

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GABRIELI MARIA HUFF

POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE VIDROS DE POLIFOSFATO PARA
CONTROLE DE MICRORGANISMOS PATOGENICOS EM MATERIAIS DE
CONSTRUÇÃO CIVIL

PALOTINA

2024

GABRIELI MARIA HUFF

POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE VIDROS DE POLIFOSFATO PARA
CONTROLE DE MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS EM MATERIAIS DE
CONSTRUÇÃO CIVIL

Dissertação de mestrado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Fiorini Rosado.

Coorientadora: Profa. Dra. Gabrielle Caroline Peiter.

PALOTINA

2024

Universidade Federal do Paraná. Sistemas de Bibliotecas.
Biblioteca UFPR Palotina.

H889 Huff, Gabrieli Maria

Potencial antimicrobiano de vidros de polifosfato para controle de microrganismos patogênicos em materiais de construção civil / Gabrieli Maria Huff. – Palotina, PR, 2024.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, PR, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Fiorini Rosado.
Coorientadora: Profa. Dra. Gabrielle Caroline Peiter.

Bibliotecária: Aparecida Pereira dos Santos – CRB 9/1653



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR PALOTINA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOTECNOLOGIA -
40001016083P6

ATA Nº69

ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE MESTRADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRA EM BIOTECNOLOGIA

No dia dezoito de dezembro de dois mil e vinte e quatro às 14:00 horas, na sala Sala 15, Bloco Seminário, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de dissertação da mestrand **GABRIELI MARIA HUFF**, intitulada: **Potencial antimicrobiano de vidros de polifosfato para controle de microrganismos patogênicos em materiais de construção civil**, sob orientação da Profa. Dra. ADRIANA FIORINI ROSADO. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: ADRIANA FIORINI ROSADO (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), FÁBIO ROGÉRIO ROSADO (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), IVONETE ROSSI BAUTITZ (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela APROVAÇÃO. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de mestra está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, ADRIANA FIORINI ROSADO, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

PALOTINA, 19 de Dezembro de 2024.

Assinatura Eletrônica
15/01/2025 09:43:26.0
ADRIANA FIORINI ROSADO
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
15/01/2025 09:46:09.0
FÁBIO ROGÉRIO ROSADO
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
15/01/2025 10:02:30.0
IVONETE ROSSI BAUTITZ
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
15/01/2025 09:18:58.0
GABRIELLE CAROLINE PEITER
Coorientador(a) (UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ)

RUA PIONEIRO, 2153 - PALOTINA - Paraná - Brasil
CEP 85950-000 - Tel: (44) 3211-8500 - E-mail: posbiotecnologia@ufpr.br
Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal
Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 420844
Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://siga.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>
e insira o código 420844



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR PALOTINA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOTECNOLOGIA -
40001016083P6

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **GABRIELI MARIA HUFF** intitulada: **Potencial antimicrobiano de vidros de polifosfato para controle de microrganismos patogênicos em materiais de construção civil**, sob orientação da Profa. Dra. ADRIANA FIORINI ROSADO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

PALOTINA, 19 de Dezembro de 2024.

Assinatura Eletrônica
15/01/2025 09:43:26.0
ADRIANA FIORINI ROSADO
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
15/01/2025 09:46:09.0
FÁBIO ROGÉRIO ROSADO
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
15/01/2025 10:02:30.0
IVONETE ROSSI BAUTITZ
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
15/01/2025 09:18:58.0
GABRIELLE CAROLINE PEITER
Coorientador(a) (UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO
PARANÁ)

RUA PIONEIRO, 2153 - PALOTINA - Paraná - Brasil
CEP 85950-000 - Tel: (44) 3211-8500 - E-mail: posbiotecnologia@ufpr.br
Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal
Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 420844
Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://siga.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>
e insira o código 420844

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, que se tornou minha segunda casa por 8 anos, proporcionando momentos incríveis, desafios e de muitas oportunidades. A Pós-Graduação em Biotecnologia, em especial a todos os docentes que tive a oportunidade de conhecer e aprender. Ao Laboratório Multiusuário de Microbiologia, por ceder o espaço, principalmente na reta final do mestrado.

Ao laboratório NEMA (Núcleo Experimental de Micologia Aplicada), da UFPR, Setor Palotina. Tenho um carinho enorme pelo laboratório, onde estive por 7 anos. Me despedir do NEMA não é uma tarefa fácil, mas saio com a sensação de dever cumprido e com o propósito atingido. A todos os alunos que tive a oportunidade de conhecer e conviver, espero que eu tenha conseguido contribuir com 1% do meu conhecimento com vocês, seja por meio de treinamentos, conversas, risadas, conselhos e até nos momentos desafiadores. Em especial as alunas Juliet, Mariana, Bianca, Patrícia, Juliana e Luísa. Contem sempre comigo, nunca se esqueçam disso.

À minha orientadora Profa. Dra. Adriana Fiorini, que me recebeu de braços abertos durante 7 anos. A nossa relação sempre foi muito além de orientadora e orientada, mas de uma amizade baseada na confiança e no respeito mútuo. Você sempre acreditou em mim, incentivou minhas escolhas e esteve presente nos momentos mais decisivos, especialmente agora, nessa reta final. Adri, é impossível não reconhecer o impacto que você teve na minha trajetória. Sempre reforço a minha admiração por você, como profissional brilhante ou como pessoa inspiradora. Saiba que, onde quer que eu esteja, poderá contar comigo para sempre. Amo muito você e serei eternamente grata por tudo.

À minha coorientadora Profa. Dra. Gabrielle Peiter, que depositou sua confiança comigo neste projeto e que tem sido uma inspiração para mim durante todos esses anos de amizade. Obrigada pela sua confiança, conselhos sempre sábios, ensinamentos, pela paciência em cada etapa do projeto ao longo do ano e, acima de tudo, pela generosidade. Sempre falo o quanto admiro você como pessoa e profissional. Jamais perca a sua essência, você é incrível em tudo que faz. Amo você, conte comigo sempre Gabi.

Ao Prof. Dr. Fabio Rosado, minha gratidão pelo aceite em integrar a banca e pelas contribuições valiosas ao longo desses anos. Obrigada pelos momentos de

convívio no laboratório, pelas sugestões sempre enriquecedoras, pelas risadas e pela amizade que construímos. Conte sempre comigo.

Ao Prof. Ricardo Schneider, pela parceria com o projeto, por depositar a confiança do trabalho em mim e pelas singelas e valiosas sugestões ao longo do ano.

A Profa. Dra. Ivonete Bautiz, pelo aceite em fazer parte da banca e a Profa. Dra. Eliane Hermes, como suplente. Tenho certeza de que suas sugestões serão indispensáveis para o aprimoramento da minha dissertação de mestrado. Muito obrigada, professoras, por sua disponibilidade e generosidade.

Em especial a Juliet, minha fiel escudeira no laboratório e ao longo do mestrado. Sempre falo o privilégio que foi ter a sua amizade ao longo desse tempo. Você tornou meus dias mais leves, mesmo nos momentos mais difíceis. Esteve ao meu lado em todas as etapas experimentais do mestrado e, mesmo quando não pôde estar fisicamente presente, nunca deixou de se preocupar, mandando mensagens para saber se tudo tinha corrido bem. Não existem palavras para demonstrar a minha eterna gratidão. Nunca soltou a minha mão, mesmo naqueles dias conturbados, mandando eu respirar (kkk). Ju, acredite sempre nos seus sonhos e nunca duvide do seu potencial. Estarei aqui para tudo o que você precisar. Amo você e conte comigo, sempre.

As minhas colegas de laboratório que também contribuíram de alguma forma. A Bianca, pelas palavras e abraços de apoio, e por sempre levar ou buscar minhas amostras para Toledo nos momentos que eu não conseguiria. A Mariana, pelos conselhos, risadas e desabafos, e principalmente na reta final do mestrado. Minha eterna gratidão meninas, contem comigo.

Ao meu companheiro de vida, Lucas Gonzaga, não há palavras suficientes para agradecer tudo o que você fez e significa para mim. Você nunca mediu esforços para estar ao meu lado, apoiando cada etapa da minha trajetória acadêmica, com seus abraços reconfortantes, suas palavras sábias e sua fé, mesmo nos momentos em que eu não acreditava mais em mim mesma. É uma alegria imensa compartilhar a vida com você. Amo você, hoje e sempre.

Ao meu pai Osmar, aos meus irmãos Francieli e Maciel, a minha sobrinha Victória e a minha eterna saudade diária, mãe Marli (*in memoriam*). Vocês são a minha base e fortaleza. Obrigada pelo apoio em todos os momentos, eu amo muito vocês.

Por fim, agradeço a mim mesma. Por ter tido coragem de enfrentar os desafios, mesmo nos dias em que tudo parecia difícil. Por não desistir, por me levantar após cada tropeço, por acreditar que valia a pena continuar. Agradeço à pessoa que fui no início dessa caminhada, cheia de dúvidas, mas determinada, e à pessoa que me tornei, mais forte, mais confiante e mais resiliente. Este trabalho é uma prova de que, com dedicação e perseverança, somos capazes de realizar nossos sonhos. Hoje, sinto orgulho do caminho que percorri e da pessoa/profissional que me tornei.

RESUMO

O surgimento de cepas de microrganismos resistentes aos antimicrobianos tem incentivado a busca por alternativas, especialmente para inativar cepas resistentes e/ou infecções polimicrobianas. Vidros incorporados com íons metálicos são amplamente estudados devido ao seu potencial antimicrobiano. No entanto, a aplicação de vidros polifosfatos e borofosfatos solúveis, sem metais de transição, como agentes antimicrobianos é pouco relatado. O presente trabalho avalia o potencial antimicrobiano de diferentes vidros de fosfatos bioativos: vidro A (polifosfato de sódio, taxa de aquecimento de 20 °C/min, durante 10 min a 700 °C), vidro L (fosfato com 10% (mol) de boro, obtido com taxa de aquecimento de 20 °C/min, durante 10 min a 700 °C), vidro K (com sódio, obtido com taxa de aquecimento de 20 °C/min, durante 10 min a 800 °C), e padrões P1 (polifosfato cristalino sódio (CAS 10361-03-2)), P2 (hexametáfosfato de Sódio (CAS 68915-31-1)) e P3 (reagente precursor dos vidros fosfato de sódio anidro (CAS 7558-80-7)). A eficácia antimicrobiana de todos os vidros foi testada contra cepas de bactérias Gram-positiva (*Staphylococcus aureus*) e Gram-negativa (*Escherichia coli*), contra a cepa ATCC9028 da levedura *Candida albicans* e contra os fungos filamentosos *Penicillium* sp. e *Stachybotrys chartarum*. A técnica de poço-difusão foi utilizada para avaliar a ação antimicrobiana, enquanto as concentrações inibitórias foram determinadas por microdiluição em caldo (CIM) e bactericida/fungicida mínima (CBM/CFM). As alterações morfológicas dos microrganismos foram avaliadas através de microscopia de fluorescência e eletrônica de varredura (MEV). A caracterização química dos vidros foi realizada por FTIR e medição do pH. No poço-difusão, os vidros A, L e K exibiram efeito inibitório contra *S. aureus*, porém não apresentaram ação contra *E. coli*. Os padrões P1 e P2 inibiram o crescimento apenas de *S. aureus* e o padrão P3 não apresentou efeito inibitório sobre nenhuma das bactérias. Para os fungos, todos os vidros apresentaram ação inibitória. Os padrões P1 e P2 também apresentaram atividade antifúngica, comparado com o P3 que não teve ação em nenhum microrganismo. No teste de estabilidade, nos dias 15 e 30 o vidro L apresentou ação contra *E. coli* e um aumento da ação para os outros microrganismos. A concentração de 125 mg/mL dos vidros foi considerada a melhor concentração testada para a incorporação dos vidros na argamassa. Na microscopia de fluorescência foi possível observar que *C. albicans* foi totalmente inibida na presença da CIM do vidro L (1,95 mg/mL) e na sub-CIM (0,97 mg/mL), a levedura apresentou inibição do crescimento e alterações celulares e de agrupamento. Os fungos filamentosos também apresentaram alterações morfológicas na presença da sub-CIM do vidro L. Na MEV, é possível verificar alterações nas estruturas celulares dos fungos e bactérias testadas. Os espectros de FTIR revelaram que composição e temperatura afetam as ligações químicas e a estrutura dos vidros, e as amostras apresentaram pH mais ácido. Os resultados indicam que os vidros bioativos estudados demonstraram potencial antimicrobiano contra bactérias Gram positivas, fungos filamentosos e levedura.

Palavras-chave: vidros bioativos, polifosfato, microrganismos, antimicrobianos alternativos.

ABSTRACT

The emergence of antimicrobial-resistant strains of microorganisms has encouraged the search for alternatives, particularly to inactivate resistant strains and/or polymicrobial infections. Glasses incorporated with metallic ions have been widely studied due to their antimicrobial potential. However, the application of soluble polyphosphate and borophosphate glasses, without transition metals, as antimicrobial agents has been scarcely reported. This study evaluates the antimicrobial potential of different bioactive phosphate glasses: glass A (sodium polyphosphate-based glass, obtained at a heating rate of 20 °C/min for 10 minutes at 700 °C), glass L (phosphate glass with 10% (mol) of boron, obtained at a heating rate of 20 °C/min for 10 minutes at 700 °C), glass K (sodium glass, obtained at a heating rate of 20 °C/min for 10 minutes at 800 °C), and standards P1 (crystalline sodium polyphosphate (CAS 10361-03-2)), P2 (sodium hexametaphosphate (CAS 68915-31-1)), and P3 (anhydrous sodium dihydrogen phosphate (CAS 7558-80-7)). The antimicrobial efficacy of all glasses was tested against Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*) and Gram-negative bacteria (*Escherichia coli*), the yeast *Candida albicans* (ATCC 9028 strain), and the filamentous fungi *Penicillium* sp. and *Stachybotrys chartarum*. The well-diffusion technique was used to evaluate antimicrobial action, while inhibitory concentrations were determined through broth microdilution (MIC) and minimum bactericidal/fungicidal concentrations (MBC/MFC). Morphological changes in the microorganisms were analyzed using fluorescence and scanning electron microscopy (SEM). The chemical characterization of the glasses was performed using FTIR and pH measurements. In the well-diffusion assay, glasses A, L, and K exhibited inhibitory effects against *S. aureus* but showed no activity against *E. coli*. Standards P1 and P2 inhibited the growth of *S. aureus* only, while standard P3 had no inhibitory effect on any of the bacteria tested. For fungi, all glasses showed inhibitory activity. Standards P1 and P2 also displayed antifungal activity, whereas P3 showed no activity against any microorganisms. In the stability test, on days 15 and 30, the L glass demonstrated activity against *E. coli* and an increased activity against the other microorganisms. The concentration of 125 mg/mL of the glasses was considered the best concentration tested for incorporating the glasses into the mortar. Fluorescence microscopy revealed that *C. albicans* was completely inhibited in the presence of the MIC (1,95 mg/mL) of glass L. At sub-MIC (0,97 mg/mL) levels, yeast growth was inhibited, with observable cellular and aggregation changes. Filamentous fungi also exhibited morphological alterations in the presence of the sub-MIC of glass L. It was possible to verify, by SEM changes in the cellular structures of the tested microorganisms. FTIR analysis revealed that composition and temperature affect the chemical bonds and structure of the glasses, and the samples exhibited a more acidic pH. The results indicate that the bioactive glasses studied demonstrated antimicrobial potential against Gram-positive bacteria, filamentous fungi and yeast.

Keywords: bioactive glasses, polyphosphate, microorganisms, alternative antimicrobials.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - COMPORTAMENTO DA ENTALPIA EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA	19
FIGURA 2 - ASPECTOS MACROMORFOLÓGICOS E MICROMORFOLÓGICOS DE <i>S. aureus</i>	21
FIGURA 3 - ASPECTOS MACROMORFOLÓGICOS E MICROMORFOLÓGICOS DA <i>E. coli</i>	22
FIGURA 4 - ASPECTOS MACROMORFOLÓGICOS E MICROMORFOLÓGICOS DE <i>S. chartarum</i>	23
FIGURA 5 - ASPECTOS MACROMORFOLÓGICOS E MICROMORFOLÓGICOS DE <i>Penicillium</i> sp.	24
FIGURA 6 - ASPECTOS MACROMORFOLÓGICOS E MICROMORFOLÓGICOS DE <i>C. albicans</i>	25
FIGURA 7 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DAS ETAPAS DO EXPERIMENTO.....	30
FIGURA 8 - ESQUEMA ILUSTRATIVO PARA DETERMINAR A CIM, CBM E CFM.....	35
FIGURA 9 - RESULTADOS DO TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIBACTERIANA DOS VIDROS CONTRA <i>S. aureus</i> E <i>E. coli</i> , RESPECTIVAMENTE, POR POÇO-DIFUSÃO.....	42
FIGURA 10 - RESULTADOS DO TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA DOS VIDROS CONTRA <i>C. albicans</i> , <i>S. chartarum</i> E <i>Penicillium</i> sp., RESPECTIVAMENTE, POR POÇO-DIFUSÃO.....	43
FIGURA 11 - RESULTADOS DO TESTE DE ESTABILIDADE, PELA TÉCNICA DE POÇO-DIFUSÃO, DOS VIDROS E PADRÕES AO LONGO DE 30 DIAS PARA <i>S. aureus</i> E <i>E. coli</i>	46
FIGURA 12 - RESULTADOS DO TESTE DE ESTABILIDADE DOS VIDROS E PADRÕES AO LONGO DE 30 DIAS, PELA TÉCNICA DE POÇO-DIFUSÃO, PARA <i>C. albicans</i>	49
FIGURA 13 - RESULTADOS DO TESTE DE ESTABILIDADE DOS VIDROS E PADRÕES AO LONGO DE 30 DIAS, PELA TÉCNICA DE POÇO-DIFUSÃO, PARA <i>S. chartarum</i> E <i>Penicillium</i> sp.....	51

FIGURA 14 - RESULTADO DA CBM PARA <i>S. aureus</i> E <i>E. coli</i>	55
FIGURA 15 - RESULTADOS DA CFM PARA <i>C. albicans</i>	57
FIGURA 16 - RESULTADOS DA CFM PARA <i>S. chartarum</i> E <i>Penicillium</i> sp.	59
FIGURA 17 - RESULTADOS OBTIDOS PARA <i>S. aureus</i> E <i>E. coli</i> APÓS INCORPORAÇÃO DA ARGAMASSA NOS VIDROS E PADRÕES EM DUAS CONCENTRAÇÕES DIFERENTES	63
FIGURA 18 - RESULTADOS OBTIDOS PARA <i>C. albicans</i> APÓS INCORPORAÇÃO DA ARGAMASSA NOS VIDROS E PADRÕES EM DUAS CONCENTRAÇÕES DIFERENTES.....	65
FIGURA 19 - RESULTADOS OBTIDOS PARA <i>S. chartarum</i> E <i>Penicillium</i> sp. APÓS INCORPORAÇÃO DA ARGAMASSA NOS VIDROS E PADRÕES EM DUAS CONCENTRAÇÕES DIFERENTES	66
FIGURA 20 - MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE <i>C. albicans</i> COM CALCOFLUOR WHITE APÓS TRATAMENTO COM O VIDRO L COMPARADO COM O PADRÃO P3.....	70
FIGURA 21 - MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE <i>S. chartarum</i> COM CALCOFLUOR WHITE APÓS TRATAMENTO COM O VIDRO L COMPARADO COM O PADRÃO P3.....	71
FIGURA 22 - MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE <i>Penicillium</i> sp. COM CALCOFLUOR WHITE APÓS TRATAMENTO COM O VIDRO L COMPARADO COM O PADRÃO P3.....	72
FIGURA 23 - MICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DE VARREDURA DE <i>S. aureus</i> APÓS TRATAMENTO COM O VIDRO L COMPARADO COM O PADRÃO P3	73
FIGURA 24 - MICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DE VARREDURA DE <i>S. chartarum</i> APÓS TRATAMENTO COM O VIDRO L COMPARADO COM O PADRÃO P3	74
FIGURA 25 - MICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DE VARREDURA DE <i>Penicillium</i> sp. APÓS TRATAMENTO COM O VIDRO L COMPARADO COM O PADRÃO P3	75
FIGURA 26 - PERFIL ELETROFORÉTICO (PAGE) DOS VIDROS E PADRÕES AVALIADOS NO DIA 1 E NO DIA 30 DE DILUIÇÃO	77
FIGURA 27 - ESPECTROS DE FTIR OBTIDOS DOS VIDROS	79

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS DOS VIDROS DE POLIFOSFATOS.	32
TABELA 2 -CARACTERÍSTICAS DOS PADRÕES.....	33
TABELA 3 - RESULTADO DAS MÉDIAS DOS HALOS DE INIBIÇÃO PARA TODOS OS MICRORGANISMOS NO TESTE DE POÇO-DIFUSÃO	44
TABELA 4 - TESTE DE ESTABILIDADE AO LONGO DOS 30 DIAS COM AS MÉDIAS DOS HALOS DE INIBIÇÃO PARA <i>S. aureus</i> NO TESTE DE POÇO-DIFUSÃO	47
TABELA 5 - TESTE DE ESTABILIDADE AO LONGO DOS 30 DIAS COM AS MÉDIAS DOS HALOS DE INIBIÇÃO PARA <i>E. coli</i> NO TESTE DE POÇO-DIFUSÃO	48
TABELA 6 - TESTE DE ESTABILIDADE AO LONGO DOS 30 DIAS COM AS MÉDIAS DOS HALOS DE INIBIÇÃO PARA <i>C. albicans</i> NO TESTE DE POÇO-DIFUSÃO	50
TABELA 7 - TESTE DE ESTABILIDADE AO LONGO DOS 30 DIAS COM AS MÉDIAS DOS HALOS DE INIBIÇÃO PARA <i>S. chartarum</i> NO TESTE DE POÇO-DIFUSÃO	52
TABELA 8 - TESTE DE ESTABILIDADE AO LONGO DOS 30 DIAS COM AS MÉDIAS DOS HALOS DE INIBIÇÃO PARA <i>Penicillium</i> sp. NO TESTE DE POÇO-DIFUSÃO	53
TABELA 9 - VALORES DAS CONCENTRAÇÕES INIBITÓRIAS MÍNIMAS (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) DOS VIDROS E PADRÕES PARA <i>S. aureus</i> E <i>E. coli</i>	56
TABELA 10 - VALORES DAS CONCENTRAÇÕES INIBITÓRIAS MÍNIMAS (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) DOS VIDROS E PADRÕES PARA <i>C. albicans</i>	58
TABELA 11 - VALORES DAS CONCENTRAÇÕES INIBITÓRIAS MÍNIMAS (CIM) E CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM) DOS VIDROS E PADRÕES PARA <i>S. chartarum</i> E <i>Penicillium</i> sp.....	60
TABELA 12 - ZONAS DE INIBIÇÃO (mm) DOS RESULTADOS OBTIDOS COM <i>S. aureus</i> E <i>E. coli</i> EM DUAS CONCENTRAÇÕES DIFERENTES NOS TESTES COM	

A ARGAMASSA	64
TABELA 13 - ZONAS DE INIBIÇÃO (mm) DOS RESULTADOS OBTIDOS COM <i>C. albicans</i> , <i>S. chartarum</i> E <i>Penicillium</i> sp. EM DUAS CONCENTRAÇÕES DIFERENTES NOS TESTES COM A ARGAMASSA.....	67
TABELA 14 - VALORES DOS pH OBTIDOS PARA OS VIDROS E PADRÕES.....	78
TABELA 15 - MODOS VIBRACIONAIS NO ESPECTRO INFRAVERMELHO.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC - *American Type Collection Culture*

BDA - Batata Dextrose Agar

BHI - *Brain Heart Infusion*

C. albicans - *Candida albicans*

CBM - Concentração bactericida mínima

CCT - Coleção de Culturas Tropical

CFM - Concentração fungicida mínima

CIM - Concentração inibitória mínima

CLSI - *Clinical & Laboratory Standards Institute*

CPD - *Critical Point Dryer*

CW - *Calcofluor White*

DP - Desvio padrão

DSMZ - *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Germani*

E. coli - *Escherichia coli*

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

FDA - *Food and Drug Administration* dos EUA

FTIR - Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier

KBr - Brometo de potássio

KOH - Hidróxido de potássio

LPS - Lipopolissacarídeos

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

MH - *Müller-Hinton*

MOPS - Ácido 3-morfolinopropano 1-sulfônico

MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à metilina

NaCl - Cloreto de sódio

NaH₂PO₄ - Fosfato de Sódio

(NaPO₃)₆ - Hexametáfosfato de Sódio

(NaPO₃)_n - Polifosfato de Sódio

NCCLS - *National Committee for Clinical Laboratory Standards*

NEMA - Laboratório Experimental de Micologia Aplicada

NPs - Nanopartículas

AgNPs - Nanopartículas de prata

PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida

PBS - Solução salina tamponada com fosfato

PCA - *Plate Count Agar*

polyP - Polifosfatos inorgânicos

ppm - Partes por milhão

RNM - Ressonância Magnética Nuclear

RPMI - Roswell Park Memorial Institute

S. aureus - *Staphylococcus aureus*

S. chartarum - *Stachybotrys chartarum*

sp - Espécie

spp - Espécies

TBE - Tris/Borato/EDTA

TEMED - Tetrametiletilenodiamina

UFC - Unidade formadora de colônias

UFPR - Universidade Federal do Paraná

UTFPR - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

YM - *Yeast malt*

10% Boro NaH_2PO_4 - Fosfato de Sódio com 10% de boro

LISTA DE SÍMBOLOS

μ - Micro

® - Marca registrada

β - Beta

α - Alfa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 OBJETIVOS.....	16
1.1.1 Objetivo geral.....	16
1.1.2 Objetivos específicos	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 DEFINIÇÃO E ASPECTOS GERAIS SOBRE VIDROS	18
2.2 VIDROS DE FOSFATOS E SUAS PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS	19
2.3 MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS	20
2.3.1 Bactérias.....	20
2.3.2 Fungos e leveduras	22
2.4 COLONIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA EM SUPERFÍCIES DE REVESTIMENTO	25
2.5 PRODUTOS INCORPORADOS EM MATERIAIS DE CONSTRUÇÃO COM POTENCIAL ANTIMICROBIANO E A LEGISLAÇÃO.....	27
3 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 LOCAL DE DESENVOLVIMENTO.....	30
3.2 MICRORGANISMOS UTILIZADOS	31
3.2.1 Bactérias.....	30
3.2.2 Fungos e leveduras	31
3.3 MANUTENÇÃO DOS MICRORGANISMOS	31
3.4 VIDROS DE POLIFOSFATOS	32
3.5 DILUIÇÃO DOS VIDROS DE POLIFOSFATOS.....	33
3.6 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE DOS MICRORGANISMOS AOS VIDROS PELA TÉCNICA DE POÇO-DIFUSÃO.....	33
3.6.1 Avaliação da estabilidade dos vidros diluídos durante 30 dias por poço-difusão.....	34
3.7 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE DOS MICRORGANISMOS AOS VIDROS, PELA TÉCNICA DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO	34
3.7.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), dos vidros, contra as bactérias	35
3.7.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos vidros contra fungos e levedura.....	36
3.7.3 Determinação da CBM (Concentração Bactericida Mínima) e CFM (Concentração Fungicida Mínima)	37
3.8 AVALIAÇÃO FORMULAÇÕES DE VIDROS INCORPORADOS EM ARGAMASSA, POR POÇO-DIFUSÃO	38
3.9 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.....	38
3.10 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	39
3.11 AVALIAÇÃO DE POLIFOSFATOS POR PAGE (ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA).....	40
3.12 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS VIDROS.....	40
3.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	41
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1 SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA AOS VIDROS - TÉCNICA DE POÇO-DIFUSÃO.....	42

4.2 RESULTADOS DO TESTE DE ESTABILIDADE DOS VIDROS DILUÍDOS AO LONGO DE 30 DIAS POR POÇO-DIFUSÃO	45
4.3 DETERMINAÇÃO DA CIM DOS VIDROS, POR MICRODILUIÇÃO EM CALDO	54
4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, POR POÇO-DIFUSÃO, DOS VIDROS INCORPORADOS NA ARGAMASSA	62
4.5 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DOS FUNGOS	69
4.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	73
4.7 AVALIAÇÃO DE POLIFOSFATOS POR PAGE (ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA).....	76
4.8 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS VIDROS.....	78
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	82
REFERÊNCIAS.....	83
APÊNDICE A - RESULTADOS DO TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA (CIM) DOS VIDROS E PADRÕES PARA <i>S. aureus</i> AO LONGO DE 30 DIAS.....	94
APÊNDICE B - RESULTADOS DO TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA (CIM) DOS VIDROS E PADRÕES PARA <i>E. coli</i> AO LONGO DE 30 DIAS.....	95
APÊNDICE C - RESULTADOS DO TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA (CIM) DOS VIDROS E PADRÕES PARA <i>C. albicans</i> AO LONGO DE 30 DIAS.....	96
APÊNDICE D - RESULTADOS DO TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA (CIM) DOS VIDROS E PADRÕES PARA <i>S. chartarum</i> AO LONGO DE 30 DIAS.....	97
APÊNDICE E - RESULTADOS DO TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA (CIM) DOS VIDROS E PADRÕES PARA <i>Penicillium</i> sp. AO LONGO DE 30 DIAS.....	98

1 INTRODUÇÃO

As superfícies de construções expostas a condições úmidas são propensas ao crescimento de algas, fungos e bactérias, e biocidas são aplicados a alguns destes materiais para inibir o seu crescimento (KOHZADI et al., 2024).

