-86.
87. Phaff, H.J. and W.T. Starmer, *5 Yeasts Associated with Plants, Insects and*. 1987.
88. Papadakis, J., et al., *Bather-related microbial and yeast populations in sand and seawater*. Water Research, 1997. **31**(4): p. 799-804.
89. Andrews, M.D. and M. Burns, *Common tinea infections in children*. Am Fam Physician, 2008. **77**(10): p. 1415-20.

90. Zhan, P. and W. Liu, *The changing face of dermatophytic infections worldwide*. Mycopathologia, 2017. **182**(1): p. 77-86.
91. Tampieri, M.P., *[Update on the diagnosis of dermatomycosis]*. Parassitologia, 2004. **46**(1-2): p. 183-6.
92. Lopes, G., E. Pinto, and L. Salgueiro, *Natural Products: An Alternative to Conventional Therapy for Dermatophytosis?* Mycopathologia, 2017. **182**(1-2): p. 143-167.
93. Ameen, M., *Epidemiology of superficial fungal infections*. Clin Dermatol, 2010. **28**(2): p. 197-201.
94. Sabouraud, R.J.A., *Maladies du cuir chevelu: I-[IV]*. Vol. 3. 1910: Masson et Cie.
95. Emmons, C.W., *Dermatophytes: natural grouping based on the form of the spores and accessory organs*. Archives of Dermatology and Syphilology, 1934. **30**(3): p. 337-362.
96. Al-Janabi, A., *Dermatophytosis: Causes, clinical features, signs and treatment*. J Symptoms Signs, 2014. **3**(3): p. 200-3.
97. Carod, J.-F., et al., *Outbreak of Tinea capitis and corporis in a primary school in Antananarivo, Madagascar*. The Journal of Infection in Developing Countries, 2011. **5**(10): p. 732-736.
98. Mancianti, F., et al., *Dermatophytes isolated from symptomatic dogs and cats in Tuscany, Italy during a 15-year-period*. Mycopathologia, 2002. **156**(1): p. 13-8.
99. Weitzman, I. and R.C. Summerbell, *The dermatophytes*. Clin Microbiol Rev, 1995. **8**(2): p. 240-59.
100. Brown, G.D., et al., *Hidden killers: human fungal infections*. Science translational medicine, 2012. **4**(165): p. 165rv13-165rv13.
101. Kozel, T.R. and B. Wickes, *Fungal diagnostics*. Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 2014. **4**(4): p. a019299.
102. Pappas, P.G., et al., *Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America*. Clinical infectious diseases, 2016. **62**(4): p. e1-e50.
103. Latgé, J.-P. and G. Chamilos, *Aspergillus fumigatus and Aspergillosis in 2019*. Clinical microbiology reviews, 2019. **33**(1): p. 10.1128/cmr.00140-18.
104. García-Carnero, L.C. and J.A. Martínez-Álvarez, *Virulence factors of Sporothrix schenckii*. Journal of Fungi, 2022. **8**(3): p. 318.
105. Gonçalves, S.S., et al., *Epidemiology and molecular mechanisms of antifungal resistance in Candida and Aspergillus*. Mycoses, 2016. **59**(4): p. 198-219.
106. Boyce, K.J. and A. Andrianopoulos, *Fungal dimorphism: the switch from hyphae to yeast is a specialized morphogenetic adaptation allowing colonization of a host*. FEMS microbiology reviews, 2015. **39**(6): p. 797-811.
107. Staley, C. and M.J. Sadowsky, *Regional Similarities and Consistent Patterns of Local Variation in Beach Sand Bacterial Communities throughout the Northern Hemisphere*. Appl Environ Microbiol, 2016. **82**(9): p. 2751-2762.
108. Melanda, R.S.S., *Implementação, para acreditação em laboratório, do método Symphony agar para quantificação de bolores e leveduras em produtos alimentares*. 2022.
109. Whitman, R.L., et al., *Microbes in beach sands: integrating environment, ecology and public health*. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 2014. **13**: p. 329-368.
110. Weiskerger, C.J., et al., *Impacts of a changing earth on microbial dynamics and human health risks in the continuum between beach water and sand*. Water Research, 2019. **162**: p. 456-470.
111. Sabino, R., et al., *Pathogenic fungi: an unacknowledged risk at coastal resorts? New insights on microbiological sand quality in Portugal*. Marine pollution bulletin, 2011. **62**(7): p. 1506-1511.