Várias espécies de fungos e bactérias podem ser encontradas em ambientes internos (ARIF et al., 2016). A colonização de microrganismos nesses ambientes apresenta impactos adversos na saúde, mas também influenciam a integridade estrutural básica de um edifício. O crescimento dos microrganismos pode ser afetado por múltiplos fatores como umidade, temperatura e pH (OGBULIE e OBI AJURU, 2004).

Os microrganismos modificam naturalmente os materiais nos quais crescem ativamente, o que é conhecido como biodeterioração devido ao impacto dos produtos extracelulares que produzem e, no caso dos fungos, ao seu crescimento invasivo (LOPES et al., 2023). Podem danificar superfícies pintadas por causarem descoloração, pelo aumento da porosidade da camada de tinta, diminuição da resistência física e por permitirem que a umidade penetre facilmente pela superfície (UNGER, 2001; MADUKA, 2019).

Os fungos são geralmente considerados os principais agentes capazes de deteriorar superfícies. Podem crescer em uma grande variedade de superfícies, incluindo edifícios (internos e exteriores), alimentos, matéria orgânica em decomposição e em qualquer local úmido (AU YEUNG et al., 2017). Sob condições de temperatura constante, com umidade relativa de até 95%, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Eurotium* superaram outros fungos encontrados em ambientes internos (PARALKAR e DAMLE, 2024). Além do papel na deterioração, alguns fungos como espécies de *Penicillium*, *Alternaria* e *Strachybotrys* podem afetar a saúde das pessoas ao produzir micotoxinas tóxicas (TRIBELHORN et al., 2023). Foi demonstrado que os esporos de espécies de *Alternaria* e *Penicillium* causam asma do tipo imediata e tardia em indivíduos já sensibilizados a esses organismos (COOLEY et al., 2004).

No entanto, dependendo do ambiente, como hospitais, bactérias resistentes a antibióticos, como *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, *Enterococcus* resistente à vancomicina e *Clostridium difficile*, são microrganismos epidemiologicamente importantes, que têm chamado muita atenção, causando

milhões de mortes e aumentando os custos do sistema de saúde (HASSAN et al., 2010).

Os vidros à base de fosfato, devido à sua capacidade de dissolução a uma taxa constante e à sua natureza não tóxica, ganharam interesse significativo como sistemas de distribuição localizada para fornecer íons metálicos antimicrobianos diretamente ao local de interesse. Nos últimos anos, vidros bioativos misturados com óxidos metálicos como cobalto, cobre, gálio, prata e zinco têm sido amplamente investigados por sua eficácia antimicrobiana contra uma série de microrganismos clinicamente significativos (RAJA et al., 2022).

Para restringir a proliferação de microrganismos, diferentes compostos antimicrobianos são adicionados pelas empresas fabricantes de revestimentos e tintas. Por exemplo, organoclorados e sais de amónio quaternário são utilizados para evitar o crescimento de microrganismos, mas representam um problema de saúde devido à sua toxicidade (AUYEUNG et al., 2017).

Os fungicidas e bactericidas comumente usados para controlar o crescimento de microrganismos muitas vezes não são apropriados para aplicações internas e, portanto, compostos alternativos devem ser utilizados (BELLOTTI et al., 2013). Neste sentido, este trabalho apresenta um estudo do potencial antimicrobiano de formulações de vidros polifosfatos sem metais de transição que poderão ser utilizadas na incorporação de tintas e revestimentos para construções, podendo contribuir para proteger e prevenir a biodeterioração dos substratos e criar ambientes mais saudáveis.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana de diferentes formulações de vidros, que podem ser utilizadas como aditivos em formulações de revestimentos ou tintas para controlar a proliferação de fungos e bactérias.

1.1.2 Objetivos específicos

- Determinar a concentração inibitória mínima e microbicida mínima de três formulações de vidro bioativos: A (vidro polifosfato de sódio), L (vidro borofosfato de sódio 10% (mol B)), K (vidro polifosfato de sódio), e os padrões P1 (polifosfato de sódio (CAS 10361-03-2)), P2 (hexametáfosfato de Sódio (CAS 68915-31-1)) e P3 (hidrogenofosfato de sódio monobásico anidro (NaH_2PO_4) (CAS 7558-80-7), contra bactérias (*S. aureus* e *E. coli*), a levedura *C. albicans* e os fungos filamentosos *Penicillium* sp. e *S. chartarum*.
- Avaliar as alterações na morfologia celular desses microrganismos através de microscopia de fluorescência e microscopia eletrônica de varredura.
- Verificar a estabilidade dos vidros e as características químicas e moleculares, como pH, perfil por FTIR e perfil eletroforético.

2 REVISÃO DE LITERATURA

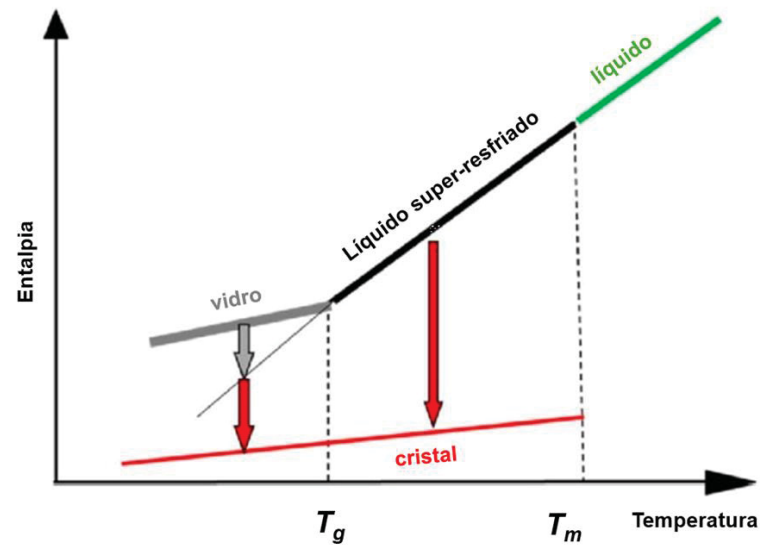
2.1 DEFINIÇÃO E ASPECTOS GERAIS SOBRE VIDROS

Vidros são definidos como um material líquido amorfo amplamente utilizado em diversas aplicações por conta de suas propriedades. De uma forma geral, são produzidos pelo aquecimento e resfriamento de materiais inorgânicos com o objetivo de atingir o seu estado rígido. No entanto, diversas definições são encontradas na literatura gerando algumas controvérsias (KARASU et al., 2017).

Em 2017, Zanotto e Mauro propuseram uma definição mais ampla que melhor define sobre vidros. Eles se caracterizam como um material não cristalino, fora do equilíbrio termodinâmico, que se comporta temporariamente como um sólido, mas que possui a tendência de relaxar e retornar para o seu estado líquido. Além disso, o vidro é amorfo, ou seja, ele não apresenta uma estrutura cristalina regular. Portanto, os átomos ou moléculas que compõem a sua estrutura estão dispostos de forma desordenada. A estrutura desse material tende ao relaxamento em direção ao estado líquido super-resfriado, seguida do processo de solidificação.

Líquidos em temperaturas abaixo de seus pontos de fusão são chamados de líquidos super-resfriados. Conforme descrito abaixo, resfriar um líquido super-resfriado abaixo da temperatura de transição vítrea T_g produz um vidro. O diagrama de transição vítrea está representado na Figura 1.

FIGURA 1 - COMPORTAMENTO DA ENTALPIA EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA



FONTE: Adaptado de Zanotto e Mauro (2017).

LEGENDA: T_m : ponto de fusão ou temperatura líquida. T_g : temperatura de transição vítrea.

A Figura 1 ilustra a relação entre entalpia e temperatura para diferentes estados da matéria do vidro: líquido, líquido super-resfriado, vidro e cristal. Acima da temperatura de fusão (T_m), o material se encontra no estado líquido, onde é representado pela linha verde, em que a entalpia aumenta conforme o aumento da temperatura. O processo de resfriamento ocorre abaixo da T_m , onde o material entra no estado de líquido super-resfriado (linha preta), sendo indicativo de uma fase onde o material pode cristalizar com o tempo (setas vermelhas). Abaixo da temperatura de transição vítrea (T_g), o líquido super-resfriado se transforma em vidro, após passar a T_g , representado pela linha cinza (ZANOTTO e MAURO, 2017).

2.2 VIDROS DE FOSFATOS E SUAS PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS

Os vidros de fosfatos são materiais com uma ampla gama de aplicações devido às suas propriedades versáteis, que dependem diretamente de sua composição química. Esses materiais podem ser utilizados em áreas como fabricação de lasers, fibras ópticas, condutores elétricos, revestimentos, processos de recuperação por lixiviação, agricultura e biotecnologia, entre outras (EDIGER et al., 1996; MENDES et al., 2018; HEKMAT-SHOAR et al., 1985; KUMAR, 1985; PYARE, 2003). A capacidade do fósforo de atuar como formador de rede é atribuída principalmente ao P_2O_5 , o único óxido de fósforo capaz de formar vidros. Sua estrutura é composta por tetraedros de fosfato (PO_4) conectados por ligações covalentes, formando cadeias que podem variar

em extensão e, conseqüentemente, alterar as propriedades do material (DIAS FILHO, 2003). Embora apresentem baixa resistência química à água e menor rigidez, essas características podem ser melhoradas pela adição de óxidos modificadores, como MgO, Al₂O₃, SiO₂ e B₂O₃, que aumentam sua estabilidade e resistência (DONALD, 1993; VARSHNEYA e MAURO, 2019).

Os vidros borofosfatos, que combinam P₂O₅ e B₂O₃, apresentam vantagens adicionais. O B₂O₃ também atua como formador de rede, mas suas estruturas básicas, os anéis boroxol (B₃O₆), podem ser modificadas com a adição de óxidos ou pelo aumento da temperatura de fusão. Isso resulta na formação de grupos estruturais como diboratos, metaboratos e ortoboratos, promovendo alterações significativas nas propriedades térmicas e mecânicas do material. A combinação entre P₂O₅ e B₂O₃ proporciona maior estabilidade térmica, reduz higroscopicidade e taxa de dissolução, além de aumentar a resistência da rede vítrea (SHARMIN et al., 2013; SHARMIN et al., 2016; YADAV et al., 2016).

Estudos recentes destacam o potencial antimicrobiano dos vidros, tornando-os relevantes em áreas como biotecnologia, medicina e farmacologia. A combinação de fosfato monopotássico (KH₂PO₄), fosfato de sódio (NaH₂PO₄) e ácido bórico (H₃BO₃) em matrizes vítreas apresenta propriedades antimicrobianas únicas que não seriam alcançadas em seu estado cristalino. A transição para o estado vítreo possibilita a formação de uma matriz homogênea, onde os compostos interagem de forma sinérgica para oferecer benefícios antimicrobianos e maior funcionalidade. Essa abordagem representa um avanço significativo no desenvolvimento de materiais inovadores com potencial para combater microrganismos e melhorar a qualidade de vida (ÖZGÜR et al., 2011; VERNÉ et al., 2009).

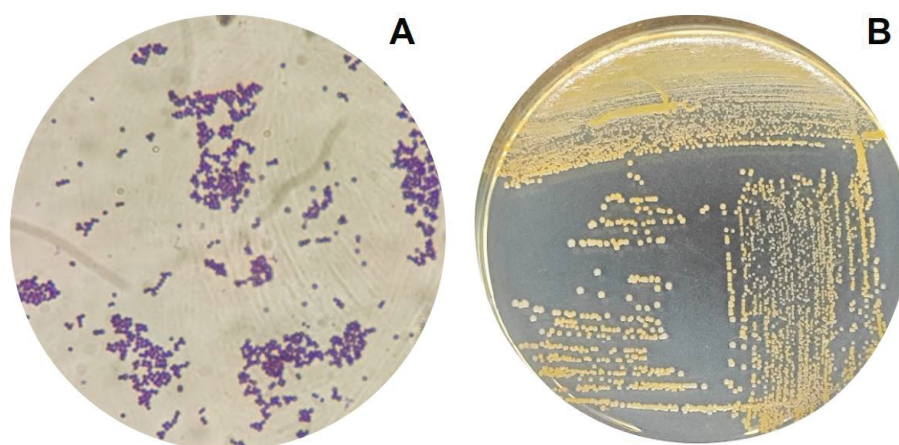
2.3 MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS

2.3.1 Bactérias

A resistência antimicrobiana representa uma ameaça crescente à saúde pública mundial. A resistência ocorre quando microrganismos, como bactérias patogênicas, desenvolvem mecanismos de resistência contra substâncias antimicrobianas. Entre os patógenos, estão *S. aureus* e *E. coli* como responsáveis por uma variedade de infecções em humanos e no ambiente (ZIA et al., 2023).

S. aureus é uma bactéria Gram-positiva, não formadora de esporos, sem motilidade, com formato esférico (cocos) e tendência de formar aglomerados que lembram cachos de uvas. Em meios de cultura como o agar PCA (*Plate Count Agar*), as colônias são arredondadas, com bordas bem definidas, superfície lisa e brilhante e coloração amarela (FIGURA 2).

FIGURA 2 - ASPECTOS MACROMORFOLÓGICOS E MICROMORFOLÓGICOS DE *S. aureus*

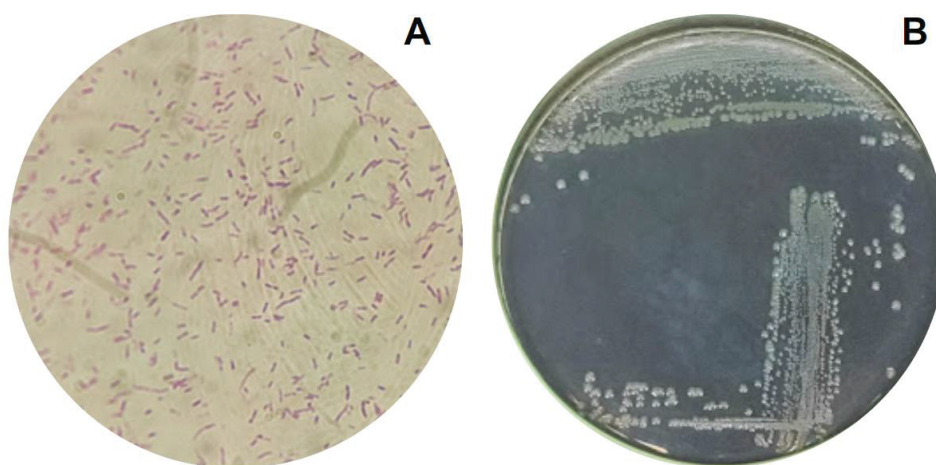


FONTE: A autora (2024).

LEGENDA: (A) Micrografia de *S. aureus* corada pela técnica de Coloração de Gram, com aumento de 1000x com óleo de imersão, apresentando aspecto morfotintorial Gram-positiva cocos e estafilocos (cachos). (B) Placa de Petri com agar PCA, cepa ATCC 6538 de *S. aureus* após 24h de incubação a 37 °C.

Esse patógeno oportunista é encontrado principalmente na cavidade nasal e na pele humana, causando uma variedade de infecções, que podem variar de infecções leves até infecções invasivas graves como bacteremia ou septicemia. Sua morfologia e características de crescimento são cruciais para entender sua patogenicidade e sobrevivência em ambientes diferentes (HOWDEN et al., 2023).

E. coli é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbia facultativa, pertencente à família *Enterobacteriaceae*. Apresenta formato de bastonetes (bacilo) e pode apresentar motilidade. No agar PCA, as colônias são arredondadas, com bordas bem definidas, superfície lisa e brilhante e coloração branca (FIGURA 3).

FIGURA 3 - ASPECTOS MACROMORFOLÓGICOS E MICROMORFOLÓGICOS DA *E. coli*

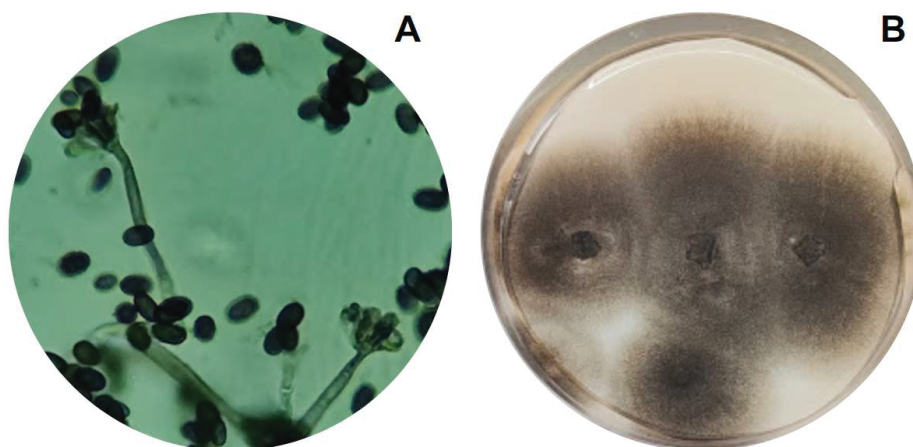
FONTE: A autora (2024).

Legenda: (A) Micrografia de *E. coli* corada pela técnica de Coloração de Gram, com aumento de 1000x com óleo de imersão apresentando aspecto morfotintorial Gram-negativa bastonetes (bacilo). (B) Placa de Petri contendo agar PCA com a cepa ATCC 25922 *E. coli*, após 24h de incubação a 37°C.

A espécie de *E. coli* é amplamente distribuída no ambiente e encontrada facilmente no trato gastrointestinal de indivíduos saudáveis. No entanto, algumas cepas podem causar diversas doenças e são classificadas de acordo com os fatores de virulência e mecanismos de patogenicidade: enteropatogênica (EPEC), enterohemorrágica (EHEC/STEC), enterotoxigênica (ETEC), enteroagregativa (EAEC), enteroinvasiva (EIEC) e difusamente aderente (DAEC) (BRAZ et al., 2020).

2.3.2 Fungos e leveduras

S. chartarum, pertencente ao Filo Ascomycota e comumente conhecido como mofo preto, é um fungo patogênico produtor de micotoxinas. Apresenta hifas septadas formando conidióforos marrom-escuro (DYLAĞ et al., 2022). O agar Aveia é considerado o meio de cultura adequado para esse fungo, facilitando a formação dos conidióforos. No microscópio, é possível observar hifas septadas, conidióforos hialinos ou pigmentados, simples ou ramificados. Na placa, apresenta superfície pulverulenta (aspecto de pó), cor enegrecida na superfície com reverso da colônia cinza a preto (FIGURA 4).

FIGURA 4 - ASPECTOS MACROMORFOLÓGICOS E MICROMORFOLÓGICOS DE *S. chartarum*

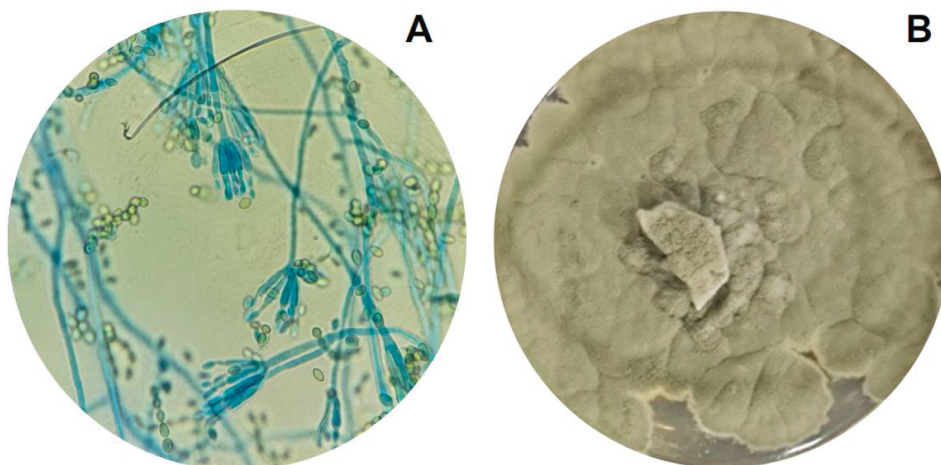
FONTE: A autora (2024).

Legenda: (A) Micrografia de *S. chartarum* corada com o corante Lactofenol Azul de Algodão, com aumento de 400x apresentando esporos, hifas septadas e conidióforos. (B) Placa de Petri contendo agar Aveia com *S. chartarum*, após 10 dias de incubação a 24 °C.

Esse fungo está amplamente distribuído no ambiente, principalmente em locais com maior presença de umidade, como materiais de construção, infiltrações no interior de edifícios e em locais com alto teor de celulose como madeira e papel de parede. As satratoxinas são um grupo de micotoxinas produzidas pelo *S. chartarum* altamente tóxico para humanos e animais quando inaladas, ingeridas ou em contato cutâneo (IBRAHIM et al., 2022).

O gênero *Penicillium*, pertencente ao Filo Ascomycota, é um fungo facilmente encontrado no ambiente. No microscópio, apresentam hifas septadas e hialinas, com conidióforos simples ou ramificados. No agar BDA (Batata Dextrose Agar), apresenta textura aveludada, pulverulenta e cor verde oliva na superfície com o reverso da colônia geralmente claro a amarelado (VISAGIE et al., 2014).

FIGURA 5 - ASPECTOS MACROMORFOLÓGICOS E MICROMORFOLÓGICOS DE *Penicillium* sp.

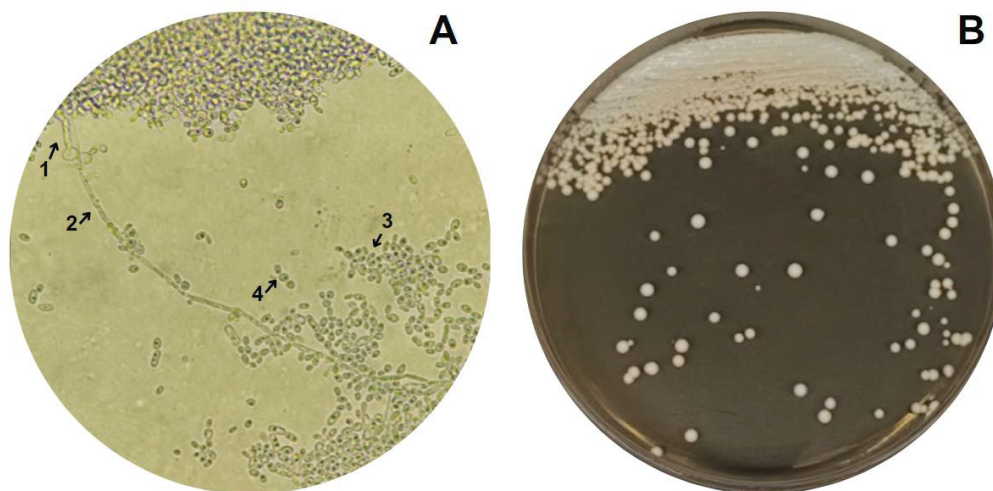


FONTE: A autora (2024).

Legenda: (A) Micrografia de *Penicillium* sp. corado com Lactofenol Azul de Algodão, evidenciando as diferentes estruturas através do microcultivo em agar BDA, aumento de 1000x com óleo de imersão. (B) Placa de Petri contendo agar BDA com o fungo *Penicillium* sp., após 7 dias de incubação a 28 °C.

É um fungo saprotrófico, frequentemente encontrado na matéria orgânica em decomposição, além de materiais de construção e paredes, onde desempenha um papel significativo na deterioração. Algumas espécies são termotolerantes, capazes de crescer acima de 37 °C, enquanto outras crescem facilmente a 25 °C em poucos dias. Além disso, produzem uma grande quantidade de esporos exógenos, facilmente disseminados no ar, contaminando diversos ambientes. A presença desse fungo no ambiente pode representar riscos à saúde, especialmente pela inalação de toxinas por ele produzidas, causando sintomas respiratórios (GUEVARA-SUAREZ et al., 2016; ALEKSIC et al., 2017).

C. albicans é uma levedura diploide com reprodução de forma assexuada, formando diferentes estruturas como clamidoconídios, blastoconídios, pseudohifas e hifas. Além disso, é dimórfica, ou seja, na fase infectante apresenta blastoconídios e na fase parasitária a forma filamentosa. Na Figura 6, é possível observar diferentes estruturas da *Candida* através da técnica de microcultivo em agar Fubá com Tween 80. No agar BDA, apresenta coloração bege brilhante e cremosa, superfície lisa, bordas regulares e odor específico (JAYATILAKE, 2011 e BETTAUER et al., 2022).

FIGURA 6 - ASPECTOS MACROMORFOLÓGICOS E MICROMORFOLÓGICOS DE *C. albicans*

FONTE: A autora (2024).

Legenda: (A) Micrografia de *C. albicans* evidenciando as diferentes estruturas através do microcultivo em agar Fubá com Tween 80, aumento de 400x: (1) Clamidoconídio, (2) Hifa, (3) Blastoconídio e (4) Pseudohifa. (B) Placa de Petri contendo agar BDA com a cepa ATCC 90028 *C. albicans*, após 72h de incubação a 35 °C.

A levedura patogênica está associada a infecções nosocomiais, principalmente em indivíduos imunocomprometidos. Em casos mais graves, gera infecções invasivas como candidemia (infecção invasiva no sangue). Atualmente, a resistência antifúngica de *C. albicans* vem gerando uma preocupação crescente. Essa resistência está atribuída a vários mecanismos, como mutações genéticas e a capacidade de formar biofilme em superfícies abióticas. Os azóis, como o antifúngico fluconazol, vem apresentando altos índices de resistência devido à sua utilização prolongada e uso inadequado (COSTA-DE-OLIVEIRA et al., 2020 e ATRIWAL e RODRIGUES, 2021).

2.4 COLONIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA EM SUPERFÍCIES DE REVESTIMENTO

Ambientes internos e externos, como residências, prédios e hospitais, podem abrigar uma ampla variedade de microrganismos, incluindo bactérias, fungos e leveduras. A presença desses microrganismos está diretamente ligada a alguns fatores, como umidade e temperatura. A proliferação desses organismos pode gerar diversos impactos negativos, que vão desde o comprometimento da saúde humana até a integridade estrutural dos locais.

Dentre todos os microrganismos, os fungos estão entre os principais encontrados em superfícies de construção, como paredes, tintas, argamassas e *drywall* (placas de gesso pré-fabricadas). A composição desses materiais influencia diretamente no crescimento fúngico, especialmente devido à presença de alguns componentes orgânicos, como a celulose, que serve como substrato para os fungos. Além disso, materiais com alta porosidade, como argamassas e gessos, retêm mais umidade, criando ótimas condições para a colonização e desenvolvimento desses microrganismos. Dentre os fungos causadores de mofo de parede, *S. chartarum* e *Penicillium* sp. estão entre os mais relatados na literatura em diferentes estruturas (HOLME et al., 2019).

S. chartarum cresce principalmente em materiais ricos em celulose e em ambientes com alto teor de umidade. Além disso, o pH também pode influenciar, crescendo em uma faixa de 3,0 a 9,8. A temperatura ideal para o crescimento está em torno de 20 a 25 °C. A presença desse fungo em ambientes representa riscos significativos à saúde devido a produção de micotoxinas, em especial a satratoxinas (DYLAG et al., 2022). Em um estudo realizado em 2021, Piontek e Łuszczczyńska identificaram *S. chartarum* em superfícies internas de parede em um prédio na Polônia. Portanto, a escolha de materiais resistentes e com propriedades antimicrobianas é essencial para prevenir o crescimento fúngico em superfícies de materiais de construção.

Ozoaduche e Idemudia (2021) identificaram diversos fungos presentes nas paredes de banheiros localizados na cidade de Benin, na Nigéria. Dentre os fungos encontrados, duas espécies do gênero *Penicillium* foram relatados, *P. cyclopium* (21,40%) e *P. oxalicum* (14,89%). Na Alemanha, o gênero *Penicillium* foi o mais encontrado em materiais de construção como papéis de parede infestados de mofo (LINDEMANN et al., 2022). Além dos fatores de umidade e temperatura, outro fator influencia diretamente na presença de esporos fúngicos transportados pelo ar. Locais com ventilações inadequadas tendem a acumular esporos de fungos, como o *Penicillium* sp., favorecendo a colonização em superfícies diferentes (ABDEL-HAMEED et al., 2012).

Leveduras do gênero *Candida* são patógenos fúngicos conhecidos pela sua capacidade de formar biofilmes. As características do biofilme dependem da capacidade de cada espécie de produzir substâncias poliméricas extracelulares (EPS) e exibir crescimento dimórfico, mas também do substrato do biofilme, disponibilidade

de fonte de carbono e outros fatores (CAVALHEIRO e TEIXEIRA, 2018). A adesão de biofilmes em superfícies abióticas depende de propriedades como temperatura, pH e composição da superfície (ALONSO et al., 2023). Em um estudo realizado em 2008, Sobrinho identificou a presença de fungos como *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Acremonium* sp. e *Candida* em revestimento de argamassa em habitações de interesse social, tornando-se nocivos para a saúde humana. Dentre as espécies de *Candida* que exibem maior capacidade de adesão a superfícies abióticas encontram-se a *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. albicans* (CAVALHEIRO e TEIXEIRA, 2018).

E. coli, *S. aureus* e bactérias do gênero *Bacillus* são alguns dos microrganismos que podem se desenvolver facilmente no ambiente podendo causar danos à saúde humana e às estruturas de construção civil (KIRTHIKA, 2023). Bactérias associadas ao processo de biodeterioração de edifícios crescem formando biofilmes que possibilitam a adesão em superfícies e a proteção contra agentes antimicrobianos (JADHAV et al., 2010). Em um estudo realizado na Malásia, Rasli e colaboradores (2021) identificaram que aproximadamente 20% dos microrganismos encontrados no interior de edifícios, como residências e hospitais, pertencem ao gênero *Staphylococcus* spp. Fatores como poeira acumulada, alto índice de umidade e ventilação inadequada facilitam a proliferação destes microrganismos. Além de *S. aureus*, bactérias do gênero *Escherichia* também podem ser encontradas em tintas causando a degradação do material (OBIDI et al., 2009).

2.5 PRODUTOS INCORPORADOS EM MATERIAIS DE CONSTRUÇÃO COM POTENCIAL ANTIMICROBIANO E A LEGISLAÇÃO

A formação de mofo e agregação bacteriana em superfícies de ambientes internos é um problema comum que pode ocasionar diversos problemas à saúde. As questões relacionadas com a umidade surgem consistentemente como desafios significativos na construção civil, constituindo alguns dos problemas mais comuns encontrados em edificações. Algumas propriedades dos materiais, tais como composição, porosidade, permeabilidade, rugosidade superficial, em combinação com a umidade criam condições favoráveis para a proliferação de microrganismos, principalmente fungos, tanto em estruturas internas como externas (SHIRAKAWA et al., 2003). Portanto, é crucial abordar a questão do crescimento de microrganismos nessas superfícies. Uma abordagem promissora envolve a incorporação de agentes

antimicrobianos ou compostos bioativos em materiais de construção, tornando-se uma estratégia eficaz na prevenção da proliferação de microrganismos. A finalidade desses produtos é aumentar a durabilidade das estruturas, reduzindo por exemplo, a formação de mofos, deterioração de materiais e impactos negativos à saúde humana (DA SILVA et al., 2019).

O uso de nanopartículas de prata (AgNPs) incorporados em argamassas e tintas vem ganhando destaque na indústria devido a sua atividade antimicrobiana. Recentemente, De Paiva e colaboradores (2024) incorporaram as AgNPs em argamassa contra *Aspergillus* e *Fusarium*, observando uma maior ação contra *F. oxysporum*, com uma redução de 57% do crescimento fúngico quando adicionado nas concentrações de 54 µg/mL de AgNPs na argamassa e 108 µg/mL com 99% de inibição. Os autores também verificaram que não houve alterações significativas nas propriedades mecânicas da argamassa, em comparação com o grupo controle.

Embora as AgNPs sejam amplamente reconhecidas por suas propriedades antimicrobianas, há controvérsias quanto à incorporação em diferentes materiais e seus potenciais efeitos toxicológicos ambientais, contaminando solo e água (IHTISHAM et al., 2021). A liberação de íons de prata no ambiente, principalmente devido à lixiviação de materiais como tintas e argamassas, pode ser prejudicial para organismos aquáticos e plantas, comprometendo a biodiversidade. A nanotecnologia verde é uma tecnologia utilizada atualmente para sintetizar nanopartículas (NPs) de uma maneira sustentável e ecologicamente correta através da síntese verde, onde é utilizado plantas, microrganismos ou outros compostos naturais, de forma mais sustentável, para diminuir os impactos das AgNPs. No entanto, essa técnica ainda enfrenta limitações, sendo necessário a busca por novas alternativas ecologicamente sustentáveis (TEMIZEL-SEKERYAN e HICKS, 2020, ARORA et al., 2024).

Sais de chumbo podem fazer parte da composição de tintas para melhorar a cor, aumentar o brilho, promover propriedades anticorrosivas e acelerar o processo de secagem, o que resulta em uma alta durabilidade e resistência à umidade (RANJBAR et al., 2023). No entanto, devido seu alto grau de toxicidade, torna-se necessária a substituição de compostos a base de chumbo em alguns tipos de tinta para garantir o direito à saúde humana e cuidados com o meio ambiente. A Lei Nº 11.762, de 1º de Agosto de 2008, fixa o limite máximo permitido de chumbo em tintas imobiliárias, vernizes e materiais similares de revestimento de superfícies, estabelecendo 0,06%, em peso equivalente a 600 ppm (partes por milhão). Em 2023,

o projeto de Lei 3428/2023 estabeleceu novos limites de concentração do chumbo, passando para o limite máximo de 90 ppm, justificando que o desenvolvimento de novas tecnologias tornou-se possível a substituição de matérias-primas utilizadas na produção de tintas sem desvalorizar o produto final (BRASIL, Congresso Nacional, 2023).

Uma variedade de espécies de fungos pode ser capaz de colonizar e penetrar em substrato de argamassa. A biomineralização do cálcio é uma característica comum dos ambientes colonizados, podendo ocorrer a deposição de cristais de cálcio nesse microambiente ou ocorrer incrustações de hifas fúngicas, independentemente da composição específica da argamassa. Várias espécies fúngicas são capazes de causar danos significativos à superfície da argamassa, ocasionando escavação e penetração, ataque superficial e biomineralização. *Aspergillus niger*, *Stemphylium* sp. e *Paecilomyces* sp. podem penetrar na argamassa de diferentes formas, dependendo da porosidade do material (GADD e MCGREGOR, 2024).

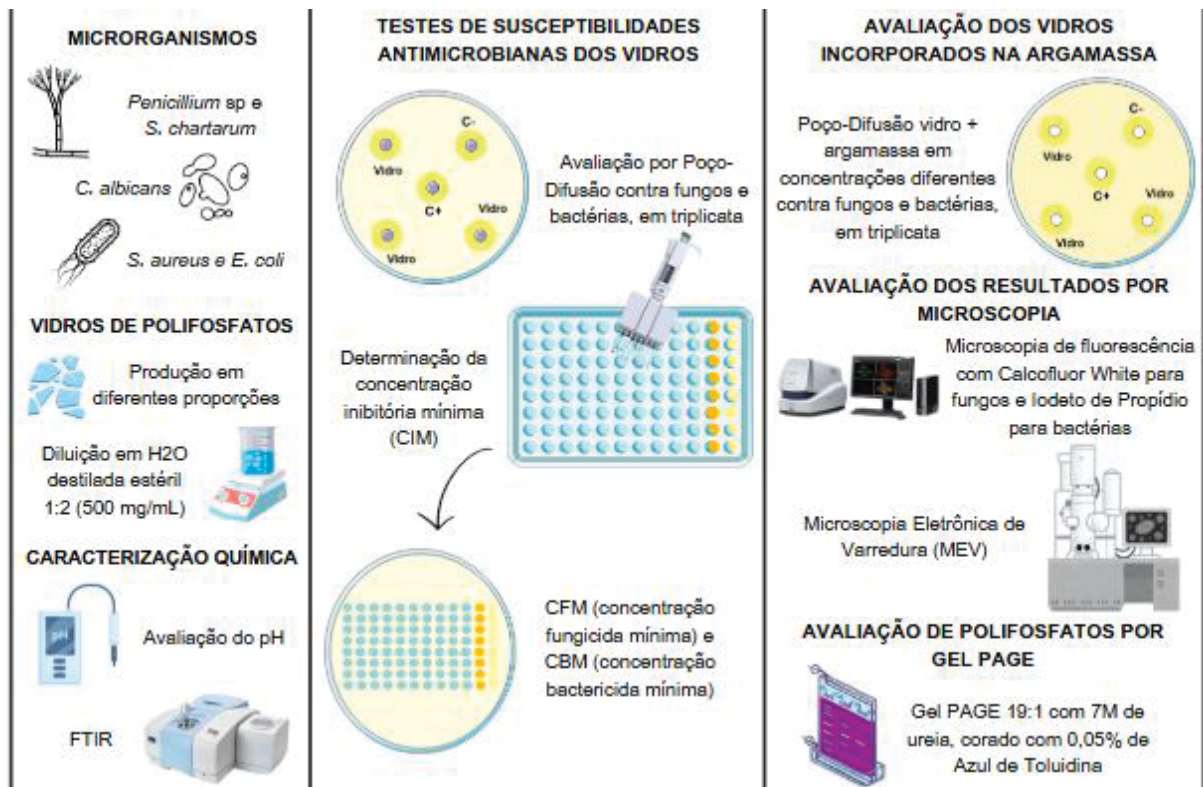
As interações microbianas com o concreto, utilizado em construções, variam desde descoloração e manchas até intemperismo biofísico e bioquímico direto e indireto que pode afetar adversamente a integridade estrutural (GADD et al., 2024).

Uma das variáveis mais importantes do concreto, da argamassa e da pasta de cimento, é a porosidade. A porosidade é alterada variando a proporção de água para cimento na mistura, dentro dos limites recomendados para construções. Nesse contexto, se faz necessária a busca e implantação de alternativas viáveis e seguras, para a saúde humana e o meio ambiente, na incorporação de agentes antimicrobianos em tintas e argamassas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

As etapas dos procedimentos experimentais estão ilustradas na Figura 7.

FIGURA 7 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DAS ETAPAS DO EXPERIMENTO



FONTE: A autora (2024).

3.1 LOCAL DE DESENVOLVIMENTO

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório Experimental de Micologia Aplicada (NEMA) na Universidade Federal do Paraná - UFPR Setor Palotina. Esse projeto é uma parceria com o Grupo de Polímeros e Nanoestruturas da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Toledo, coordenado pelo professor Ricardo Schneider.

3.2 MICRORGANISMOS UTILIZADOS

3.2.1 Bactérias

Foram utilizadas duas linhagens de cepas ATCC (*American Type Collection Culture*) de *Escherichia coli* 25922 (Gram-negativa) e *Staphylococcus aureus* 6538 (Gram-positiva).

3.2.2 Fungos e leveduras

Foram selecionados os fungos causadores de mofo *Penicillium* sp. isolado ambiental, pertencente à micoteca do NEMA e *Stachybotrys chartarum* CCT 2817 (Coleção de Culturas Tropical), linhagem referência DSMZ (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Germani*), adquirido através da Fundação André Tosello. A levedura utilizada foi a *Candida albicans* ATCC 90028.

3.3 MANUTENÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Cada microrganismo foi cultivado em meios de culturas diferentes, de acordo com a característica de cada um e repicados antes de cada teste realizado.

As bactérias foram armazenadas em tubos estéreis contendo 85% de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) e 15% de glicerol, em freezer a -20 °C. Antes de cada ensaio, foram reativadas em 5 mL de BHI e incubadas por 24 horas a 37 °C. Posteriormente, colônias isoladas foram obtidas por semeadura da cultura em ágar MH (*Müller-Hinton*), com incubação por 24 horas a 37 °C. A macromorfologia das colônias foi analisada por inspeção visual e as características morfotintórias (Coloração de Gram) foram realizadas de acordo com o método descrito por Strohl et al. (2004), sob microscopia óptica.

O fungo *Penicillium* sp. foi reativado a partir do estoque em tubo contendo BDA inclinado e transferidos para placa de Petri contendo BDA. As culturas foram incubadas de 5 a 7 dias a 25 °C. Devido às exigências nutricionais, *S. chartarum* foi cultivado, até 14 dias a 25 °C, em ágar aveia (25 g/L de aveia em flocos e 20 g/L de agar), o qual induz a formação de macrósporos. Os aspectos de macromorfologia das colônias fúngicas foram analisados por inspeção visual e a micromorfologia, através

de microscopia óptica, de lâminas contendo o material coletado com fita adesiva e corado com o corante Lactofenol Azul de Algodão. A levedura *C. albicans* foi reativada do estoque congelado (BHI + glicerol) e cultivado em caldo BHI por até 72 horas a 35 °C. Para obtenção de colônias isoladas, a cultura foi semeada, por estriamento, em placas de Petri contendo BDA com incubação de 48 a 72 horas a 35°C. A micromorfologia de *C. albicans* foi analisada através de microcultivo em agar Fubá com *Tween-80* para a visualização da presença de blastoconídios e pseudohifas, estruturas características da espécie.

3.4 VIDROS DE POLIFOSFATOS

Os vidros polifosfatos, borofosfatos e os padrões foram cedidos pelo Prof. Ricardo Schneider, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR - Campus Toledo). Os vidros foram preparados utilizando o método de fusão seguido de resfriamento rápido (*melting/quenching*). As formulações foram obtidas a partir de uma mistura composta por NaH_2PO_4 (Sigma-Aldrich®, pureza 99%) e H_3BO_3 Oregon Labware, pureza 99,8%). Para a síntese, os materiais foram pesados em proporções adequadas, homogeneizados em almofariz de ágata e transferidos para um cadinho de platina com tampa. O cadinho foi colocado em uma mufla, onde a fusão ocorreu em temperaturas de 700°C ou 800°C, com taxa de aquecimento de 20°C/min, por um período de 10 minutos. Após a fusão, o material fundido foi despejado em moldes de grafite e resfriado à temperatura ambiente. As amostras sólidas resultantes foram trituradas novamente em almofariz de ágata e armazenadas em dessecador sob vácuo até a realização das análises. As características dos vidros sintetizados estão descritas na Tabela 1 e dos padrões na Tabela 2.

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS DOS VIDROS DE POLIFOSFATOS

Vidros	Conteúdo dos vidros	Temperatura de fusão (°C)	Taxa de Aquecimento (°C/min)	Tempo de fusão (minutos)
A	NaH_2PO_4	700	20	10
L	10% (mol) Boro NaH_2PO_4	700	20	10
K	NaH_2PO_4	800	20	10

FONTE: A autora (2024).

As características dos padrões estão descritas na Tabela 2.

TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS DOS PADRÕES

Padrões	Nome	Fórmula	Marca	CAS
P1	Polifosfato de Sódio	$(\text{NaPO}_3)_n$	EMPLURA® (Merck®)	10361-03-2
P2	Hexametáfosfato de Sódio	$(\text{NaPO}_3)_6$	Sigma-Aldrich®	68915-31-1
P3	Fosfato de Sódio	NaH_2PO_4	Sigma-Aldrich®	7558-80-7

FONTE: A autora (2024).

3.5 DILUIÇÃO DOS VIDROS DE POLIFOSFATOS

Os vidros de polifosfatos foram diluídos na proporção 1:2 (500 mg/mL), ou seja, foi pesado 1 g do vidro em balança e ressuspendido em 2 mL de água destilada autoclavada com o auxílio do agitador magnético até a completa diluição. Os vidros diluídos foram armazenados em tubos criogênicos em temperatura ambiente para posteriores análises.

3.6 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE DOS MICRORGANISMOS AOS VIDROS PELA TÉCNICA DE POÇO-DIFUSÃO

O método de poço-difusão foi realizado com base no protocolo da NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*), CLSI (*Clinical & Laboratory Standards Institute*, 2015, M02-A12) intitulado: "*Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*" com adaptações. Os poços, de 9 mm de diâmetro, foram feitos sob a superfície do agar MH em placas de Petri descartáveis, com o auxílio de um molde.

O inóculo dos microrganismos foi ajustado em solução salina estéril (NaCl a 0,85%). Para as bactérias e levedura, cerca de 1 a 2 colônias isoladas foram coletadas e ressuspendidas em tubos contendo a solução salina. Para o preparo do inóculo dos

fungos, a superfície dos micélios foi raspada e suspensa em solução salina. As suspensões foram misturadas por agitação em Vórtex e ajustadas de acordo com a escala 0,5 de *McFarland*. A concentração foi confirmada com leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda 625 nm e absorvância entre 0,08 a 0,10 para bactérias 1 a $2,0 \times 10^8$ UFC/mL e para fungos e levedura leitura em 530 nm e absorvância de até 0,10, que correspondem 1 a $5,0 \times 10^6$ UFC/mL.

Após o ajuste do inóculo, 100 μ L foram adicionados na superfície do ágar e espalhados com o auxílio de um *swab* estéril. Os ensaios foram feitos em triplicata. Como controle positivo do antifúngico, foi utilizado miconazol a 50 μ g/mL, para os ensaios com fungos e a levedura. Para bactérias, foi utilizado o antibiótico gentamicina a 64 μ g/mL. No controle negativo, foi utilizado somente solução salina estéril. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas para os ensaios com as bactérias, a 25 °C durante 5 a 7 dias para os fungos e 35 °C por 72 horas, para a levedura. Os halos formados foram aferidos em milímetros, com auxílio de um paquímetro digital. Os resultados foram interpretados com base nos critérios descritos no protocolo da CLSI (2015), classificando a atividade antimicrobiana como forte (diâmetro > 20 mm), moderada (10-20 mm) ou fraca (< 10 mm). Para maior confiabilidade, foram utilizados controles positivos e negativos para validar os resultados.

3.6.1 Avaliação da estabilidade dos vidros diluídos durante 30 dias por poço-difusão

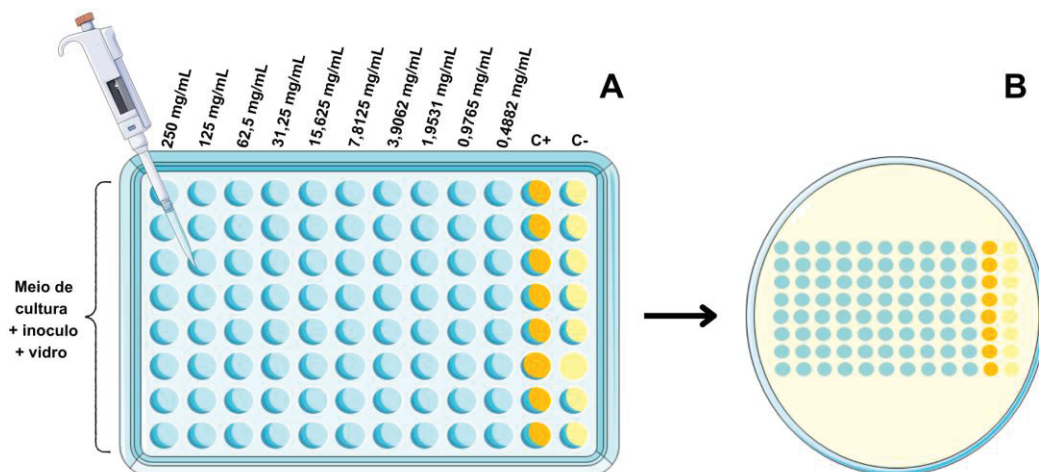
O teste de estabilidade dos vidros diluídos em água foi conduzido ao longo de 30 dias, com o objetivo de avaliar possíveis variações na ação antimicrobiana (estabilização, redução ou aumento da atividade). As análises foram realizadas nos dias 1, 8, 15 e 30 após a diluição, utilizando a técnica de poço-difusão descrita no item 3.6 para todos os microrganismos. Os halos de inibição formados ao redor dos poços foram medidos em milímetros, com auxílio de um paquímetro digital.

3.7 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE DOS MICRORGANISMOS AOS VIDROS, PELA TÉCNICA DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO

O esquema para o teste de susceptibilidade antimicrobiana, por microdiluição em caldo, dos vidros, para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

dos vidros contra bactérias, fungos e levedura (exemplo A) estão representados na Figura 8. O teste foi realizado em microplacas de 96 poços, em triplicata para cada vidro. Em seguida, o exemplo B demonstra o procedimento descrito no item 3.8 para determinar a CBM (Concentração Bactericida Mínima) e CFM (Concentração Fungicida Mínima).

FIGURA 8 - ESQUEMA ILUSTRATIVO PARA DETERMINAR A CIM, CBM E CFM



FONTE: A autora (2024).

LEGENDA: Imagem A representa a microplaca de 96 poços para determinar a CIM, em diferentes concentrações dos vidros. Imagem B representa uma Placa de Petri 90x15mm para determinar a CBM e CFM após o período de incubação da CIM.