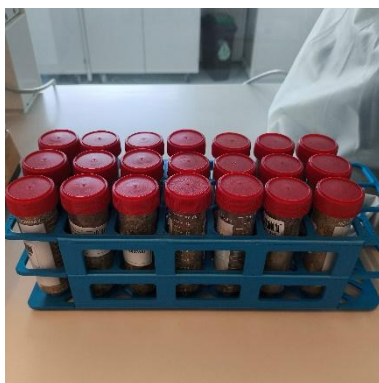
112. Solo-Gabriele, H.M., et al., *Beach sand and the potential for infectious disease transmission: observations and recommendations*. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 2016. **96**(1): p. 101-120.
113. Whitman, R.L., et al., *Microbes in beach sands: integrating environment, ecology and public health*. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 2014. **13**(3): p. 329-368.
114. Heaney, C.D., et al., *Contact With Beach Sand Among Beachgoers and Risk of Illness*. American Journal of Epidemiology, 2009. **170**(2): p. 164-172.
115. World-Health-Organization, *Guidelines for safe recreational water environments: Coastal and fresh waters*. Vol. 1. 2003: World Health Organization.
116. Cabelli, V., et al., *Swimming-associated gastroenteritis and water quality*. American journal of epidemiology, 1982. **115**(4): p. 606-616.
117. Kishimoto, R.A. and G.E. Baker, *Pathogenic and Potentially Pathogenic Fungi Isolated from Beach Sands and Selected Soils of Oahu, Hawaii*. Mycologia, 1969. **61**(3): p. 537-548.
118. Papadakis, J.A., et al., *Bather-related microbial and yeast populations in sand and seawater*. Water Research, 1997. **31**(4): p. 799-804.
119. Vogel, C., et al., *Prevalence of yeasts in beach sand at three bathing beaches in South Florida*. Water research, 2007. **41**(9): p. 1915-1920.
120. ABAE. Associação Bandeira Azul da Europa. (2024). *Monitorização da qualidade das areias 2024*. <https://bandeiraazul.abae.pt/wp-content/uploads/sites/2/2024/01/Monitorizacao-Qualidade-Areias-2024.pdf>. 2024.
121. ISO, *International Organization for Standardization*. (2014). *ISO 11133: Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media*. ISO. 2014.
122. Relacre, RELACRE. (2016). *Guia Relacre nº 29: Validação de métodos analíticos e calibração*. 2ª ed. Lisboa: RELACRE. 2016.
123. Eurachem/CITAC, Eurachem/CITAC. (2022). *Incerteza de medição resultante da amostragem: Um guia para métodos e abordagens*. Eurachem. 2022.
124. ABAE. Associação Bandeira Azul da Europa. (2023). *Qualidade das areias 2023*. <https://bandeiraazul.abae.pt/wp-content/uploads/sites/2/2023/12/Qualidade-das-areias-2023.pdf>. 2023.
125. Li, W., et al., *Seasonal and Spatial Dynamics of Fungal Diversity and Communities in the Intertidal Zones of Qingdao, China*. Journal of Fungi, 2023. **9**(10): p. 1015.
126. Novak Babič, M., et al., *Occurrence, Diversity and Anti-Fungal Resistance of Fungi in Sand of an Urban Beach in Slovenia—Environmental Monitoring with Possible Health Risk Implications*. Journal of Fungi, 2022. **8**(8): p. 860.
127. Soffritti, I., et al., *Characterization of the Pathogenic Potential of the Beach Sand Microbiome and Assessment of Quicklime as a Remediation Tool*. Microorganisms, 2023. **11**(8): p. 2031.
128. Brandão, J., et al., *Climate Change Impacts on Microbiota in Beach Sand and Water: Looking Ahead*. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2022. **19**(3): p. 1444.