3.7.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), dos vidros, contra as bactérias

A CIM foi determinada através da técnica de microdiluição, em microplacas de 96 poços de fundo chato, de acordo com as normas do CLSI, seguindo as recomendações do documento M07-A9 (2012) intitulado "*Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*", utilizando o caldo MH.

Para a padronização do inóculo, cerca de 5 colônias, isoladas em agar MH, foram transferidas para 10 mL de caldo MH e a cultura incubada por 12 horas a 37 °C. O inóculo foi ajustado de acordo com a escala 0,5 de *McFarland*, para obtenção de valores de absorvância, no comprimento de onda de 625 nm, variando entre 0,08 a 0,10, (correspondente a $1,0 \times 10^8$ UFC/mL). Na sequência, o inóculo foi diluído novamente em caldo MH até a concentração de 5×10^5 UFC/mL.

Na microplaca, foi adicionado 100 µL do caldo MH na coluna 1 até a coluna 10. Em seguida, 100 µL dos vidros, na concentração de 500 mg/mL, foram adicionados nos três primeiros poços da coluna 1, onde foi homogeneizado com o caldo MH, para obtenção de uma concentração de 250 mg/mL no primeiro poço. Após a homogeneização, transferiu-se 100 µL do primeiro poço para o poço seguinte da coluna 2 e assim sucessivamente, fazendo uma diluição seriada até a coluna 10, onde foi descartado 100 µL. Por fim, adicionou-se 100 µL da suspensão do inóculo, ajustado para a concentração 5×10^5 UFC/mL, na coluna 1 até a 10. A coluna 11 foi considerada como controle positivo com 100 µL do caldo MH e 100 µL do inóculo, como controle do crescimento do microrganismo. A coluna 12 foi o controle negativo, com 200 µL de caldo MH. As microplacas foram incubadas a 37 °C por 24 horas.

Além disso, foi realizado teste de estabilidade dos vidros e padrões ao longo de 30 dias pela técnica CIM, para verificar se houve variação na concentração. Os testes foram realizados nos dias 1, 15 e 30 dias após as diluições para todas as bactérias.

3.7.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos vidros contra fungos e levedura

A CIM foi determinada através da técnica de microdiluição em microplacas de 96 poços de fundo chato, de acordo com as normas do CLSI, seguindo as recomendações do documento M38-A2 (2008) para fungos filamentosos "*Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi*" e M27-A3 (2008) para leveduras "*Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*". A CIM foi realizada com o meio de cultura RPMI 1640 (com glutamina, sem bicarbonato e com vermelho de fenol como indicador de pH) tamponado com MOPS (Ácido 3-morfolinopropano 1-sulfônico) com pH final 7,0 (referência para células eucariontes). O inóculo dos fungos filamentosos foi realizado a partir de uma raspagem superficial do micélio aéreo, cultivado em BDA e suspenso em salina 0,85%. A suspensão foi homogeneizada por agitação em Vórtex e o inóculo ajustado de acordo com a escala 0.5 de *McFarland*, em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 530 nm, equivalente a 1 a $5,0 \times 10^6$ UFC/mL. Para a suspensão da solução de trabalho, foi feita uma diluição do microrganismo em caldo RPMI 1640 na concentração de 0,4 a $5,0 \times 10^4$ UFC/mL. Para *C. albicans*,

aproximadamente 5 colônias, cultivadas em BDA, foram transferidas para 5 mL de solução salina (0,85% NaCl) estéril. O inóculo foi homogeneizado por agitação em Vórtex e a densidade celular ajustada de acordo com a escala de 0.5 *McFarland*, em espectrofotômetro com comprimento de onda de 530 nm, equivalente a 1 a $5,0 \times 10^6$ UFC/mL. O inóculo foi em seguida diluído na proporção 1:100, e depois para 1:20, em caldo RPMI 1640, resultando na concentração de $2,5 \times 10^3$ UFC/mL.

Na microplaca, foi adicionado 100 μ L do caldo RPMI 1640 na coluna 1 até a coluna 10. Em seguida, 100 μ L dos vidros, na concentração de 500 mg/mL, foram adicionados nos três primeiros poços da coluna 1, onde foi homogeneizado com o caldo RPMI. Após a homogeneização, transferiu-se 100 μ L do primeiro poço para o poço seguinte da coluna 2 e assim sucessivamente, fazendo uma diluição seriada até a coluna 10, onde foi descartado 100 μ L. Por fim, adicionou-se 100 μ L da suspensão do inóculo ajustado na concentração $2,5 \times 10^3$ UFC/mL para levedura e $5,0 \times 10^4$ UFC/mL para os fungos filamentosos na coluna 1 até a 10. A coluna 11 foi considerada como controle positivo com 100 μ L de RPMI e 100 μ L do inóculo, como controle do crescimento do microrganismo. A coluna 12 como controle negativo com 200 μ L de RPMI. As microplacas foram incubadas a 35 °C por 72 horas para a *C. albicans* e 30 °C por 72 horas para os fungos.

Além disso, foi realizado teste de estabilidade dos vidros e padrões ao longo de 30 dias pela técnica de microdiluição em caldo, para verificar se houve variação na concentração. Os testes foram realizados nos dias 1, 15 e 30 dias após as diluições para todos os fungos e levedura.

3.7.3 Determinação da CBM (Concentração Bactericida Mínima) e CFM (Concentração Fungicida Mínima)

Para verificar se as formulações de vidro apresentavam efeito inibitório ou microbicida, 2 μ L do conteúdo nos poços do ensaio de microdiluição em caldo foram depositados sobre a superfície do ágar MH, em placas de Petri descartáveis 90x15 mm, para determinar a CBM das bactérias e CFM para fungos e levedura. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 horas para bactérias, 35 °C por 72 horas para a levedura e 30 °C por 96 horas para os fungos. Após este período, foi observado se houve crescimento dos microrganismos na placa, para então determinar qual foi a menor concentração dos vidros capaz de causar a morte dos microrganismos.

Também foi realizado durante os dias 1, 15 e 30 dias do experimento, para verificar se houve variação na concentração das formulações de vidros.

3.8 AVALIAÇÃO FORMULAÇÕES DE VIDROS INCORPORADOS EM ARGAMASSA, POR POÇO-DIFUSÃO

Os vidros foram incorporados à argamassa com o objetivo de avaliar sua eficiência antimicrobiana contra os microrganismos testados após o contato com o material. A argamassa utilizada foi da marca Do Mestre, com a seguinte composição de acordo com o fabricante: Cimento Portland Cinza, agregados minerais selecionados e aditivos químicos.

Com base na concentração inicial de 1:2 (500 mg/mL) e nos resultados dos testes de microdiluição em caldo, os vidros foram diluídos em duas proporções diferentes: 125 mg/mL e 62,5 mg/mL. As concentrações diluídas foram incorporadas à argamassa e avaliadas por meio do ensaio de poço-difusão, conforme descrito no item 3.6. Após o período de incubação, os halos formados ao redor dos poços foram avaliados, em triplicata, com o auxílio de um paquímetro digital. Como controle positivo, foi utilizado 10 µg de gentamicina para bactérias e 50 µg de miconazol para fungos. Como controle negativo, foi utilizado argamassa diluída em água.

3.9 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

A micromorfologia dos microrganismos, na presença e ausência das formulações de vidros, foi analisada através de microscopia de fluorescência. Para os ensaios foi selecionada a formulação do vidro que apresentou melhor atividade antimicrobiana para cada microrganismo, a partir dos resultados obtidos pela técnica da susceptibilidade antimicrobiana, descrita no item 3.7. Para todos os microrganismos foram coletados 100 µL dos poços em triplicata, da CIM, sub-CIM, controle positivo e controle negativo, e transferidos para um microtubo de 1,5 mL. O *pellet* celular foi obtido por centrifugação a 5000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido com 100 µL de PBS 0,1 M pH 7,2.

As lâminas dos fungos e levedura foram coradas com *Calcofluor White* (CW) (Sigma-Aldrich), a 5 µg/mL com o mesmo volume de hidróxido de potássio a 10%. Esse corante fluorescente se liga a componentes estruturais da parede celular como

quitina, β -glucanos (ligações β -1,3 e β -1,4) e celulose. As células bacterianas foram coradas com iodeto de propídio a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, que se liga a ácidos nucleicos corando células mortas. As lâminas coradas foram mantidas em repouso por 10 minutos e as imagens foram obtidas em microscópio invertido de fluorescência Olympus FSX100, localizado no Laboratório de Patologia Animal, da UFPR Setor Palotina.

3.10 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura foi usada com o objetivo de investigar as modificações estruturais dos microrganismos após o tratamento com o vidro de polifosfato.

A partir dos resultados obtidos pela técnica da susceptibilidade antimicrobiana, descrita no item 3.7, foi selecionado o vidro que apresentou a melhor atividade antimicrobiana contra os microrganismos. O conteúdo dos poços foi coletado, em triplicata, da CIM, sub-CIM, controle positivo e controle negativo, transferidos para um microtubo estéril de 1,5 mL. Em seguida, foram centrifugados por 10 minutos a 5000 rpm para obtenção do *pellet* celular. O sobrenadante foi descartado e ressuspendido em 1 mL de PBS 0,1 M pH 7,2. Após uma nova centrifugação, o *pellet* foi fixado com 1 mL de solução fixadora de glutaraldeído 2,5% em 0,1 M de PBS pH 7,2, mantido *overnight* a 4 °C. Após a etapa de fixação, os microtubos foram novamente centrifugados e o *pellet* lavado novamente com PBS, mantendo um volume final de 100 μL para posteriores análises.

Para fungos e levedura, para manter a integridade da estrutura celular, após uma nova centrifugação, o *pellet* foi ressuspendido com 100 μL de tetróxido de ósmio 1% em PBS 0,1 M pH 7,2, fixados por 1 hora a 25 °C. Após o período de incubação, uma nova centrifugação foi realizada para descartar o tetróxido e o *pellet* foi lavado novamente com PBS, mantendo um volume final de 100 μL para posteriores análises.

Lamínulas de vidro circulares de 13 mm foram cobertas com solução de poli-L-lisina 0,1% por 10 minutos. Em seguida, foram lavadas com água destilada autoclavada e secas por 1 hora em estufa a 50 °C. Após a secagem, 50 μL das amostras foram adicionadas na superfície das lamínulas e mantidas em estufa até as células aderirem totalmente na superfície. Na sequência, as células foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% a 100% (esta última por 2 vezes) durante 10 minutos cada. O ponto crítico foi realizado

em equipamento Leica EM CPD300 *Critical Point Dryer* durante aproximadamente 1 hora e as imagens da MEV foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura TESCAN VEGA3 SEM com aumentos de 5.000 e 10.000 vezes, localizado na UFPR Setor Palotina.

3.11 AVALIAÇÃO DE POLIFOSFATOS POR PAGE (ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA)

Os polifosfatos presentes nos vidros foram avaliados pela técnica de eletroforese por gel de poliacrilamida (PAGE) com ureia 7M. O objetivo da adição da ureia no gel é desnaturar as cadeias de polifosfatos.

A eletroforese foi realizada em sistema vertical Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Biorad). O gel de poliacrilamida foi realizado na concentração de 10%, com razão 19:1 (acrilamida/bis-acrilamida) onde a %T (concentração total de monômeros) foi 40% e %C (proporção de bis-acrilamida em relação ao valor total de monômeros) a 5%, e ureia a 7M. A polimerização do gel foi finalizada com 0,1% de persulfato de amônio e 0,1% de TEMED (Tetrametiletenodiamina). O tampão de corrida utilizado foi o TBE 1X (89 mM Tris, 89 mM borato, 2 mM EDTA, pH 8,3).

A eletroforese foi conduzida a uma corrente de 150 mA e 200 Volts, por 50 minutos. Em seguida, o gel foi mantido em agitação constante durante 20 minutos com 0,05% de azul de toluidina, 25% de metanol e 5% de glicerol, para corar as cadeias de polifosfatos. A etapa de descoloração foi realizada 3x, em intervalo de 30 minutos cada sob agitação constante, com 25% de metanol e 5% de glicerol. O gel foi visualizado em luz LED branca no Transiluminador (Kasvi).

3.12 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS VIDROS

As amostras vítreas foram previamente diluídas em água destilada, e, após a completa solubilização, o pH das soluções foi medido utilizando eletrodo de vidro (marca Sensogless, modelo SC08). As medições foram realizadas em triplicata, à temperatura ambiente, garantindo a precisão dos valores obtidos. Os dados foram registrados para posterior análise e comparação entre as diferentes formulações.

A análise de espectroscopia de absorção no infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) foi realizada em espectrômetro de infravermelho Perkin Elmer,

modelo Spectrum 65. A amostra foi preparada em pastilha de KBr (brometo de potássio). A leitura foi feita com 1% da amostra e 99% de KBr grau espectroscópico (Sigma-Aldrich). A análise foi realizada entre 4000 e 500 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 32 scans.

3.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos foram analisados utilizando o software R (versão 4.4.2). Inicialmente, foi avaliado a normalidade dos dados por meio do teste de Shapiro-Wilk, sendo constatado que os valores não seguem distribuição normal. Assim, foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparar os grupos. O teste de Tukey foi aplicado, com nível de significância de $\alpha = 0,05$ (95%). O desvio padrão foi calculado para avaliar a dispersão das variáveis.

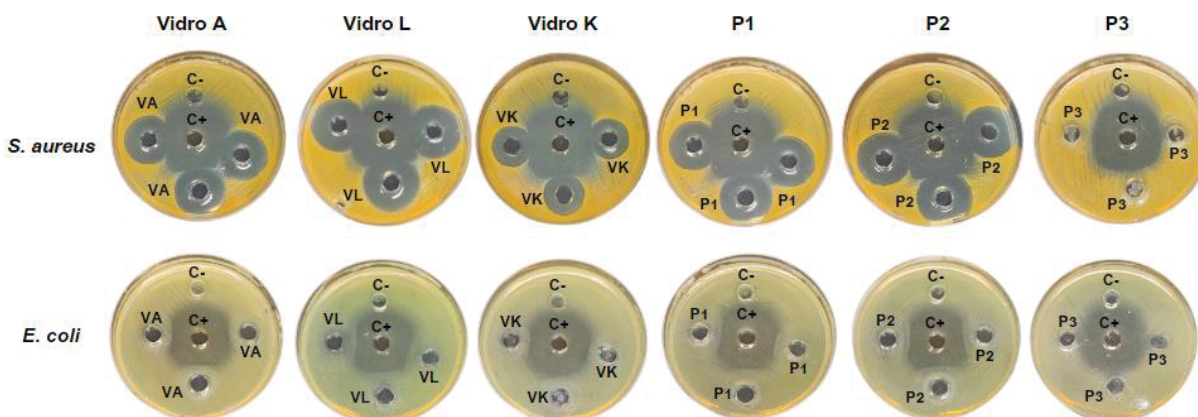
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA AOS VIDROS - TÉCNICA DE POÇO-DIFUSÃO

A dimensão dos halos formados ao redor dos poços foi avaliada para a determinação do efeito inibitório dos vidros sobre bactérias e fungos, após o período de contato. No controle positivo foi utilizado o antibiótico gentamicina a 10 µg/mL, para as bactérias, e o antifúngico miconazol a 50 µg/mL, para os fungos e a levedura, para comparar com os antimicrobianos recomendadas pela CLSI.

Os resultados obtidos com as bactérias *S. aureus* e *E. coli* estão apresentados na Figura 9. Todos os vidros (A, L e K) tiveram efeito inibitório contra *S. aureus*, devido à formação de halo ao redor do poço, em comparação com *E. coli*, que não apresentou inibição no crescimento. Os padrões P1 e P2 tiveram ação somente para *S. aureus* e o padrão P3 não teve ação para nenhuma das bactérias.

FIGURA 9 - RESULTADOS DO TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIBACTERIANA DOS VIDROS CONTRA *S. aureus* E *E. coli*, RESPECTIVAMENTE, POR POÇO-DIFUSÃO



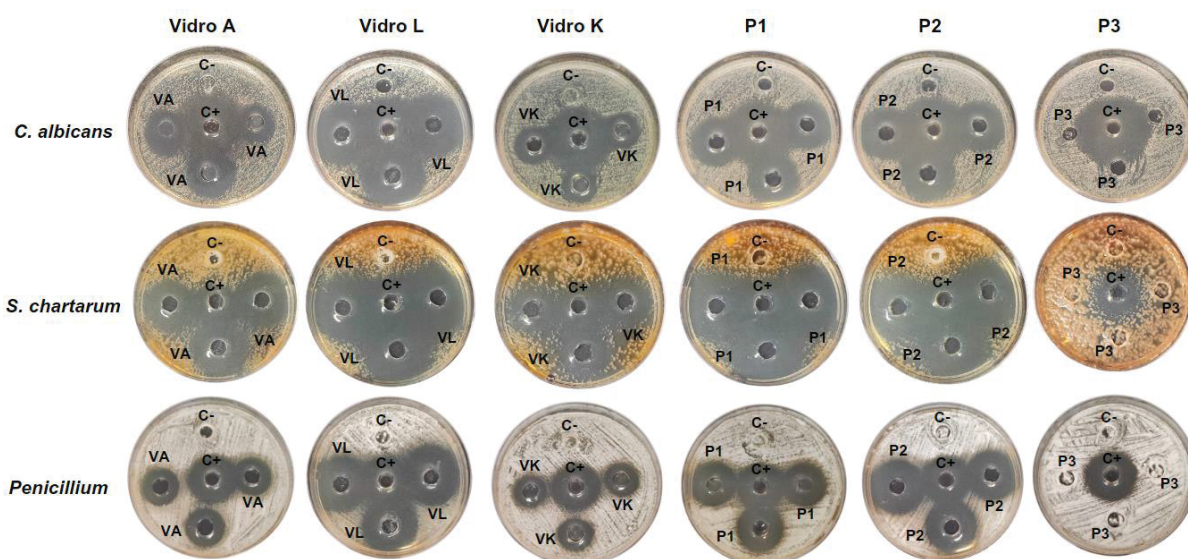
FONTE: A autora (2024).

LEGENDA: A primeira linha corresponde aos testes dos vidros e padrões com *S. aureus* e a segunda linha com *E. coli*. C- (controle negativo, somente salina 0,85%), C+ (controle positivo, 10 µg de gentamicina), A (vidro polifosfato de sódio, temperatura de fusão 700 °C), L (vidro borofosfato com 10% mol B, temperatura de fusão 700 °C), K (vidro polifosfato de sódio, temperatura de fusão 800 °C), P1 (polifosfato de sódio), P2 (hexametáfosfato de sódio) e P3 (reagente precursor NaH₂PO₄).

Os resultados obtidos no procedimento de poço-difusão para a levedura *C. albicans* e fungos, *S. chartarum* e *Penicillium* sp. estão apresentados na Figura 10. Foram observados halos de inibição no crescimento dos microrganismos testados,

para todos os vidros, com intensidades variáveis entre os isolados. Além disso, os padrões P1 e P2 também apresentaram atividade, comparado com o P3 que não teve ação sobre nenhum microrganismo testado.

FIGURA 10 - RESULTADOS DO TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA DOS VIDROS CONTRA *C. albicans*, *S. chartarum* E *Penicillium* sp., RESPECTIVAMENTE, POR POÇO-DIFUSÃO



FONTE: A autora (2024).

LEGENDA: A primeira linha corresponde aos testes dos vidros e padrões com *C. albicans*, segunda linha com *S. chartarum* e a terceira linha com o *Penicillium* sp. C- (controle negativo, somente salina 0,85%), C+ (controle positivo, 50 µg de miconazol), A (vidro polifosfato de sódio, temperatura de fusão 700 °C), L (vidro borofosfato com 10% mol B, temperatura de fusão 700 °C), K (vidro polifosfato de sódio, temperatura de fusão 800 °C), P1 (polifosfato de sódio), P2 (hexametáfosfato de sódio) e P3 (reagente precursor NaH_2PO_4).

Os resultados com as médias (em milímetro) das triplicatas de cada ensaio realizado para todos os microrganismos, estão representadas na Tabela 3. Além disso, foi realizado o cálculo do desvio padrão e comparado entre amostras (vidros A, L e K) com os padrões (P1, P2 e P3) para determinar se houve estatisticamente diferença significativa entre os tratamentos para cada microrganismo.

TABELA 3 - RESULTADO DAS MÉDIAS DOS HALOS DE INIBIÇÃO PARA TODOS OS MICRORGANISMOS NO TESTE DE POÇO-DIFUSÃO

Amostras e controles	Microrganismos									
	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>C. albicans</i>		<i>S. chartarum</i>		<i>Penicillium sp.</i>	
	Média (mm)	DP	Média (mm)	DP	Média (mm)	DP	Média (mm)	DP	Média (mm)	DP
A	21,23 e	0,4	0,0 b	0,0	22,58 cd	0,2	26,29 bc	0,2	20,39 cd	0,7
L	28,21 a	0,2	0,0 b	0,0	31,44 a	1,3	31,41 a	1,3	29,62 a	0,1
K	18,82 f	0,7	0,0 b	0,0	20,05 d	0,4	20,69 d	0,6	16,44 d	0,0
P1	23,67 c	0,5	0,0 b	0,0	28,54 bc	0,3	30,14 ab	0,7	27,02 bc	0,7
P2	22,73 d	0,2	0,0 b	0,0	30,73 a	0,4	30,83 a	0,5	29,16 ab	0,9
P3	0,0 g	0,0	0,0 b	0,0	0,0 e	0,0	0,0 e	0,0	0,0 e	0,0
C+	25,11 b	0,3	24,31 a	0,3	30,19 ab	0,2	22,01 cd	0,9	29,83 a	0,9
C-	0,0 g	0,0	0,0 b	0,0	0,0 e	0,0	0,0 e	0,0	0,0 e	0,0

FONTE: A autora (2024).

LEGENDA: DP: Desvio Padrão. Letras distintas na mesma coluna indicam diferença significativa entre as metodologias de acordo com o teste de Tukey (α : 0,05). C- (controle negativo, somente salina 0,85%), C+ (controle positivo, 10 μ g de gentamicina para bactérias e 50 μ g de miconazol para fungos), A (vidro polifosfato de sódio, temperatura de fusão 700 °C), L (vidro borofosfato com 10% mol B, temperatura de fusão 700 °C), K (vidro polifosfato de sódio, temperatura de fusão 800 °C), P1 (polifosfato de sódio), P2 (hexametáfosfato de sódio) e P3 (reagente precursor NaH₂PO₄).

A bactéria *S. aureus* apresentou halos de inibição pronunciados frente às três formulações de vidro, sendo o maior efeito observado quando se utilizou o vidro L, com a média do halo 28,21 \pm 0,2. Por outro lado, o vidro que apresentou menor desempenho foi o vidro K, com a média 18,82 \pm 0,7, mas ainda assim revelou potencial antibacteriano significativo. Quanto aos padrões, o maior efeito inibitório foi observado para o vidro P1, com média 23,67 \pm 0,5. Essas diferenças na atividade antimicrobiana sugerem que as alterações nas formulações dos vidros e dos padrões influenciam

diretamente no seu mecanismo de ação. Algumas cepas de *S. aureus* são conhecidas por sua resistência a diferentes antimicrobianos, como a MRSA (*Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*), que apresenta resistência ao antibiótico meticilina que vem gerando preocupações na saúde pública do mundo todo (ALARJANI e SKALICHY, 2021). Portanto, os resultados obtidos com as diferentes formulações de vidros possuem potencial contra *S. aureus*, tornando-se uma alternativa para aplicações biotecnológicas futuras como um revestimento antimicrobiano em superfícies ou materiais de construção, como argamassas e tintas.

E. coli, uma bactéria Gram-negativa, apresentou resistência para todas as formulações de vidros e padrões. Esse comportamento de resistência pode ser atribuído à estrutura da parede celular, que possui uma membrana externa rica em lipopolissacarídeos (LPS), que atuam como uma barreira de proteção contra muitos agentes antimicrobianos (WANG et al., 2021).

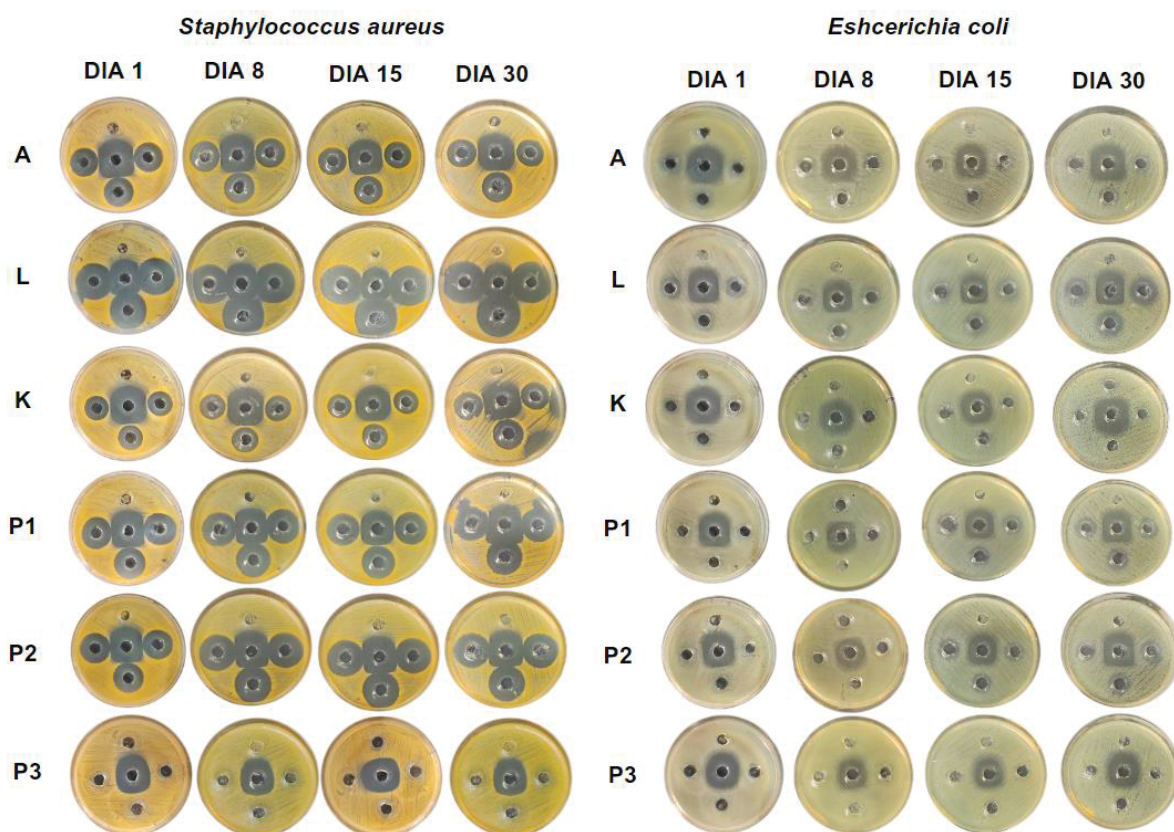
O vidro L (10% de boro) apresentou melhores resultados contra a levedura *C. albicans*, com $31,44 \pm 1,3$ de média de inibição. Os vidros de sódio, A e K apresentaram $22,58 \pm 0,2$ e $20,05 \pm 0,4$, respectivamente. Já o padrão P2, um maior halo de inibição foi observado, com uma média $30,73 \pm 0,4$, em comparação com o P3 que não apresentou ação. Dessa forma, a formulação do vidro L torna-se promissor para o controle da levedura e com potencial de aplicação futura.

Já os fungos *S. chartarum* e *Penicillium* sp. também apresentaram melhores resultados para a formulação do vidro L, com uma média de $31,41 \pm 1,3$ e $29,62 \pm 0,1$, respectivamente. Entre os padrões testados, P2 apresentou maior resultado, com $30,83 \pm 0,5$ para *S. chartarum* e $29,16 \pm 0,9$ para *Penicillium* sp. Tanto para a levedura quanto para os fungos, o P2 apresentou melhores resultados quando comparado com a *S. aureus*. Essa diferença pode estar diretamente ligada com a liberação de íons que desestabilizam a membrana celular dos microrganismos.

4.2 RESULTADOS DO TESTE DE ESTABILIDADE DOS VIDROS DILUÍDOS AO LONGO DE 30 DIAS POR POÇO-DIFUSÃO

A análise de estabilidade teve como objetivo de avaliar se houve variação na ação antimicrobiana ao longo dos dias 1, 8, 15 e 30 para todos os microrganismos. Os resultados obtidos dos ensaios para as bactérias *S. aureus* e *E. coli* estão apresentados na Figura 11.

FIGURA 11 - RESULTADOS DO TESTE DE ESTABILIDADE, PELA TÉCNICA DE POÇO-DIFUSÃO, DOS VIDROS E PADRÕES AO LONGO DE 30 DIAS PARA *S. aureus* E *E. coli*



FONTE: A autora (2024).

LEGENDA: VA (vidro com sódio, rate 700 °C), VL (vidro com 10% Boro, rate 700 °C), VK (vidro com sódio, rate 800 °C), P1 (padrão 1 sódio), P2 (padrão 2 Na-Hexametafosfato) e P3 (padrão 3, reagente de partida NaH_2PO_4).

Para *S. aureus*, foram observados halos de inibição durante os quatro dias avaliados, para os vidros A, L e K. Os padrões P1 e P2 também apresentaram atividades ao longo dos dias, em comparação com o P3, que não teve ação, confirmando o mesmo resultado avaliado no item anterior. Para avaliar a variação na atividade antimicrobiana ao longo do tempo, foi realizada uma análise estatística para verificar a diferença significativa entre os períodos de 1, 8, 15 e 30 dias. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.

TABELA 4 - TESTE DE ESTABILIDADE AO LONGO DOS 30 DIAS COM AS MÉDIAS DOS HALOS DE INIBIÇÃO PARA *S. aureus* NO TESTE DE POÇO-DIFUSÃO

Amostras e controles	<i>S. aureus</i>							
	D1	DP	D8	DP	D15	DP	D30	DP
A	19,93 a	0,5	21,17 a	0,2	19,64 a	0,5	19,43 a	0,3
L	27,68 c	0,7	29,66 a	0,4	28,84 bc	0,3	29,23 ab	0,3
K	17,63 b	0,3	19,22 ab	0,9	18,08 ab	0,6	19,87 a	0,8
P1	25,24 a	0,9	24,70 ab	0,6	23,41 bc	0,3	23,00 c	0,7
P2	25,34 ab	0,4	25,50 a	0,3	23,10 c	0,4	23,85 bc	0,3
P3	0,0 a	0,0	0,0 a	0,0	0,0 a	0,0	0,0 a	0,0
C+	27,20 a	0,0	24,20 b	0,3	20,90 ab	0,1	25,26 ab	0,8
C-	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

FONTE: A autora (2024).

LEGENDA: D1 (dia 1), D8 (dia 8), D15 (dia 15) e D30 (dia 30). DP: Desvio Padrão. Letras distintas na mesma linha indicam diferença significativa entre as metodologias de acordo com o teste de Tukey ($\alpha:0,05$). C- (controle negativo, somente salina 0,85%), C+ (controle positivo, 10 μg de gentamicina), A (vidro polifosfato de sódio, temperatura de fusão 700 °C), L (vidro borofosfato com 10% mol B, temperatura de fusão 700 °C), K (vidro polifosfato de sódio, temperatura de fusão 800 °C), P1 (polifosfato de sódio), P2 (hexametáfosfato de sódio) e P3 (reagente precursor NaH_2PO_4).

Com base nos dados estatísticos obtidos, o vidro A se manteve estável ao longo dos dias, com uma média de ação, em mm, entre $19,93 \pm 0,5$ no primeiro dia e $19,43 \pm 0,3$ no último dia, sem diferenças estatisticamente significativas. O vidro L produziu maiores halos de inibição entre todos os dias avaliados, com valores entre $27,68 \pm 0,7$ no primeiro dia e $29,23 \pm 0,3$ no último dia, onde os dados apresentaram diferenças significativas entre os quatro dias avaliados, demonstrando que ao longo das semanas houve um aumento na ação contra *S. aureus*. Já o vidro K apresentou uma menor ação, com $17,63 \pm 0,3$ no primeiro dia e $19,87 \pm 0,8$ no último dia, comparado com outros vidros. Dentre os padrões avaliados, P1 e P2 apresentaram no primeiro dia uma média de $25,24 \pm 0,9$ e $25,34 \pm 0,4$, respectivamente, e no último dia, uma

diminuição com $23,00\pm 0,7$ para o P1 e $23,85\pm 0,3$ para o P2, sendo um possível indicativo de desestabilização da ação, em comparação com os vidros que mantiveram ou aumentaram a ação antimicrobiana ao longo dos dias. O controle positivo, testado com o antibiótico gentamicina recomendado para essa bactéria, apresentou variações ao longo das semanas, com $27,20\pm 0,0$ no primeiro dia e $25,26\pm 0,8$ no último dia. Portanto, para a *S. aureus*, o vidro L demonstrou um maior aumento da ação ao longo das semanas e melhor estabilidade, sugerindo uma opção promissora para o controle da bactéria.

Os resultados estatísticos obtidos para a *E. coli* estão dispostos na Tabela 5.

TABELA 5 - TESTE DE ESTABILIDADE AO LONGO DOS 30 DIAS COM AS MÉDIAS DOS HALOS DE INIBIÇÃO PARA *E. coli* NO TESTE DE POÇO-DIFUSÃO

Amostras e controles	<i>E. coli</i>							
	D1	DP	D8	DP	D15	DP	D30	DP
A	0,0 a	0,0	0,0 a	0,0	0,0 a	0,0	0,0 a	0,0
L	0,0 c	0,0	0,0 c	0,0	14,40 b	0,1	15,95 a	0,3
K	0,0 a	0,0	0,0 a	0,0	0,0 a	0,0	0,0 a	0,0
P1	0,0 c	0,0	0,0 c	0,0	12,30 b	0,1	13,05 a	0,0
P2	0,0 c	0,0	0,0 c	0,0	12,64 b	0,0	13,23 a	0,1
P3	0,0 a	0,0	0,0 a	0,0	0,0 a	0,0	0,0 a	0,0
C+	28,04 a	0,5	22,58 b	0,4	22,92 a	0,1	22,25 b	0,6
C-	0,0 a	0,0	0,0 a	0,0	0,0 a	0,0	0,0 a	0,0

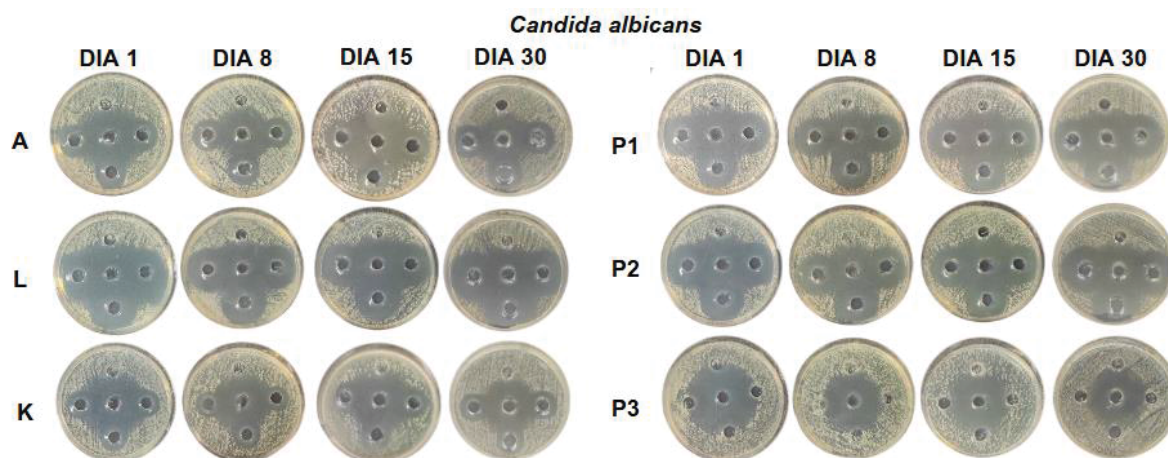
FONTE: A autora (2024).

LEGENDA: D1 (dia 1), D8 (dia 8), D15 (dia 15) e D30 (dia 30). DP: Desvio Padrão. Letras distintas na mesma linha indicam diferença significativa entre as metodologias de acordo com o teste de Tukey ($\alpha:0,05$). C- (controle negativo, somente salina 0,85%), C+ (controle positivo, 10 μg de gentamicina), A (vidro polifosfato de sódio, temperatura de fusão 700 °C), L (vidro borofosfato com 10% mol B, temperatura de fusão 700 °C), K (vidro polifosfato de sódio, temperatura de fusão 800 °C), P1 (polifosfato de sódio), P2 (hexametáfosfato de sódio) e P3 (reagente precursor NaH_2PO_4).

Os vidros A e K não apresentaram atividade contra *E. coli* em nenhum dos dias avaliados, indicando uma resistência da bactéria na presença dos compostos dos vidros, como já discutido anteriormente. Já o vidro L apresentou uma baixa ação contra o microrganismo no dia 15, com uma média de $14,40 \pm 0,1$ e no dia 30, um pequeno aumento com uma média de $15,95 \pm 0,3$. O mecanismo de ação antimicrobiana do vidro L contra a *E. coli* pode estar relacionado com a despolimerização da matriz vítrea e ao efeito das cadeias poliméricas geradas no processo, em vez de uma simples liberação gradual de íons na solução. Essa hipótese é suportada pela solubilidade característica do vidro L, que favorece o processo de despolimerização, resultando na formação de espécies com diferentes tamanhos de cadeias ao longo do tempo, as quais podem atuar no mecanismo antimicrobiano (SCHNEIDER, R. em comunicação pessoal). Os padrões P1 e P2 apresentaram um comportamento de ação parecido com o vidro L, onde no dia 15 apresentaram baixa ação com uma média de $12,30 \pm 0,1$ para o P1 e $12,64 \pm 0,0$ para o P2. No dia 30, houve um pequeno aumento com $13,05 \pm 0,0$ e $13,23 \pm 0,1$, respectivamente. No entanto, a ação foi menor comparado com o vidro L. O controle positivo, com gentamicina, houve uma maior ação no primeiro dia com $28,04 \pm 0,5$ e uma menor ação no dia 30 com $22,25 \pm 0,6$.

Os resultados obtidos para a levedura *C. albicans* ao longo dos 30 dias, estão apresentados na Figura 12 e Tabela 6.

FIGURA 12 - RESULTADOS DO TESTE DE ESTABILIDADE DOS VIDROS E PADRÕES AO LONGO DE 30 DIAS, PELA TÉCNICA DE POÇO-DIFUSÃO, PARA *C. albicans*



FONTE: A autora (2024).

LEGENDA: C- (controle negativo, somente salina 0,85%), C+ (controle positivo, 50 μ g de miconazol), A (vidro polifosfato de sódio, temperatura de fusão 700 $^{\circ}$ C), L (vidro borofosfato com 10% mol B, temperatura de fusão 700 $^{\circ}$ C), K (vidro polifosfato de sódio, temperatura de fusão 800 $^{\circ}$ C), P1 (polifosfato de sódio), P2 (hexametáfosfato de sódio) e P3 (reagente precursor NaH_2PO_4).

TABELA 6 - TESTE DE ESTABILIDADE AO LONGO DOS 30 DIAS COM AS MÉDIAS DOS HALOS DE INIBIÇÃO PARA *C. albicans* NO TESTE DE POÇO-DIFUSÃO

Amostras e controles	<i>C. albicans</i>							
	D1	DP	D8	DP	D15	DP	D30	DP
A	21,99 a	1,0	22,18 a	0,4	21,42 a	0,4	21,64 a	0,2
L	32,67 a	0,0	31,32 b	0,1	30,02 c	0,0	31,16 b	0,7
K	18,99 a	1,0	19,56 a	0,9	19,77 a	0,4	18,48 a	0,4
P1	25,24 a	0,9	24,70 ab	0,6	23,41 bc	0,3	23,00 c	0,7
P2	25,34 ab	0,4	25,50 a	0,3	23,10 c	0,6	23,85 bc	0,3
P3	0,0 a	0,0	0,0 a	0,0	0,0 a	0,0	0,0 a	0,0
C+	28,97 a	0,6	25,92 ab	0,5	25,82 ab	0,1	24,87 b	0,8
C-	0,0 a	0,0	0,0 a	0,0	0,0 a	0,0	0,0 a	0,0

FONTE: A autora (2024).

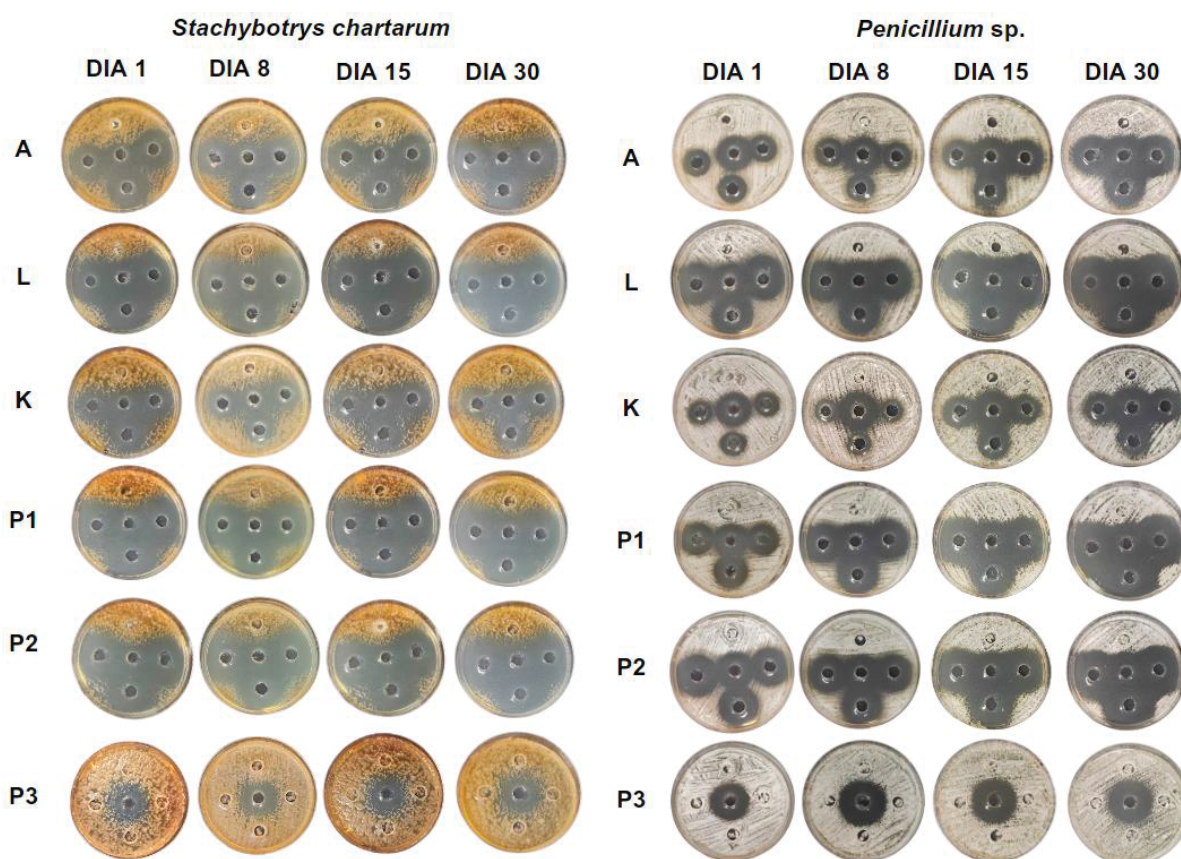
LEGENDA: D1 (dia 1), D8 (dia 8), D15 (dia 15) e D30 (dia 30). DP: Desvio Padrão. Letras distintas na mesma linha indicam diferença significativa entre as metodologias de acordo com o teste de Tukey ($\alpha:0,05$). C- (controle negativo, somente salina 0,85%), C+ (controle positivo, 50 μg de miconazol), A (vidro com sódio, rate 700 °C), L (vidro com 10% Boro, rate 700 °C), K (vidro com sódio, rate 800 °C), P1 (padrão 1 sódio), P2 (padrão 2 Na-Hexametafosfato) e P3 (padrão 3, reagente de partida NaH_2PO_4).

Os vidros A e K apresentaram-se estáveis ao longo das semanas, com $21,99 \pm 1,0$ e $18,99 \pm 1,0$ no primeiro dia e, no dia 30 com $21,64 \pm 0,2$ e $18,48 \pm 0,4$, respectivamente. O vidro L também apresentou melhores resultados para a levedura, com $32,67 \pm 0,0$ no dia 1 e $31,16 \pm 0,7$, no dia 30. Apesar de ter apresentado uma média alta de inibição, diferentemente dos resultados obtidos com as bactérias, onde houve uma maior ação ao longo dos dias, para a *C. albicans* o vidro se manteve estável. Essa estabilidade por ser um indicativo de menor sensibilidade da levedura contra a formulação L. Da mesma forma com os resultados obtido com as bactérias, para *C. albicans* foi obtida uma média de halo $25,24 \pm 0,9$ no dia 1, e $25,34 \pm 0,4$, no dia 30, quando se utilizou os padrões P1 e P2, representando uma diminuição com $23,00 \pm 0,7$ e $23,85 \pm 0,3$, respectivamente. O controle positivo, testado com miconazol (50 μg) teve

uma ação maior no primeiro dia, com $28,97 \pm 0,6$ e uma menor ação no dia 30, com $24,87 \pm 0,8$.

Os resultados para os fungos *S. chartarum* e *Penicillium* sp. são apresentados na Figura 13 e os dados estatísticos com as médias dos halos das triplicatas, na Tabela 7 para *S. chartarum* e Tabela 8 para *Penicillium* sp.

FIGURA 13 - RESULTADOS DO TESTE DE ESTABILIDADE DOS VIDROS E PADRÕES AO LONGO DE 30 DIAS, PELA TÉCNICA DE POÇO-DIFUSÃO, PARA *S. chartarum* E *Penicillium* sp.



FONTE: A autora (2024).

LEGENDA: C- (controle negativo, somente salina 0,85%), C+ (controle positivo, 50 µg de miconazol), A (vidro polifosfato de sódio, temperatura de permanência 700 °C), L (vidro borofosfato com 10% mol B, temperatura de permanência 700 °C), K (vidro polifosfato de sódio, temperatura de permanência 800 °C), P1 (polifosfato de sódio), P2 (hexametáfosfato de sódio) e P3 (reagente precursor NaH_2PO_4).

TABELA 7 - TESTE DE ESTABILIDADE AO LONGO DOS 30 DIAS COM AS MÉDIAS DOS HALOS DE INIBIÇÃO PARA *S. chartarum* NO TESTE DE POÇO-DIFUSÃO

Amostras e controles	<i>S. chartarum</i>							
	D1	DP	D8	DP	D15	DP	D30	DP
A	26,29 a	0,2	26,84 a	0,5	27,65 a	0,6	27,36 a	1,2
L	32,67 a	0,0	31,32 c	0,1	30,02 b	0,0	31,16 b	0,7
K	20,69 a	0,6	21,97 a	1,1	21,93 a	0,6	22,98 a	0,7
P1	30,14 a	0,7	31,58 a	1,3	31,03 a	0,4	29,35 a	1,2
P2	30,83 ab	0,5	29,87 b	0,8	32,81 a	1,4	32,75 a	0,5
P3	0,0 a	0,0	0,0 a	0,0	0,0 a	0,0	0,0 a	0,0
C+	22,01 b	0,9	23,90 a	0,6	23,89 a	0,2	21,90 b	0,5
C-	0,0 a	0,0	0,0 a	0,0	0,0 a	0,0	0,0 a	0,0

FONTE: A autora (2024).

LEGENDA: D1 (dia 1), D8 (dia 8), D15 (dia 15) e D30 (dia 30). DP: Desvio Padrão. Letras distintas na mesma linha indicam diferença significativa entre as metodologias de acordo com o teste de Tukey ($\alpha:0,05$). C- (controle negativo, somente salina 0,85%), C+ (controle positivo, 50 μg de miconazol), A (vidro polifosfato de sódio, temperatura de permanência 700 °C), L (vidro borofosfato com 10% mol B, temperatura de permanência 700 °C), K (vidro polifosfato de sódio, temperatura de permanência 800 °C), P1 (polifosfato de sódio), P2 (hexametáfosfato de sódio) e P3 (reagente precursor NaH_2PO_4).

Para o fungo *S. chartarum*, os vidros A e K apresentaram-se estáveis ao longo das semanas, com $26,99 \pm 0,2$ e $20,69 \pm 0,6$ no primeiro dia e, no dia 30 com $27,36 \pm 1,2$ e $22,98 \pm 0,7$, respectivamente, sem diferenças significativas entre os dias avaliados. O vidro L também apresentou maiores resultados para esse fungo, onde no primeiro dia apresentou uma média de halo com $32,67 \pm 0,0$ e no dia 30 com $31,16 \pm 0,7$. Os padrões apresentaram um comportamento diferente dos resultados observados nos microrganismos anteriores. O P1 se manteve estável ao longo dos dias, sem diferenças significativas, enquanto o P2 no primeiro dia apresentou uma média de halo com $30,83 \pm 0,5$ e no dia 30 um aumento com $32,75 \pm 0,5$. Já o controle positivo, testado com miconazol (50 μg) se manteve estável ao longo dos dias, com $22,01 \pm 0,9$ no dia

1 e $21,90 \pm 0,5$ no dia 30, porém, com resultados menores em comparação com a formulação L que apresentou maiores resultados.

Os dados estatísticos estão descritos na Tabela 8, para os ensaios com o fungo *Penicillium* sp.

TABELA 8 - TESTE DE ESTABILIDADE AO LONGO DOS 30 DIAS COM AS MÉDIAS DOS HALOS DE INIBIÇÃO PARA *Penicillium* sp. NO TESTE DE POÇO-DIFUSÃO

Amostras e controles	<i>Penicillium</i> sp.							
	D1	DP	D8	DP	D15	DP	D30	DP
A	19,67 d	0,3	21,09 c	0,8	26,18 b	0,1	27,16 a	0,2
L	30,04 b	1,1	30,06 b	0,4	36,30 a	0,4	37,42 a	0,8
K	16,81 c	0,7	17,17 bc	0,6	20,53 ab	0,7	21,63 a	0,7
P1	22,99 d	0,6	29,92 c	0,6	30,88 b	0,4	31,71 a	0,5
P2	27,33 b	0,9	27,74 b	0,9	30,94 a	0,1	32,53 a	1,3
P3	0,0 a	0,0	0,0 a	0,0	0,0 a	0,0	0,0 a	0,0
C+	24,45 bc	0,3	24,15 c	0,2	24,94 ab	0,1	25,10 a	0,1
C-	0,0 a	0,0	0,0 a	0,0	0,0 a	0,0	0,0 a	0,0

FONTE: A autora (2024).

LEGENDA: D1 (dia 1), D8 (dia 8), D15 (dia 15) e D30 (dia 30). DP: Desvio Padrão. Letras distintas na mesma linha indicam diferença significativa entre as metodologias de acordo com o teste de Tukey ($\alpha:0,05$). C- (controle negativo, somente salina 0,85%), C+ (controle positivo, 50 μg de miconazol), A (vidro polifosfato de sódio, temperatura fusão 700 °C), L (vidro borofosfato com 10% mol B, temperatura de fusão 700 °C), K (vidro polifosfato de sódio, temperatura de fusão 800 °C), P1 (polifosfato de sódio), P2 (hexametáfosfato de sódio) e P3 (reagente precursor NaH_2PO_4).