Anexos

Anexo 1 - Descrição detalhada dos procedimentos práticos do método de Pesquisa e quantificação total de fungos em areia



1 – Colheita para tubos falcon estéreis de 50 ml das amostras de areia de 3 pontos equidistantes em cada praia. Cada tubo Falcon tem uma etiqueta com o ID da amostra que identifica a praia e por baixo “Areia 1”, “Areia 2” ou “Areia 3” para a identificação de cada ponto de colheita.



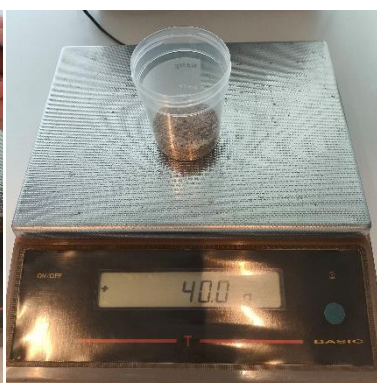
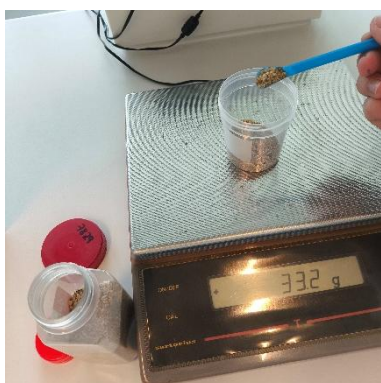
2 – Organização de todas as amostras de cada praia a analisar assim que chegam ao laboratório. (No caso de não for possível fazer de imediato a análise e precisarem de ser armazenadas, estas devem ir para o frigorífico).



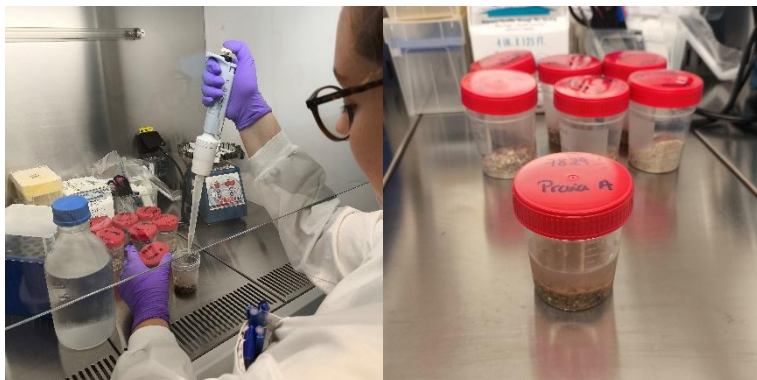
3 – Juntar as três amostras de areia de cada praia num frasco estéril de 250 ml devidamente identificado com o ID da amostra.



4 – Agitar o frasco de modo a obter uma amostra composta da praia.



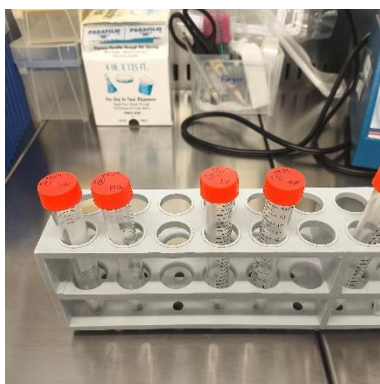
5 – Com o auxílio de uma espátula estéril, pesar 40 g de areia para um copo estéril devidamente identificado.



6 – Juntar 40 ml de água desionizada estéril aos 40 g de areia.

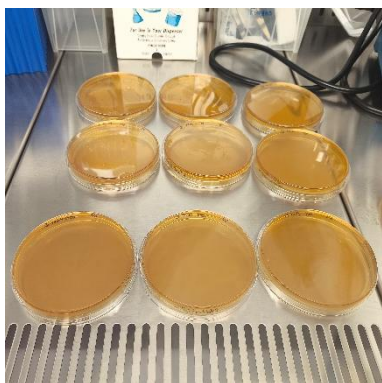


7 – Agitar o copo com a areia e a água numa mesa de agitação a 100 rpm durante 30 minutos.