Para o *Penicillium* sp., os vidros tiveram comportamentos diferentes em comparação com os outros microrganismos testados. A média dos halos de inibição do crescimento fúngico, para o vidro A, no dia 1 foi de $19,67 \pm 0,3$ e no dia 30, $27,16 \pm 0,2$. Para o vidro K diluído no dia 1, a média foi de $16,81 \pm 0,7$ e no dia 30, $21,63 \pm 0,7$. Os maiores halos foram novamente observados para o vidro L, onde no

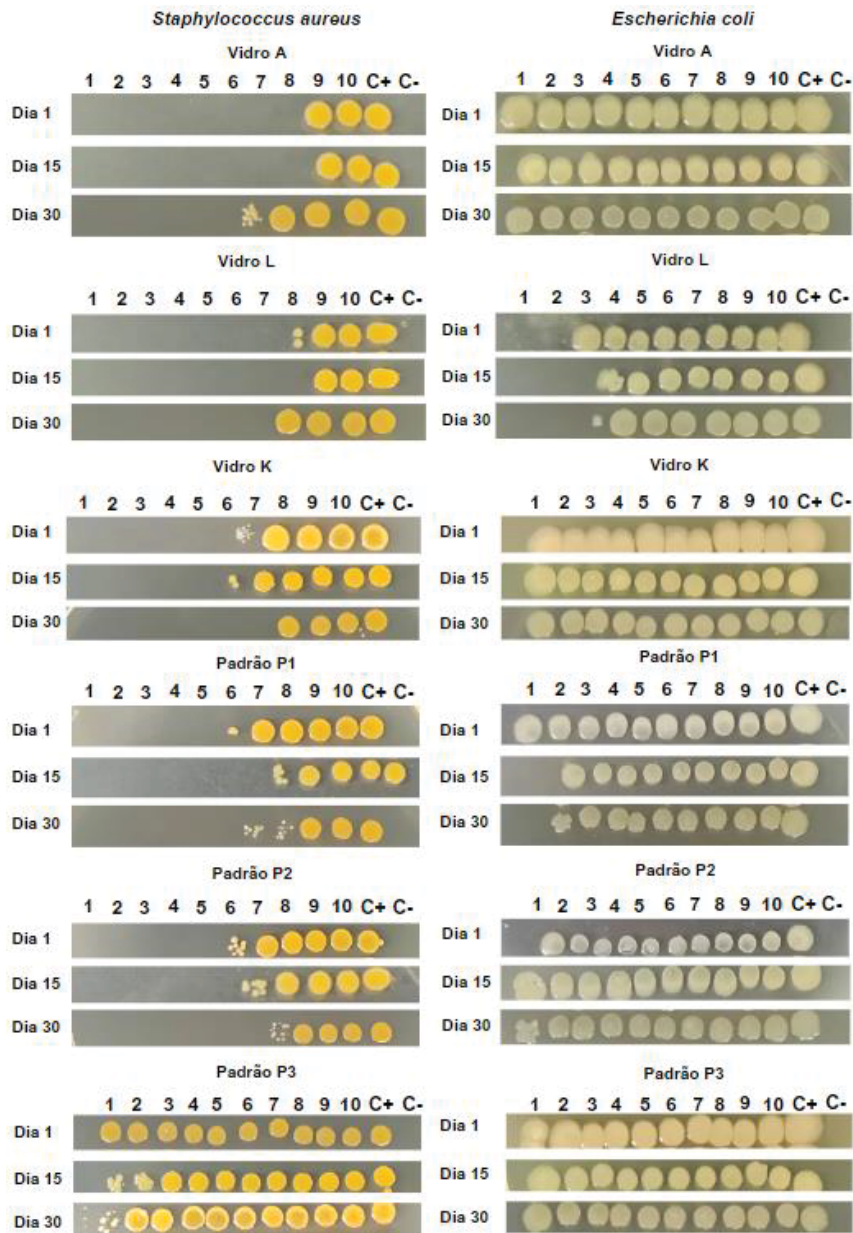
dia 1 apresentou média de $30,04 \pm 1,1$ e no dia 30 com $37,42 \pm 0,8$. Apesar do vidro L apresentar resultados significativos mais altos em comparação com os outros vidros, todas as formulações tiveram um aumento gradual ao longo dos dias. Os resultados também foram similares para os padrões P1 e P2, onde no dia 1 apresentou $22,99 \pm 0,6$ e $27,33 \pm 0,9$ e no dia 30 com $31,71 \pm 0,5$ e $32,53 \pm 1,3$, respectivamente. O antifúngico miconazol ($50 \mu\text{g}$), utilizado como controle positivo, se manteve estável ao longo dos dias, com $24,45 \pm 0,3$ no dia 1 e $25,10 \pm 0,1$ no dia 30, porém, com resultados menores em comparação com a formulação L que apresentou maiores resultados.

Em conclusão, para todos os microrganismos testados, a formulação presente no vidro L apresentou melhores resultados de inibição do crescimento microbiano, quando comparado com as outras formulações de vidros e com os padrões testados, sendo um indicativo promissor para futuras aplicações biotecnológicas ambientas na incorporação desse vidro em superfícies e materiais de construção.

4.3 DETERMINAÇÃO DA CIM DOS VIDROS, POR MICRODILUIÇÃO EM CALDO

A técnica de microdiluição em caldo foi realizada para a determinação da CIM das formulações de vidro contra os microrganismos testados. Os valores foram determinados através de inspeção visual, com base na turvação obtida pelo crescimento dos microrganismos. Para o ensaio com *S. aureus*, as imagens podem ser observadas no Apêndice A e para *E. coli* no Apêndice B, avaliados nos dias 1, 15 e 30.

Após o ensaio da CIM, foi realizado a CBM para confirmar os resultados a partir da CIM, determinando qual foi a concentração bactericida mínima necessária para os vidros inibirem o crescimento dos microrganismos, em comparação com os padrões. Os resultados da CBM para *S. aureus* e *E. coli* estão dispostos na Figura 14 e vão de encontro aos resultados obtidos no Apêndice A e B, respectivamente para cada microrganismo.

FIGURA 14 - RESULTADO DA CBM PARA *S. aureus* E *E. coli*

FONTE: A autora (2024).

LEGENDA: 1 ao 10 representam os valores das concentrações em mg/mL. 1 (250 mg/mL), 2 (125 mg/mL), 3 (62,5 mg/mL), 4 (31,25 mg/mL), 5 (15,62 mg/mL), 6 (7,81 mg/mL), 7 (3,90 mg/mL), 8 (1,95 mg/mL), 9 (0,9 mg/mL) e 10 (0,4 mg/mL). C+ (controle positivo, somente caldo MH e inóculo da bacteria). C- (controle negativo, somente caldo MH).

As concentrações determinadas tanto para CIM quanto para a CBM, em mg/mL, estão disponíveis na Tabela 9 para facilitar a visualização.

TABELA 9 - VALORES DAS CONCENTRAÇÕES INIBITÓRIAS MÍNIMAS (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) DOS VIDROS E PADRÕES PARA *S. aureus* E *E. coli*

Amostras	<i>S. aureus</i> (em mg/mL)						<i>E. coli</i> (em mg/mL)					
	D1		D15		D30		D1		D15		D30	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
A	1,95	1,95	1,95	1,95	7,81	7,81	-	-	-	-	-	-
L	3,90	3,90	1,95	1,95	3,90	3,90	125	125	62,5	62,5	62,5	62,5
K	7,81	7,81	15,62	15,62	3,90	3,90	-	-	-	-	-	-
P1	15,62	15,62	7,81	7,81	7,81	7,81	-	-	250	250	250	250
P2	15,62	15,62	7,81	7,81	7,81	7,81	-	-	-	-	-	-
P3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

FONTE: A autora (2024).

Comparando os resultados obtidos com as técnicas de poço-difusão e microdiluição em caldo, fica evidente que as formulações de vidro utilizadas são muito eficazes para inativar os microrganismos testados, principalmente o vidro de polifosfato incorporado com boro (vidro L).

Em relação às bactérias testadas, os vidros apresentaram efeito inibitório pronunciado sobre *S. aureus*, uma bactéria Gram-positiva, onde foi necessário cerca de 3,90 mg/mL necessário do vidro L para inibir o crescimento da bactéria. O vidro A, apresentou valores constantes de 1,95 mg/mL, no entanto, no dia 30 aumentou para 7,81 mg/mL. O vidro K foi menos eficiente comparado com os outros.

Para *E. coli* (Gram-negativa), somente o vidro L apresentou resultados promissores. No primeiro dia, a concentração mínima necessária foi de 125 mg/mL, e nos dias 15 e 30 o valor se manteve constante para 62,5 mg/mL, aumentando a eficiência do vidro. Esses resultados vão de encontro com os resultados obtidos no teste de estabilidade descrito no item 4.2.

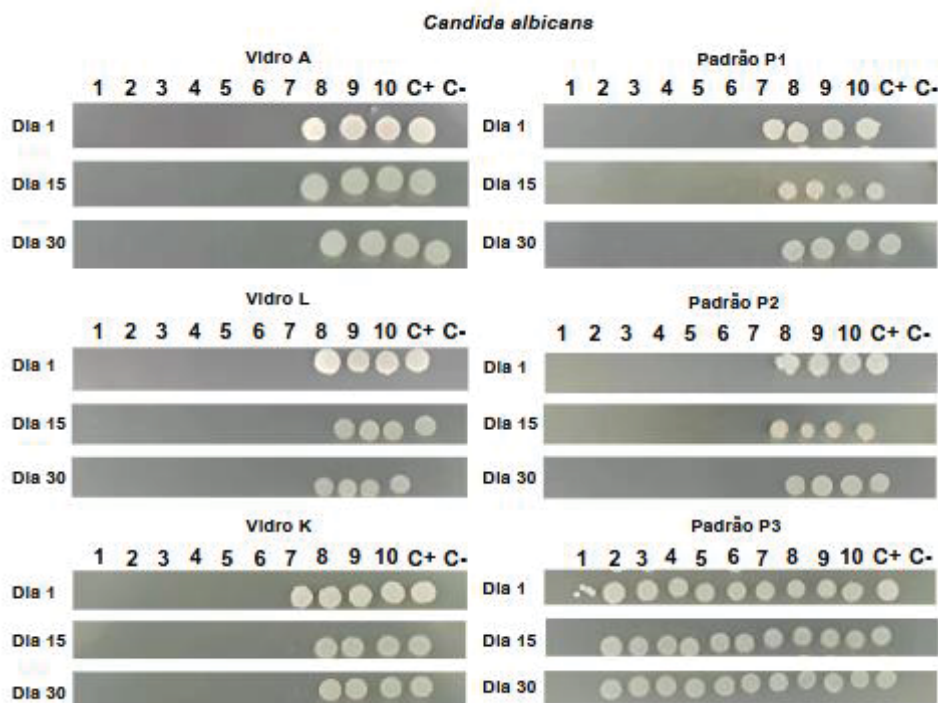
De acordo com a literatura, a ação dos polifosfatos é descrita raramente para bactérias Gram-negativas. Para as Gram-positivas, a cadeia de polifosfatos tem ação quelante sobre íons Mg^{2+} e Ca^{2+} , os quais são essenciais para a manutenção das ligações do ácido teicóico na parede celular dessas bactérias (BUŇKOVÁ et al., 2008).

Os íons Ca^{2+} podem também levar à despolarização da membrana celular e à subsequente morte da célula, conforme bem relatado em trabalhos anteriores (SIMCHI et al., 2011).

Embora os polifosfatos não sejam considerados agentes antimicrobianos pela *Food and Drug Administration* dos EUA (FDA), foi relatado que bactérias Gram-positivas e culturas bacterianas em fase inicial de crescimento (3 horas) são suscetíveis à inibição por polifosfatos (OBRITSCH et al., 2008), e a atividade antimicrobiana parece ser maior em meios com nutrientes mínimos do que em meios complexos (MOLINS, 1991).

Para o ensaio com *C. albicans*, as imagens podem ser observadas no Apêndice C e avaliadas nos dias 1, 15 e 30. Após o ensaio da CIM, foi realizada a CFM para confirmar os resultados a partir da CIM, determinando qual foi a concentração fungicida mínima necessária para os vidros inibirem o crescimento da levedura, em comparação com os padrões. Os resultados da CFM para *C. albicans* estão dispostas na Figura 15 e vão de encontro aos resultados obtidos no Apêndice C.

FIGURA 15 - RESULTADOS DA CFM PARA *C. albicans*



FONTE: A autora (2024).

LEGENDA: 1 ao 10 representam os valores das concentrações em mg/mL. 1 (250 mg/mL), 2 (125 mg/mL), 3 (62,5 mg/mL), 4 (31,25 mg/mL), 5 (15,62 mg/mL), 6 (7,81 mg/mL), 7 (3,90 mg/mL), 8 (1,95 mg/mL), 9 (0,9 mg/mL) e 10 (0,4 mg/mL). C+ (controle positivo, somente caldo RPMI e inóculo da levedura). C- (controle negativo, somente caldo RPMI).

As concentrações determinadas tanto para CIM quanto para a CFM, em mg/mL, estão disponíveis na Tabela 10.

TABELA 10 - VALORES DAS CONCENTRAÇÕES INIBITÓRIAS MÍNIMAS (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) DOS VIDROS E PADRÕES PARA *C. albicans*

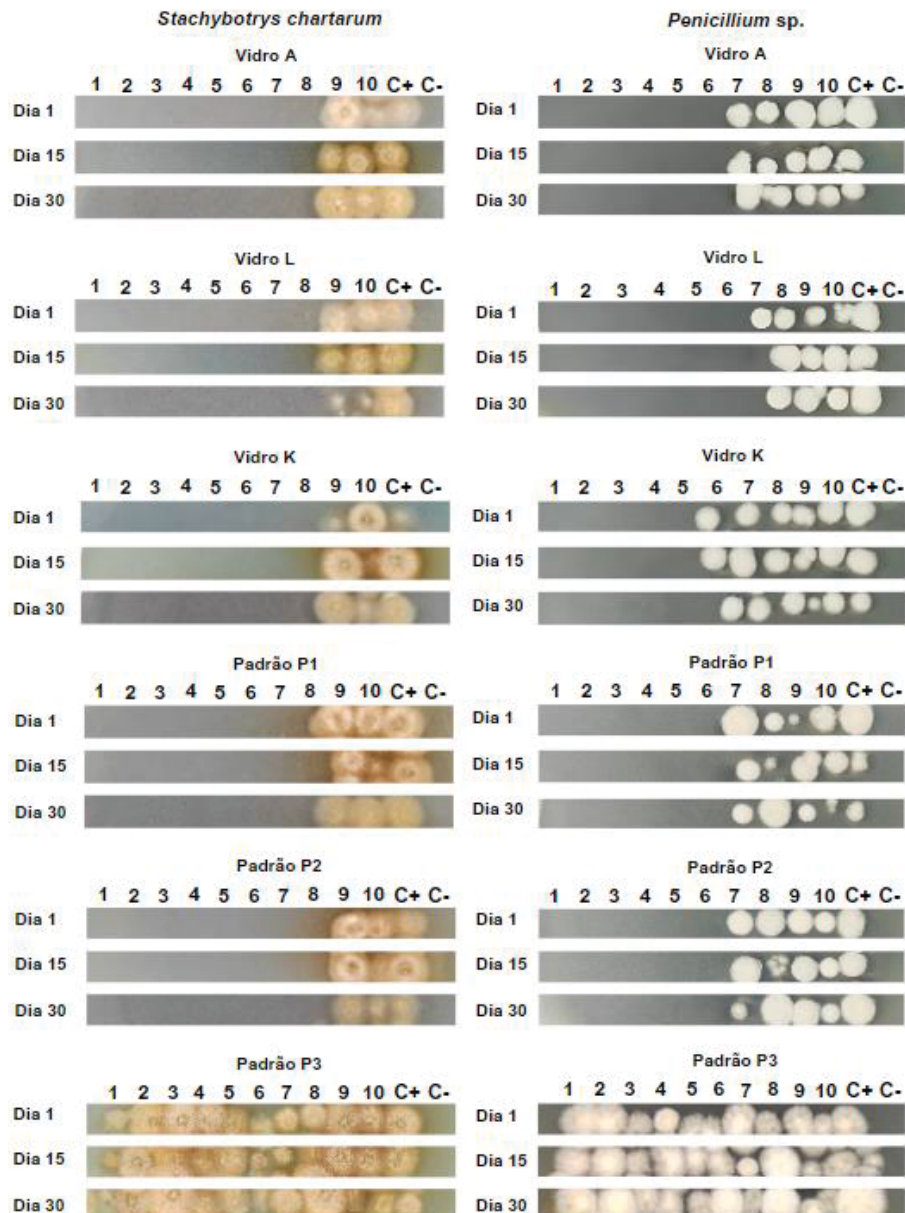
Amostras	<i>C. albicans</i> (em mg/mL)					
	D1		D15		D30	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
A	3,90	3,90	3,90	3,90	3,90	3,90
L	3,90	3,90	3,90	3,90	3,90	3,90
K	7,81	7,81	3,90	3,90	3,90	3,90
P1	3,90	3,90	3,90	3,90	3,90	3,90
P2	3,90	3,90	3,90	3,90	3,90	3,90
P3	-	-	-	-	-	-

FONTE: A autora (2024).

Tanto o vidro A quanto o vidro L demonstraram-se promissores para *C. albicans*, com uma CIM de 3,90 mg/mL para ambos os vidros ao longo dos três dias avaliados. No entanto, no item 4.2 (resultados de estabilidade pelo teste de poço-difusão), o vidro L apresentou resultados maiores de ação antimicrobiana do que o vidro A. Essa diferença pode ser explicada pela sensibilidade distinta das técnicas utilizadas. O teste de susceptibilidade antimicrobiana por microdiluição em caldo é mais sensível, pois permite a avaliação direta do crescimento do microrganismo em concentrações mínimas dos vidros. Além disso, deve-se considerar a diferença na concentração do inóculo com o microrganismo recomendada para cada técnica. De acordo com a CLSI, para a CIM, a concentração do inóculo para leveduras é de $2,5 \times 10^3$ UFC/mL, enquanto no método de poço-difusão é de 1 a $5,0 \times 10^6$ UFC/mL. Essa variação no inóculo pode afetar diretamente os resultados, uma vez que concentrações mais altas do microrganismo podem exigir concentrações maiores do antimicrobiano.

Para o ensaio com *S. chartarum*, as imagens podem ser observadas no Apêndice D e para *Penicillium* sp. no Apêndice E, avaliados nos dias 1, 15 e 30. A CFM foi realizada para confirmar os resultados a partir da CIM, determinando qual foi a concentração fungicida mínima necessária para os vidros inibirem o crescimento dos fungos, em comparação com os padrões. Os resultados da CFM para *S. chartarum* e *Penicillium* sp. estão dispostos na Figura 16.

FIGURA 16 - RESULTADOS DA CFM PARA *S. chartarum* E *Penicillium* sp.



FONTE: A autora (2024).

LEGENDA: 1 ao 10 representam os valores das concentrações em mg/mL. 1 (250 mg/mL), 2 (125 mg/mL), 3 (62,5 mg/mL), 4 (31,25 mg/mL), 5 (15,62 mg/mL), 6 (7,81 mg/mL), 7 (3,90 mg/mL), 8 (1,95 mg/mL), 9 (0,9 mg/mL) e 10 (0,4 mg/mL). C+ (controle positivo, somente caldo RPMI e inóculo da levedura). C- (controle negativo, somente caldo RPMI).

As concentrações determinadas tanto para CIM quanto para a CFM, em mg/mL, estão disponíveis na Tabela 11.

TABELA 11 - VALORES DAS CONCENTRAÇÕES INIBITÓRIAS MÍNIMAS (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) DOS VIDROS E PADRÕES PARA *S. chartarum* E *Penicillium* sp.

Amostras	<i>S. chartarum</i> (em mg/mL)						<i>Penicillium</i> sp. (em mg/mL)					
	D1		D15		D30		D1		D15		D30	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
A	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	7,81	7,81	7,81	7,81	7,81	7,81
L	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	7,81	7,81	3,90	3,90	3,90	3,90
K	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	15,62	15,62	15,62	15,62	15,62	15,62
P1	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	7,81	7,81	7,81	7,81	7,81	7,81
P2	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	7,81	7,81	7,81	7,81	7,81	7,81
P3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

FONTE: A autora (2024).

Todos os vidros (A, L e K) apresentaram os mesmos valores de concentração inibitória mínima de 1,95 mg/mL para *S. chartarum*, em contrapartida com o *Penicillium* sp., onde o vidro L foi mais eficiente nos dias 15 e 30 com 3,90 mg/mL.

Comparando os resultados da ação dos vidros sobre os fungos filamentosos, através das técnicas de poço-difusão e microdiluição em caldo, apesar de *S. chartarum* ser considerado um fungo com maior capacidade de produção de metabólitos tóxicos, *Penicillium* sp. apresentou menor inibição, com resultados mais pronunciados na técnica de microdiluição em caldo. Tolerância e resistência dos microrganismos à biocidas podem ocorrer por diversas razões, conhecidas como intrínsecas e adquiridas. A adaptação microbiana a uma dose subletal de um inibidor pode resultar na capacidade de sobreviver em concentrações mais elevadas do inibidor e/ou em crescimento mais rápido na concentração subletal do inibidor (LEVINSKAITÉ, 2012). Segundo Singh e Devi (2017), CIMs elevadas de antifúngicos para alguns isolados ambientais de *Penicillium* pode ser devido à exposição prévia desses isolados a antifúngicos agrícolas.

Foi demonstrado que *P. roquefortii* e outras espécies possuem alta tolerância ou resistência a conservantes ácidos fracos. O propionato de cálcio estimulou o crescimento fúngico dessa espécie após uma fase de latência prolongada (SUHR e NIELSEN, 2004). *P. roquefortii* e outras espécies de *Penicillium*, isoladas de queijos tratados com sorbato, foram capazes de metabolizar o sorbato e desenvolver-se a 9.000 ppm em caldo YM (*yeast malt*) (PITT e HOCKING, 2009). Os mecanismos de adaptação a substâncias antimicrobianas, seguindo Russel e Gould (2003), podem ser divididos em 3 estratégias: destruição/remoção do inibidor, prevenção do acesso à célula pelo inibidor e melhoria dos danos causados pelos inibidores. Portanto, pouco se sabe sobre os mecanismos de resistência dos fungos à biocidas.

Penicillium e outros gêneros de fungos ascomicetos, são conhecidos como saprófitos e encontrados no solo e na matéria orgânica em decomposição, podendo causar infecções nosocomiais em pacientes, principalmente em imunocomprometidos (BADIEE et al., 2024). Os esporos penetram no corpo humano por inalação ou inoculação através da pele ou da mucosa gastrointestinal e causam doenças sinopulmonares, pulmonares e outras doenças sistêmicas. *Penicillium* é um dos três fungos anemófilos de ambientes internos mais comuns, juntamente com *Aspergillus* e *Cladosporium*. Segundo Naraiyan e Gautam (2018), o gênero pode estar presente em diferentes habitats com condições desfavoráveis ao desenvolvimento microbiano, como altas concentrações de pH, salinidade, temperatura e baixa disponibilidade de nutrientes. Portanto, pode ser encontrado em superfícies como *drywall*, madeira, papel de parede, tapetes, tinta, tecidos, poeira, entre outros. Produz substâncias alergênicas e algumas podem causar infecções, principalmente em pessoas com sistemas imunológicos enfraquecidos.

Em ambas as análises de atividade antimicrobiana testadas, *S. chartarum* apresentou maior sensibilidade aos vidros testados. Uma possível hipótese para sua maior inibição após contato com os vidros é que *S. chartarum* apresenta crescimento relativamente lento ou moderadamente rápido dependendo do substrato, ao contrário de espécies de *Penicillium*, que apresenta crescimento rápido. Outra hipótese é que as formulações dos vidros possam ter diferentes modos de ação e possuírem diferentes alvos entre as espécies fúngicas, como relatado por Herrera et al. (2007). Dessa forma, os resultados confirmam que diferentes espécies de fungos podem apresentar variáveis perfis de sensibilidades à um determinado biocida, como discutido por Favero-longo e colaboradores (2018) e fornecem a oportunidade de

realizar ensaios direcionados e específicos para cada espécie, com a finalidade de calibrar produtos adequados e concentrações mínimas eficazes adequadas para controlar a deterioração fúngica, levando-se também em consideração as exigências ambientais de cada fungo, como umidade, temperatura e pH.

Até onde sabemos, o único trabalho que relata o potencial antifúngico de fosfatos sobre *C. albicans* foi publicado por Lee e colaboradores (2022). O estudo demonstrou que a incorporação de vidro à base de fosfato modificado com zinco nas resinas acrílicas autopolimerizáveis não afetou negativamente suas propriedades físicas e mecânicas. Além disso, as análises de microscopia eletrônica de varredura mostraram que o número de colônias de *C. albicans* aderentes à superfície da resina foi significativamente menor nas amostras contendo zinco, especialmente nas concentrações mais altas. A liberação de íons de cálcio, fósforo e zinco também foi maior nas amostras experimentais, com o aumento da concentração de zinco, o que contribui para a atividade antimicrobiana observada. No entanto, zinco em concentrações altas pode se tornar tóxico tanto para a saúde humana quanto para o meio ambiente (SCHOOFS et al., 2024).