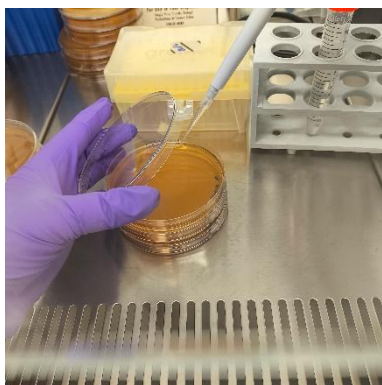


8 – Preparação das diluições de 1/10 e 1/100 adicionando 9 ml de água desionizada estéril em tubos Falcon de 15 ml. No tubo para a diluição de 1/10, adiciona-se 1 ml do sobrenadante

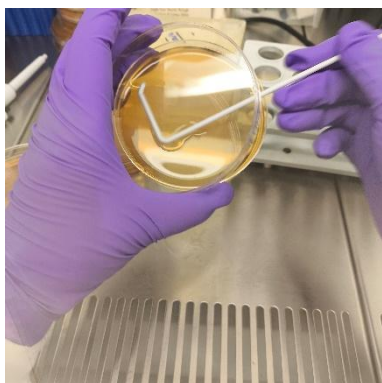
original e mistura-se no agitador vórtex. Em seguida, retira-se 1 ml dessa solução e transfere-se para o outro tubo contendo 9 ml de água estéril e mistura-se no agitador vórtex, a fim de se obter a diluição de 1/100.



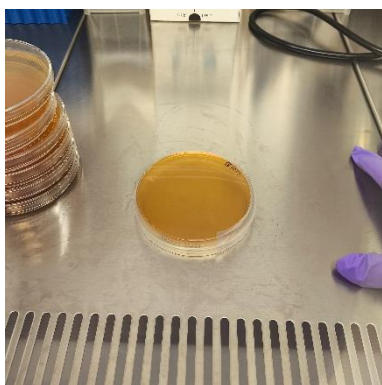
9 – Identificação das placas de Malte Agar, em triplicado para cada diluição, com o ID da amostra e a diluição respectiva.



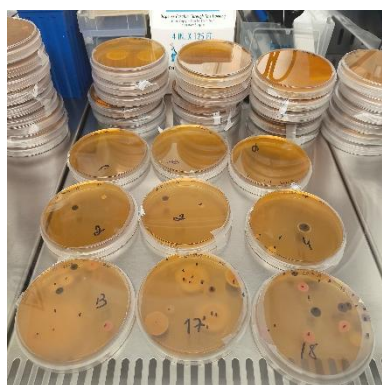
10 – Inoculação de 200 microlitros da solução respectiva em cada placa.



11 – Espalhamento do inóculo com o auxílio de uma espátula em L estéril.



12 – Isolação de todas as placas com filme de vedação de laboratório de modo a prevenir contaminações dentro da estufa e incubação destas durante 5 dias na estufa a 27,5 °C.



13 – Contagem das colónias em cada placa após o crescimento na estufa a 27,5 °C no tempo determinado (normalmente 5 dias).