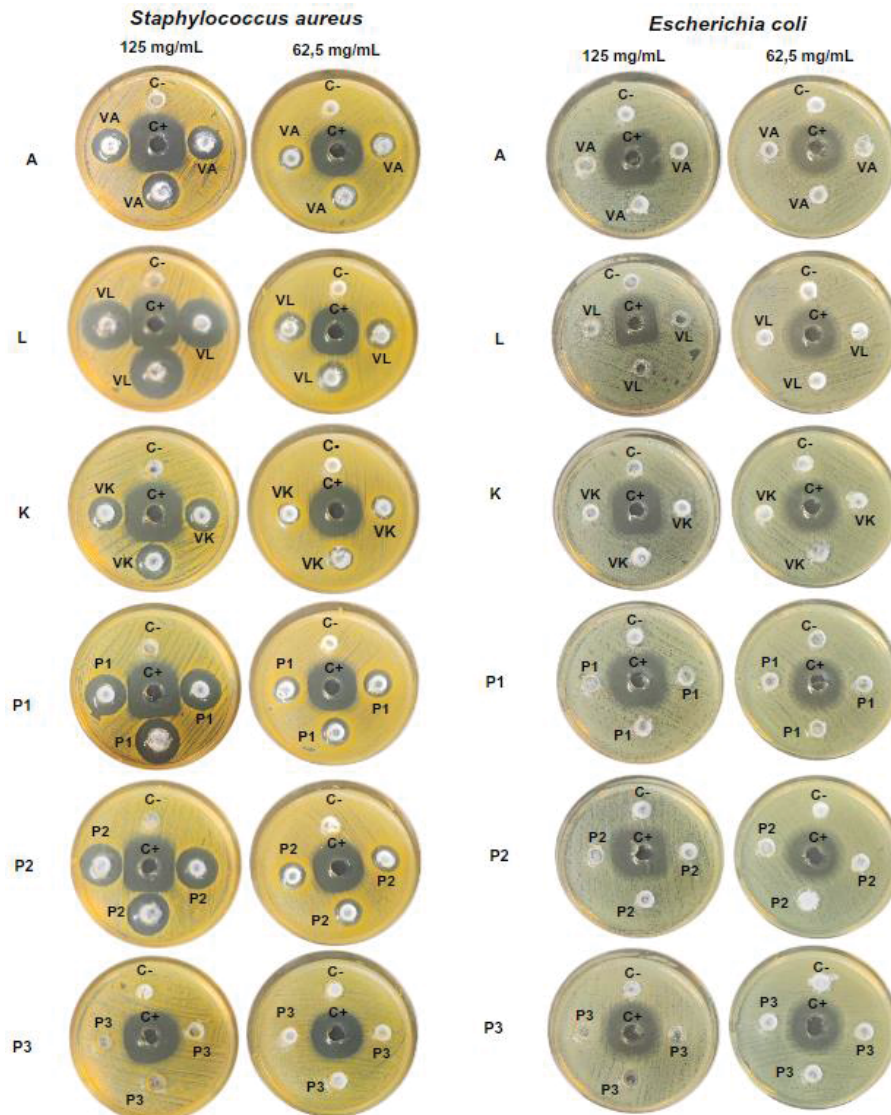
4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, POR POÇO-DIFUSÃO, DOS VIDROS INCORPORADOS NA ARGAMASSA

Os vidros e os padrões diluídos foram incorporados em argamassa com o objetivo de avaliar a ação antimicrobiana em duas concentrações diferentes. Após os resultados obtidos na CIM, os vidros e padrões foram adicionados na argamassa nas concentrações 125 mg/mL e 62,5 mg/mL, concentrações que apresentaram ação nos ensaios de microdiluição em caldo para a maioria dos microrganismos testados neste trabalho. O ensaio foi realizado através do poço-difusão, em triplicata, para cada um dos três vidros e comparados com os padrões. A dimensão dos halos formados ao redor dos poços foi avaliada para a determinação do efeito inibitório dos vidros sobre bactérias e fungos filamentosos e a levedura, após o período de contato. No controle positivo foi utilizado o antibiótico gentamicina a 10 µg/mL, para os ensaios com as bactérias, e o antifúngico miconazol a 50 µg/mL, para os fungos e a levedura.

Os resultados obtidos com as bactérias *S. aureus* e *E. coli* estão apresentados na Figura 17. Todos os vidros (A, L e K) tiveram efeito inibitório contra a *S. aureus*, onde visualmente foi possível observar uma maior inibição na concentração de 125

mg/mL, em comparação com a *E. coli* que não teve ação para nenhuma das concentrações testadas. Os padrões P1 e P2 tiveram ação somente para *S. aureus*, em ambas as concentrações. O padrão P3 não apresentou ação contra as bactérias, para nenhuma das concentrações.

FIGURA 17 - RESULTADOS OBTIDOS PARA *S. aureus* E *E. coli* APÓS INCORPORAÇÃO DA ARGAMASSA NOS VIDROS E PADRÕES EM DUAS CONCENTRAÇÕES DIFERENTES



FONTE: A autora (2024).

LEGENDA: C- (controle negativo, somente salina 0,85%), C+ (controle positivo, 10 µg de gentamicina), A (vidro polifosfato de sódio, temperatura de permanência 700 °C), L (vidro borofosfato com 10% mol B, temperatura de permanência 700 °C), K (vidro polifosfato de sódio, temperatura de permanência 800 °C), P1 (polifosfato de sódio), P2 (hexametáfosfato de sódio) e P3 (reagente precursor NaH_2PO_4).

Os resultados obtidos com as médias das triplicatas, em mm, para as duas concentrações testadas estão detalhados na Tabela 12.

TABELA 12 - ZONAS DE INIBIÇÃO (mm) DOS RESULTADOS OBTIDOS COM *S. aureus* E *E. coli* EM DUAS CONCENTRAÇÕES DIFERENTES NOS TESTES COM A ARGAMASSA

Amostras	<i>S. aureus</i> (em mm)		<i>E. coli</i> (em mm)	
	125 mg/mL	62,5 mg/mL	125 mg/mL	62,5 mg/mL
A	16,8	12,8	-	-
L	26,3	15,88	-	-
K	16,78	12,05	-	-
P1	19,84	13,64	-	-
P2	20,73	13,95	-	-
P3	-	-	-	-
C+	26,01	23,63	20,73	18,75
C-	-	-	-	-

FONTE: A autora (2024).

O vidro L apresentou melhores resultados quando aplicado na concentração de 125 mg/mL, com uma zona de inibição com média de 26,30 mm para *S. aureus*, em comparação com os padrões e o grupo controle (gentamicina). Para *E. coli*, nenhum dos vidros apresentou ação quando incorporado na argamassa.

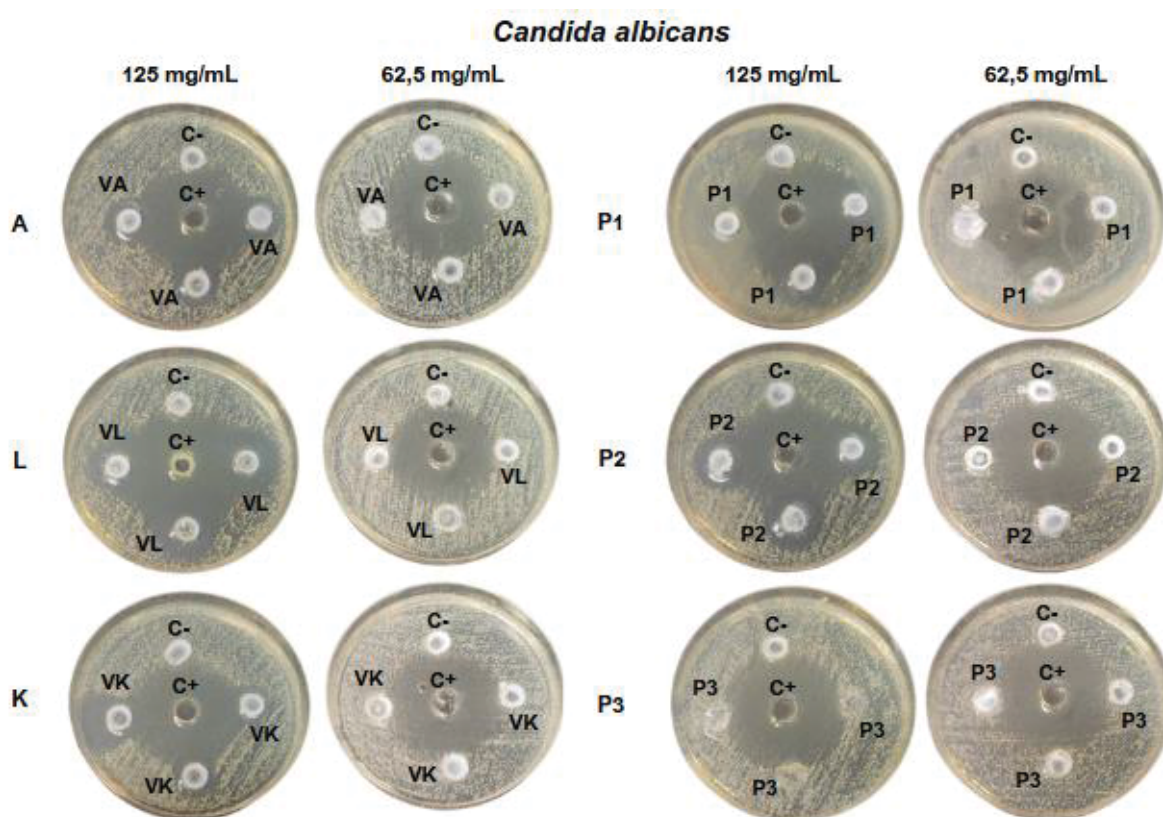
Muitos trabalhos disponíveis na literatura reportam análises da atividade antimicrobiana de compostos biocidas incorporados em materiais de construção, como *drywall*, gesso e argamassa (revisão em ŚLOSARCZYK et al., 2023). No nosso trabalho foi realizada a análise da ação antimicrobiana, através da técnica de poço-difusão, da argamassa incorporada com as formulações de polifosfato.

Neste trabalho, a utilização das bactérias *E. coli* e *S. aureus* e a levedura *C. albicans*, se justifica pelo fato desses microrganismos oportunistas serem importantes causadores de doenças hospitalares e a incorporação das formulações dos vidros em

argamassa pode ser particularmente eficientes para edifícios específicos, como instalações de saúde, onde a incidência de infecções nosocomiais causadas por agentes patogênicos resistentes e bactérias formadoras de biofilmes é elevada, conforme relatado por Maillard e Centeleghe (2023) e Voicu et al. (2024).

Os resultados obtidos com a levedura *C. albicans* estão dispostos na Figura 18 e para *S. chartarum* e *Penicillium* sp., na Figura 19.

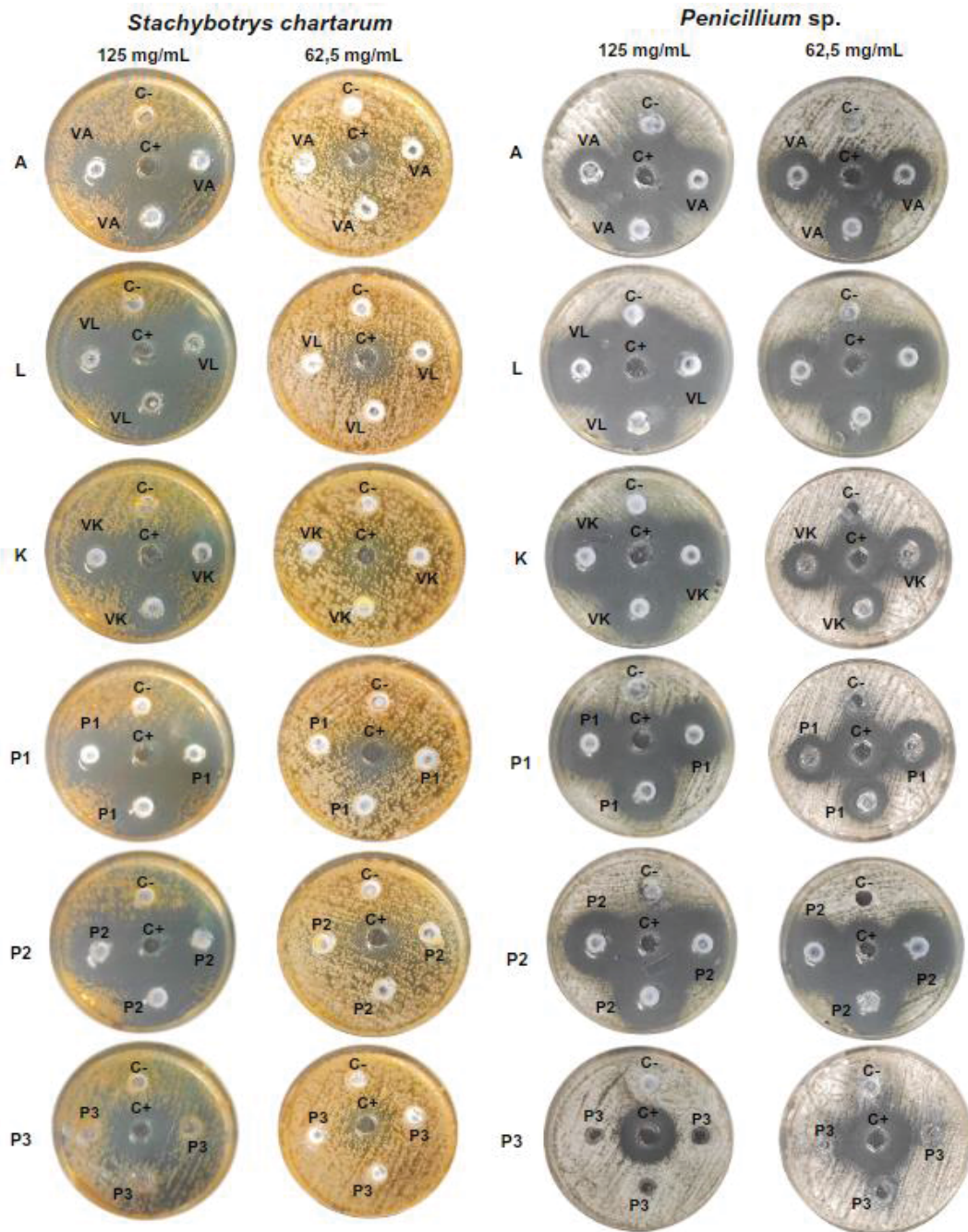
FIGURA 18 - RESULTADOS OBTIDOS PARA *C. albicans* APÓS INCORPORAÇÃO DA ARGAMASSA NOS VIDROS E PADRÕES EM DUAS CONCENTRAÇÕES DIFERENTES



FONTE: A autora (2024).

LEGENDA: C- (controle negativo, somente salina 0,85%), C+ (controle positivo, 50 µg de miconazol), A (vidro polifosfato de sódio, temperatura de fusão 700 °C), L (vidro borofosfato com 10% mol B, temperatura de fusão 700 °C), K (vidro polifosfato de sódio, temperatura de fusão 800 °C), P1 (polifosfato de sódio), P2 (hexametáfosfato de sódio) e P3 (reagente precursor NaH_2PO_4).

FIGURA 19 - RESULTADOS OBTIDOS PARA *S. chartarum* E *Penicillium* sp. APÓS INCORPORAÇÃO DA ARGAMASSA NOS VIDROS E PADRÕES EM DUAS CONCENTRAÇÕES DIFERENTES



FONTE: A autora (2024).

LEGENDA: C- (controle negativo, somente salina 0,85%), C+ (controle positivo, 50 µg de miconazol), A (vidro polifosfato de sódio, temperatura de fusão 700 °C), L (vidro borofosfato com 10% mol B, temperatura de fusão 700 °C), K (vidro polifosfato de sódio, temperatura de fusão 800 °C), P1 (polifosfato de sódio), P2 (hexametáfosfato de sódio) e P3 (reagente precursor NaH_2PO_4).

Os resultados obtidos com as médias das triplicatas, em mm, para as duas concentrações testadas estão detalhados na Tabela 13.

TABELA 13 - ZONAS DE INIBIÇÃO (mm) DOS RESULTADOS OBTIDOS COM *C. albicans*, *S. chartarum* E *Penicillium* sp. EM DUAS CONCENTRAÇÕES DIFERENTES NOS TESTES COM A ARGAMASSA

Amostras	<i>C. albicans</i> (em mm)		<i>S. chartarum</i> (em mm)		<i>Penicillium</i> sp. (em mm)	
	125 mg/mL	62,5 mg/mL	125 mg/mL	62,5 mg/mL	125 mg/mL	62,5 mg/mL
A	17,92	-	22,18	-	23,34	21,85
L	24,75	-	26,92	-	27,19	24,98
K	16,84	-	18,30	-	20,01	17,09
P1	20,40	-	24,40	-	25,06	23,26
P2	21,44	-	25,90	-	26,35	24,78
P3	-	-	-	-	-	-
C+	32,50	28,83	23,27	21,54	24,17	26,21
C-	-	-	-	-	-	-

FONTE: A autora (2024).

Para todos os fungos, foi observado que a concentração de 125 mg/mL apresentou halos de inibição ao redor dos poços. Apenas o *Penicillium* sp. apresentou resultados na concentração de 65 mg/mL. De acordo com Hench e Jones (2015), os fosfatos dependem da liberação de diferentes tipos de íons quando incorporados em diferentes materiais para exercerem sua ação antimicrobiana. Além disso, a argamassa possui um pH mais alcalino, o que pode reagir com os componentes químicos dos vidros, que tendem ser mais ácidos, alterando a sua atividade antimicrobiana.

Devido à maior ocorrência de fungos e leveduras em ambientes úmidos, trabalhos envolvendo esses materiais focam principalmente nesses microrganismos, comparando com as bactérias. Entre os fungos, um maior enfoque é dado sobre

fungos filamentosos, em comparação com leveduras, devido à maior facilidade de colonização das superfícies pelas hifas desses microrganismos e por existirem muitas espécies de fácil colonização em ambientes úmidos. Para leveduras do gênero *Candida*, trabalhos utilizando compostos biocidas têm sido realizados principalmente em superfícies de dispositivos médicos e odontológicos e cimento de restaurações (El ZAWAWY et al., 2023).

Em um recente estudo, Iyigundogdu e Saribas (2022) examinaram o efeito dos compostos de boro nas propriedades mecânicas e antimicrobianas de argamassas endurecidas, através de teste de superfície. A atividade antimicrobiana desse material foi demonstrada para a levedura *C. albicans* e o fungo filamentoso *A. niger*.

A exposição de fungos em ambientes úmidos ou danificados pela água tornou-se uma grande preocupação devido aos seus potenciais efeitos para a saúde (CHAKRAVARTY, 2022). Certos fungos, como espécies de *Cladosporium* e *Penicillium*, podem colonizar tanto materiais úmidos como semi-secos, enquanto as espécies de *Chaetomium* e *Stachybotrys* necessitam de materiais úmidos para crescer e multiplicar-se.

Murtoniemi et al. (2003) relataram que a remediação incompleta do crescimento de fungos por agentes antifúngicos aumenta a toxicidade dos esporos em certos fungos. No estudo realizado por esses autores, *S. chartarum* foi cultivado em placas de gesso com modificações na sua composição, incluindo a adição de um biocida (1% Parmetol DF 17). O estudo demonstrou que a adição do biocida foi apenas parcialmente eficaz na prevenção do crescimento de fungos nas placas de gesso modificadas.

Herrera et al. (2007) inocularam seis espécies de fungos comuns em ambientes internos, incluindo *S. chartarum* e *P. chrysogenum* e uma matriz de celulose tratada com poliborato de sódio e demonstram que o boro possui efeito esporocida para as seis espécies de fungos utilizadas no estudo neste estudo. Os autores hipotetizaram que o boro possa inibir as enzimas serino-proteases, impedindo a polimerização da quitina, um importante constituinte da parede celular dos fungos, e interferir em algumas das vias metabólicas.

A concentração de micotoxinas produzidas por *S. chartarum* é relativamente alta em comparação com outros fungos prevalentes em ambientes internos, como *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. *S. chartarum* produz numerosos metabólitos bioativos danosos à saúde, como tricotecenos macrocíclicos, tricoverróides

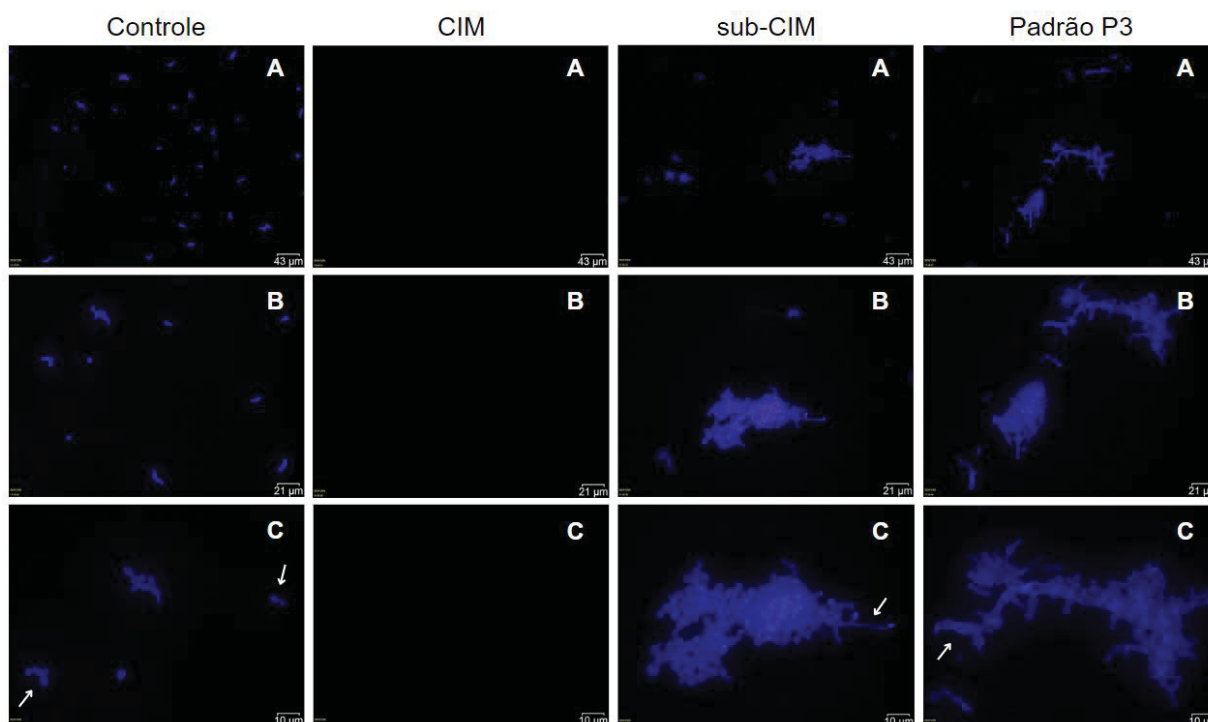
relacionados, fenilspirodrimanos (espirolactonas e espirolactamas) e ciclosporinas (potentes agentes imunossupressores) (NIELSEN, 2003). Portanto, devem ser tomadas medidas preventivas para eliminar o desenvolvimento de umidade, que é o principal fator que promove o crescimento de fungos. Os fungicidas usados em ambientes fechados devem ser atóxicos, hipoalergênicos, inodoros e não voláteis.

4.5 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DOS FUNGOS

O *Calcofluor White* (CW) é um corante fluorescente utilizado em microscopia de fluorescência para a visualização de fungos e leveduras. O corante possui afinidade com polissacarídeos presentes na parede celular desses microrganismos, em especial quitina, celulose e ligações 1,3 e 1,4 β -glucanas. Quando o corante se liga a essas estruturas, emite fluorescência azul (faixa de 300 a 440 nm). O KOH 10% é adicionado nas amostras, para melhorar a visualização das amostras no microscópio (PERRINE-WALKER, 2022). Através dos resultados obtidos na CIM, a microscopia de fluorescência foi realizada com o vidro que apresentou o melhor resultado para os fungos e levedura, sendo o vidro L (com boro) e comparado com o padrão P3 que não apresentou atividade antimicrobiana.

Os resultados obtidos para a levedura *C. albicans* após 72 horas de incubação da CIM tratadas com o vidro L estão demonstrados na Figura 20.

FIGURA 20 - MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE *C. albicans* COM CALCOFLUOR WHITE APÓS TRATAMENTO COM O VIDRO L COMPARADO COM O PADRÃO P3



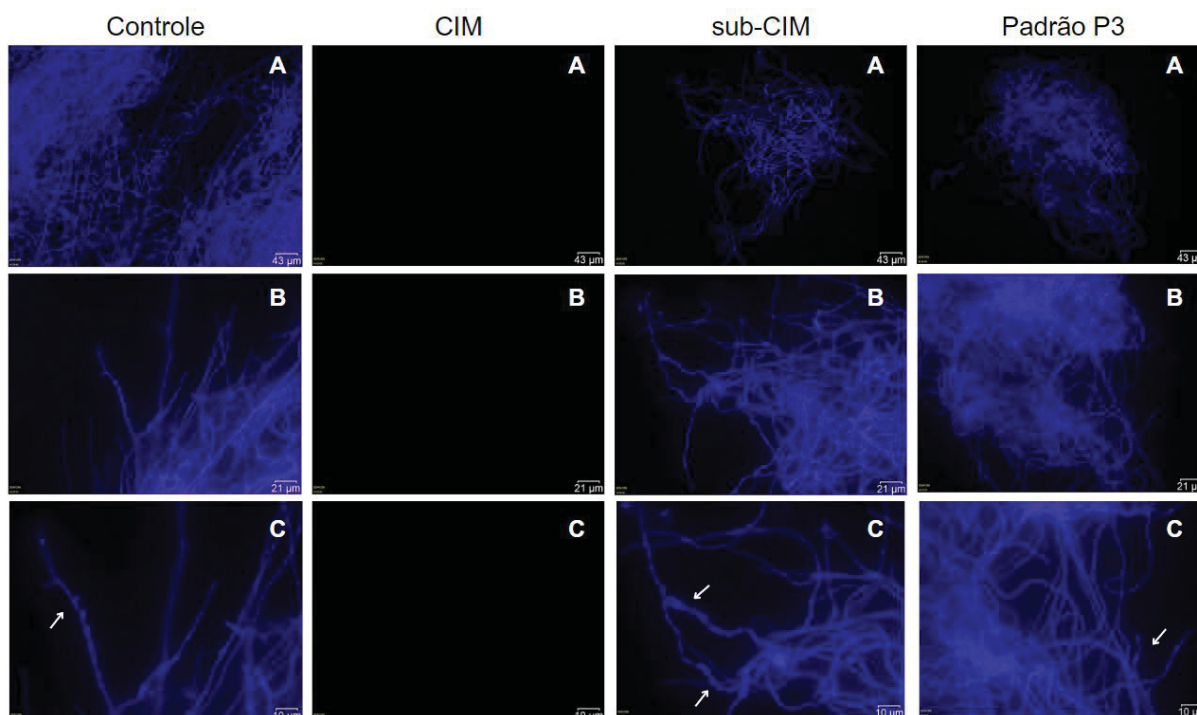
FONTE: A autora (2024).

LEGENDA: Aumento 15 vezes, tamanho 43 μm (imagens A), aumento 30 vezes, tamanho 21 μm (imagens B) e aumento 60 vezes, tamanho 10 μm (imagens C). Controle representa células não tratadas (controle positivo). CIM sem a presença de células na concentração 1,95 mg/mL tratado com o vidro L. sub-CIM com presença de células tratadas na concentração 0,97 mg/mL tratado com o vidro L. Padrão P3 na concentração 250 mg/mL (reagente de partida NaH_2PO_4).