Anexo 2 - Exemplos de preparações e sua observação por microscopia óptica

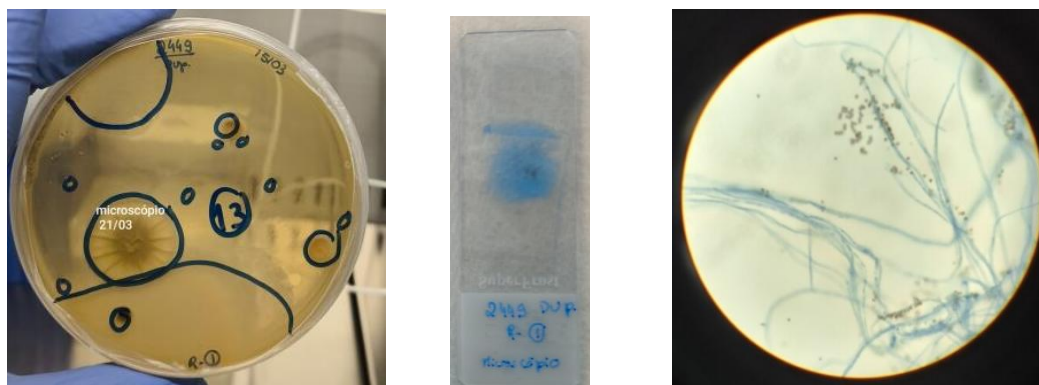


Figura 1, 2 e 3 - 2449 Duplicado de Amostragem Réplica 1- fungo filamentoso

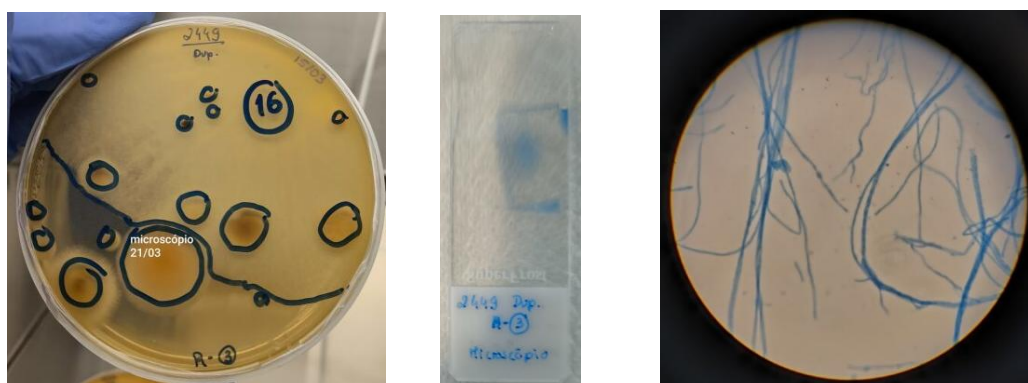


Figura 4, 5 e 6 - 2449 Duplicado de Amostragem Réplica 3 - fungo filamentoso



Figura 7, 8 e 9 - 5682 Réplica 1 - fungo filamentosos ("Rosa filamentoso")



Figura 10, 11 e 12 - 5678 Réplica 1 - fungo leveduriformes ("Rosa gelatinoso")

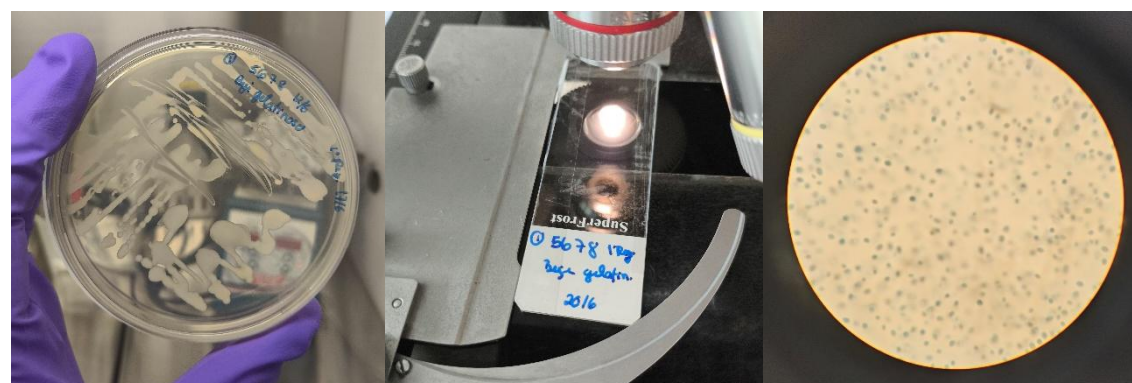


Figura 13, 14 e 15 - 5678 Réplica 1 - fungo leveduriformes ("Beje gelatinoso")



Figura 16 - A totalidade dos fragmentos de espécies fúngicas foi preservada através do seu congelamento em tubos de Eppendorf, garantindo a sua conservação a longo prazo. Estes fragmentos, representando diferentes espécies fúngicas, foram cuidadosamente separados e armazenados para uso posterior em análises microbiológicas ou moleculares. O armazenamento em Eppendorfs permite um manuseamento controlado e a proteção das amostras contra degradação, assegurando a sua viabilidade e integridade até ao momento da análise.