No controle (células da levedura sem tratamento), foi possível observar células ovaladas e algumas em brotamento, sem alterações na morfologia. Na CIM, não ocorreu a emissão de fluorescência da levedura, indicando que não há presença de células após o tratamento com o vidro na concentração de 1,95 mg/mL. Na sub-CIM (concentração 0,97 mg/mL), foi possível observar algumas células com alterações na morfologia, apresentando contornos irregulares, células agrupadas e mais infladas, comparadas com o controle e formação de pseudohifas. O padrão P3, apesar de não ter ação antifúngica contra a *C. albicans* na concentração de 250 mg/mL, foi capaz de causar pequenas alterações na morfologia da levedura e formação de algumas pseudohifas.

Os resultados obtidos para o fungo *S. chartarum* após o tratamento de 72 horas com o vidro estão ilustrados na Figura 21.

FIGURA 21 - MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE *S. chartarum* COM CALCOFLUOR WHITE APÓS TRATAMENTO COM O VIDRO L COMPARADO COM O PADRÃO P3



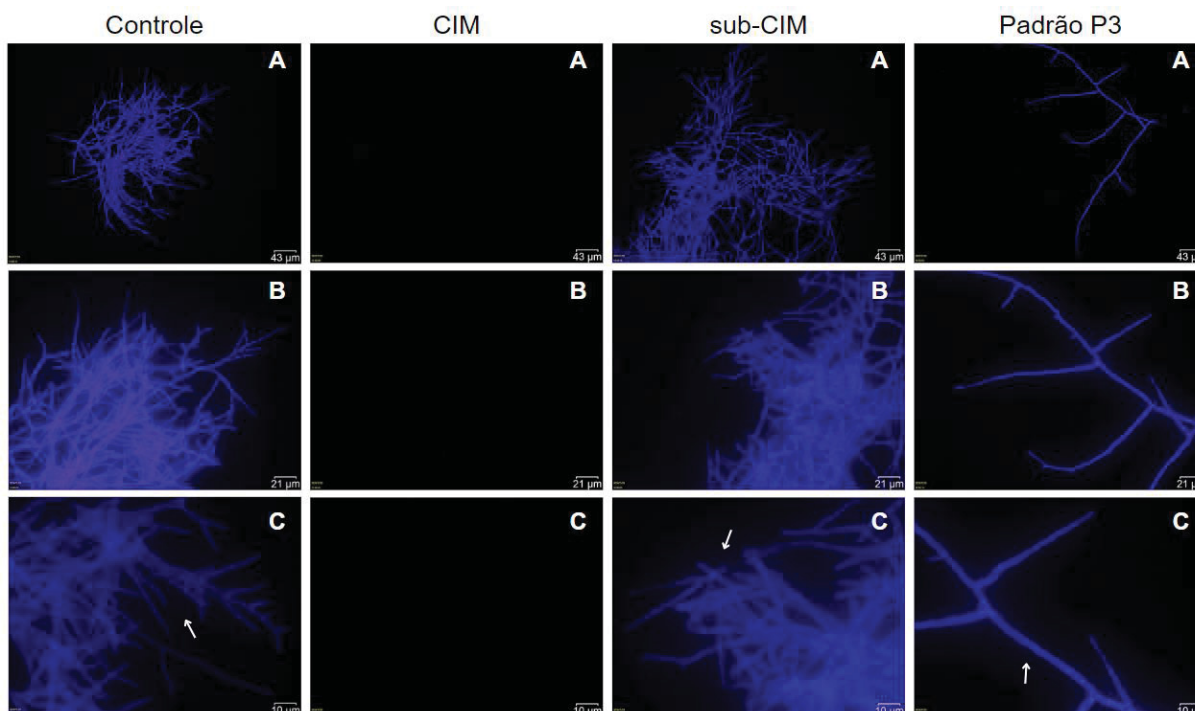
FONTE: A autora (2024).

LEGENDA: Aumento 15 vezes, tamanho 43 μm (imagens A), aumento 30 vezes, tamanho 21 μm (imagens B) e aumento 60 vezes, tamanho 10 μm (imagens C). Controle representa células não tratadas (controle positivo). CIM sem a presença de células na concentração 1,95 mg/mL tratado com o vidro L. sub-CIM com presença de células tratadas na concentração 0,97 mg/mL tratado com o vidro L. Padrão P3 na concentração 250 mg/mL (reagente de partida NaH_2PO_4).

O grupo controle apresentou maior quantidade de *S. chartarum*, com hifas bem formadas, alongadas e septadas. Na CIM, o fungo foi tratado na concentração de 1,95 mg/mL, com ausência na emissão de fluorescência, indicando que não há presença do microrganismo após tratamento com o vidro L, comparado com o grupo controle (sem tratamento). A sub-CIM, com concentração de 0,97 mg/mL, apresentou menor quantidade de hifas quando comparado com o controle. Além disso, é possível observar alterações na parede das hifas. O padrão P3 não apresentou alterações na morfologia das hifas, mantendo a estrutura intacta.

Os resultados obtidos para o fungo *Penicillium* sp. após o tratamento de 72 horas com o vidro estão dispostos na Figura 22.

FIGURA 22 - MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE *Penicillium* sp. COM CALCOFLUOR WHITE APÓS TRATAMENTO COM O VIDRO L COMPARADO COM O PADRÃO P3



FONTE: A autora (2024).

LEGENDA: Aumento 15 vezes, tamanho 43 μm (imagens A), aumento 30 vezes, tamanho 21 μm (imagens B) e aumento 60 vezes, tamanho 10 μm (imagens C). Controle representa células não tratadas (controle positivo). CIM sem a presença de células na concentração 7,81 mg/mL tratado com o vidro L. sub-CIM com presença de células tratadas na concentração 3,90 mg/mL tratado com o vidro L. Padrão P3 na concentração 250 mg/mL (reagente de partida NaH_2PO_4).

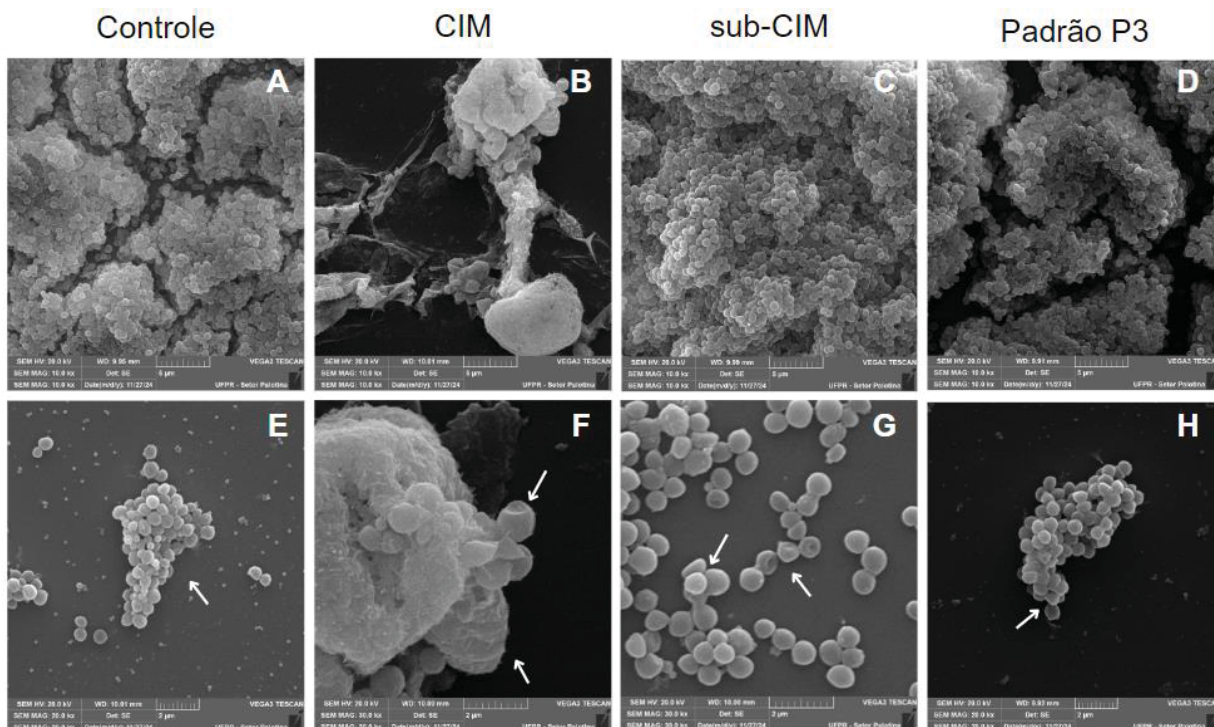
As hifas de *Penicillium* sp. são alongadas e septadas conforme demonstrado no grupo controle, sem deformações na estrutura. A CIM, na concentração de 7,81 mg/mL, não emitiu a fluorescência do fungo após tratamento com o vidro L, indicando que não há presença do microrganismo. Já a sub-CIM, com concentração de 3,90 mg/mL, apresentou a ruptura da hifa do *Penicillium* sp. conforme a seta indicando na imagem C (sub-CIM), na Figura 22. No entanto, não foram observadas outras deformações visuais na estrutura, demonstrando que esse fungo é mais resistente comparado com os outros microrganismos testados no trabalho. Da mesma forma para o padrão P3, sem alterações na estrutura da hifa.

Para as bactérias, ensaios foram realizados com coloração com iodeto de propídio, que é permeável em células inviáveis, no entanto os resultados foram contraditórios, provavelmente devido à degradação do corante e os resultados não foram considerados neste trabalho.

4.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As eletromicrografias obtidas por MEV da *S. aureus* tratadas após 24 horas com o vidro L e comparados com o padrão P3 estão dispostas na Figura 23.

FIGURA 23 - MICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DE VARREDURA DE *S. aureus* APÓS TRATAMENTO COM O VIDRO L COMPARADO COM O PADRÃO P3



FONTE: A autora (2024).

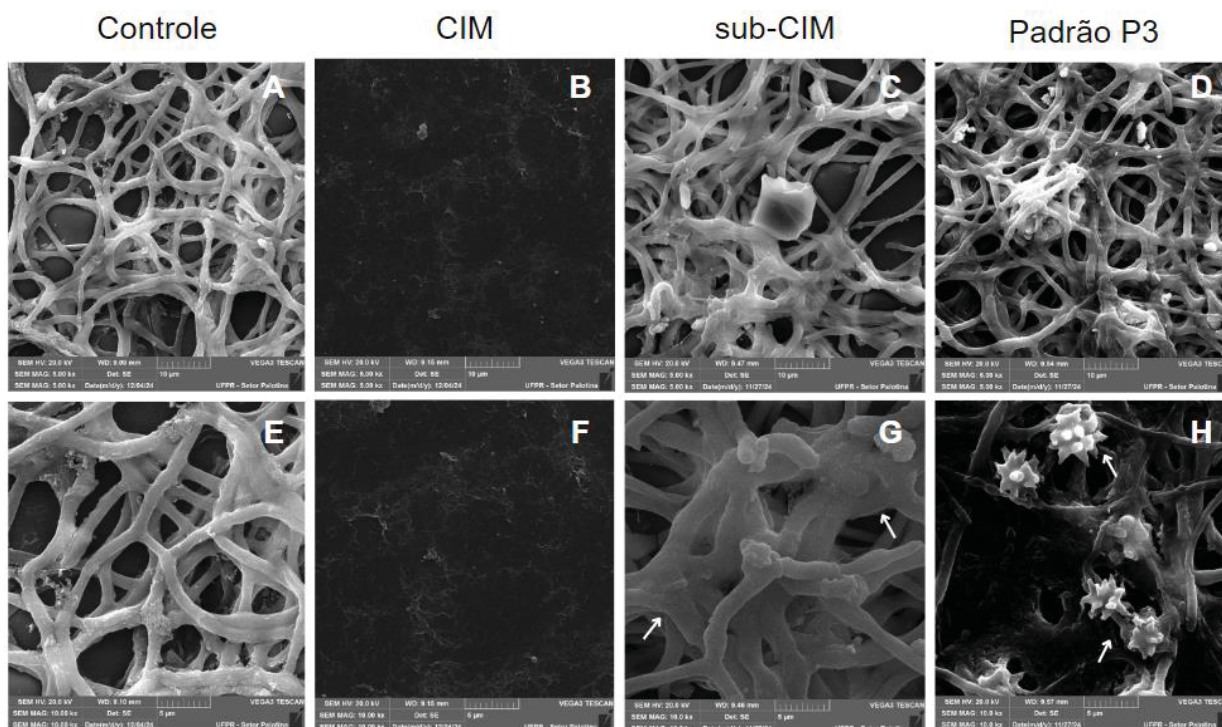
LEGENDA: Aumento de 10.000 vezes, tamanho 5 µm (imagens A, B, C e D). Aumento de 20.000 vezes, tamanho 2 µm (imagens E, F, G e H). Controle com células não tratadas. CIM com presença de células e detritos celulares na concentração 3,90 mg/mL tratado com o vidro L. sub-CIM com presença de células deformadas e tratadas na concentração 1,95 mg/mL com o vidro L. Padrão P3 na concentração 250 mg/mL (reagente de partida NaH_2PO_4).

O grupo controle (células não tratadas) demonstra a cepa *S. aureus* totalmente íntegra e com o formato esférico esperado. Na imagem E, é possível observar a formação de “cachos”, estrutura característica da bactéria e sem danos celulares. As imagens B e F representam a CIM após 24 horas tratadas com o vidro L na concentração de 3,90 mg/mL. É possível observar uma grande massa celular formada e algumas células com deformações na superfície. A sub-CIM representada nas imagens C e G apresentou diversas células com deformações na superfície da célula, tratadas na concentração de 1,95 mg/mL. Maier e colaboradores (1999) já haviam relatado a ocorrência de células alongadas e lisadas, de *B. cereus*, em contato com a

concentração sub-CIM de sais de polifosfatos. O padrão P3 não apresentou alterações na morfologia, quando tratado na concentração de 250 mg/mL.

As eletromicrografias de MEV obtidas de *S. chartarum* tratadas após 72 horas com o vidro L e comparados com o padrão P3 estão apresentadas na Figura 24.

FIGURA 24 - MICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DE VARREDURA DE *S. chartarum* APÓS TRATAMENTO COM O VIDRO L COMPARADO COM O PADRÃO P3



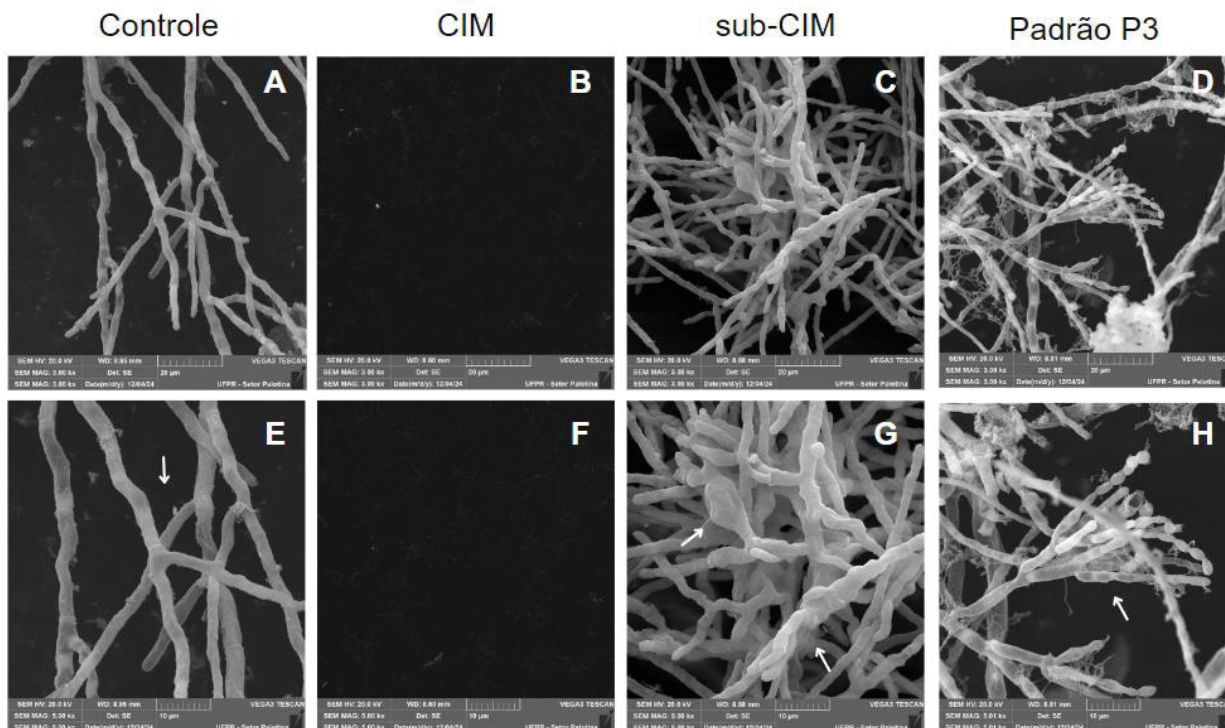
FONTE: A autora (2024).

LEGENDA: Aumento de 5.000 vezes, tamanho 10 µm (imagens A, B, C e D). Aumento de 10.000 vezes, tamanho 5 µm (imagens E, F, G e H). Controle representa células não tratadas (controle positivo). CIM sem a presença de detritos celulares na concentração 1,95 mg/mL tratado com o vidro L. sub-CIM com presença de células deformadas e tratadas na concentração 0,97 mg/mL com o vidro L. Padrão P3 na concentração 250 mg/mL (reagente de partida NaH_2PO_4).

No grupo controle (sem tratamento) é possível observar hifas íntegras e sem deformações na sua estrutura. Nas imagens B e F, representando a CIM na concentração de 1,95 mg/mL, não há presença de detritos celulares ou hifas do fungo, em comparação com a sub-CIM (0,97 mg/mL), que apresentou diversas deformações e com a superfície rugosa das hifas, conforme a indicação das setas na imagem G. Apesar do padrão P3 não ter ação direta nos fungos, ele levou a formação da estrutura principal de reprodução do *S. chartarum* denominada de conidióforo.

As eletromicrografias obtidas por MEV para *Penicillium* sp., tratado após 72 horas com o vidro L e comparados com o padrão P3, são dispostas na Figura 25.

FIGURA 25 - MICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DE VARREDURA DE *Penicillium* sp. APÓS TRATAMENTO COM O VIDRO L COMPARADO COM O PADRÃO P3



FONTE: A autora (2024).

LEGENDA: Aumento de 5.000 vezes, tamanho 10 µm (imagens A, B, C e D). Aumento de 10.000 vezes, tamanho 5 µm (imagens E, F, G e H). Controle representa células não tratadas (controle positivo). CIM sem a presença de detritos celulares na concentração 7,81 mg.mL⁻¹ tratado com o vidro L. sub-CIM com presença de células deformadas e tratadas na concentração 3,90 mg.mL⁻¹ com o vidro L. Padrão P3 na concentração 250 mg.mL⁻¹ (reagente de partida NaH₂PO₄).

No grupo controle (sem tratamento) é possível observar hifas íntegras, alongadas e septadas, sem deformações na sua estrutura. Nas imagens B e F, representando a CIM na concentração de 7,81 mg/mL, não há presença de detritos celulares ou hifas do fungo, em comparação com a sub-CIM (3,90 mg/mL), que apresentou diversas deformações e com a superfície rugosa das hifas, conforme a indicação das setas na imagem G. Além disso, é possível observar uma maior quantidade de presença de hifas em comparação com o grupo controle. Apesar do padrão P3 não ter ação direta nos fungos, ele levou a formação da estrutura principal de reprodução do *Penicillium* sp (imagens D e H).

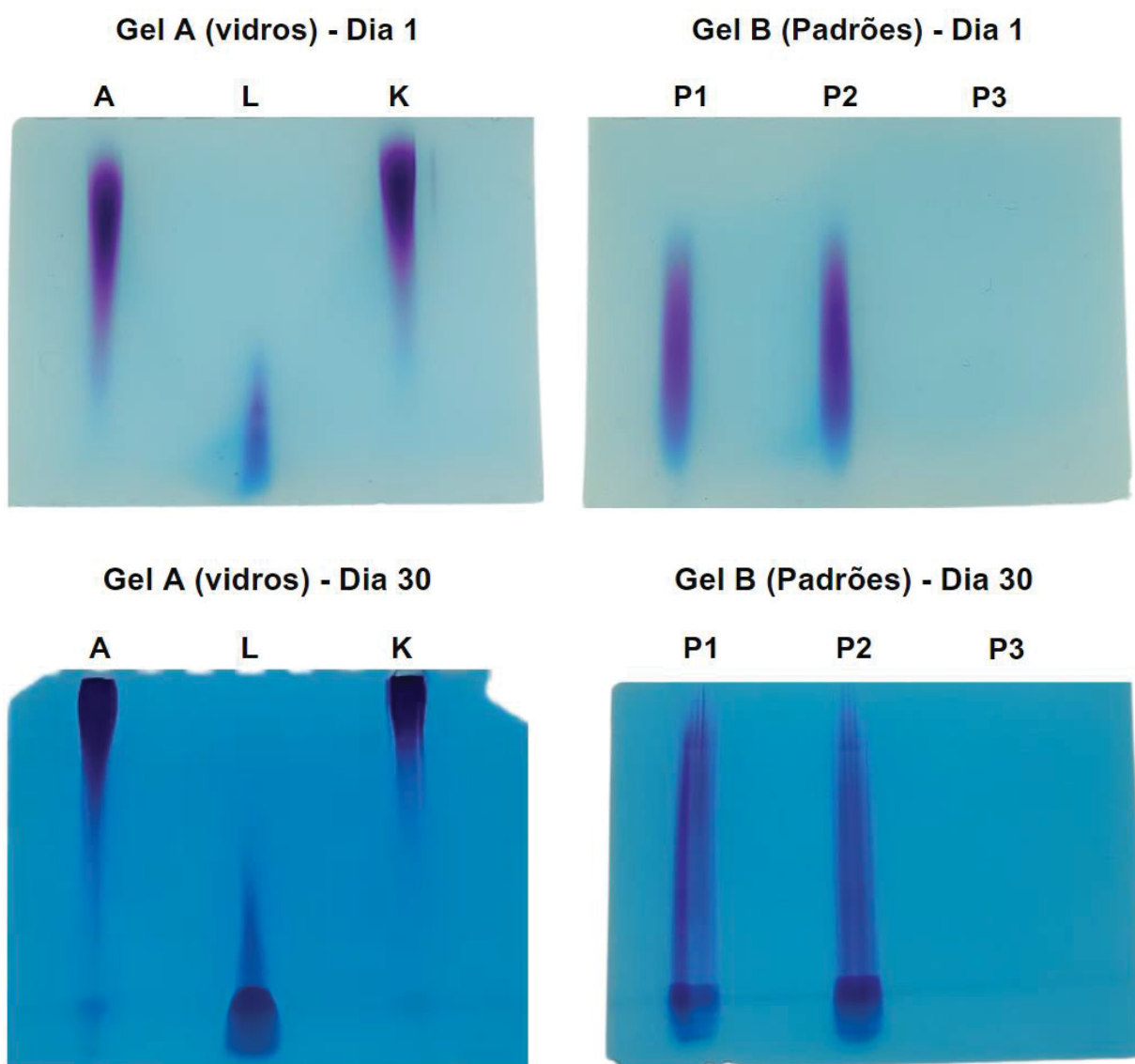
4.7 AVALIAÇÃO DE POLIFOSFATOS POR PAGE (ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA)

Os polifosfatos podem apresentar grande variação de tamanho dependendo de sua fonte de origem, e suas atividades biológicas estão diretamente relacionadas ao comprimento do polímero (SMITH et al., 2018). Assim, em estudos com polifosfatos de origem biológica ou sintética, torna-se relevante determinar o tamanho desses polímeros. Neste trabalho, a técnica de PAGE foi utilizada exclusivamente para avaliar a migração das amostras e identificar diferenças no perfil eletroforético no momento da diluição inicial e após 30 dias.

Para uma estimativa mais precisa do tamanho exato do polímero de polifosfatos, recomenda-se o uso de análises complementares, como a RNM (Ressonância Magnética Nuclear) e titulação que gera um valor médio das cadeias (MOMENI e FILIAGGI, 2013; SCHNEIDER, R. em comunicação pessoal), ensaios que ainda não foram realizados por nossa equipe.

Como já discutido no subtítulo 4.2 (teste de estabilidade), após 30 dias, os vidros A e K mantêm a atividade antimicrobiana, para todos os microrganismos. O vidro L apresenta efeito antimicrobiano também para todos os microrganismos, no primeiro dia de diluição, mas após 15 dias, o efeito antimicrobiano foi maior para *E. coli*. Este comportamento possivelmente está relacionado a uma maior liberação de íons bioativos ao longo do tempo. O perfil eletroforético (PAGE) dos vidros e padrões estão elucidados na Figura 26 e avaliados no dia 1 e no dia 30 da diluição dos vidros e padrões.

FIGURA 26 - PERFIL ELETROFORÉTICO (PAGE) DOS VIDROS E PADRÕES AVALIADOS NO DIA 1 E NO DIA 30 DE DILUIÇÃO



FONTE: A autora (2024).

LEGENDA: Eletroforese em géis de poliacrilamida a 10% contendo 7M de uréia de 2,5mg/ml das formulações de vidro. Os géis foram corados com azul de toluidina e fotodocumentados em transiluminador de luz LED branca.

A técnica de PAGE é frequentemente utilizada para analisar polifosfatos inorgânicos (polyP). Quando os vidros foram analisados no primeiro dia de diluição, é possível observar que as formulações A e K apresentam migrações eletroforéticas similares, enquanto o vidro L, uma banda mais no final do gel. Os padrões de polifosfatos P1 e P2 apresentam migrações similares entre si e o P3 (apenas o monômero NaH_2PO_4) não apresenta perfil eletroforético, devido ao seu baixo tamanho

molecular. Após 30 dias de diluição, é possível observar uma alteração no perfil eletroforético dos vidros e padrões.

4.8 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS VIDROS

A Tabela 14 indica os valores obtidos do pH das amostras de vidros e padrões em meio aquoso.

TABELA 14 - VALORES DOS pH OBTIDOS PARA OS VIDROS E PADRÕES

Amostras	pH
A	4,40
L	3,43
K	4,48
P1	4,17
P2	4,72
P3	3,78

FONTE: A autora (2024).

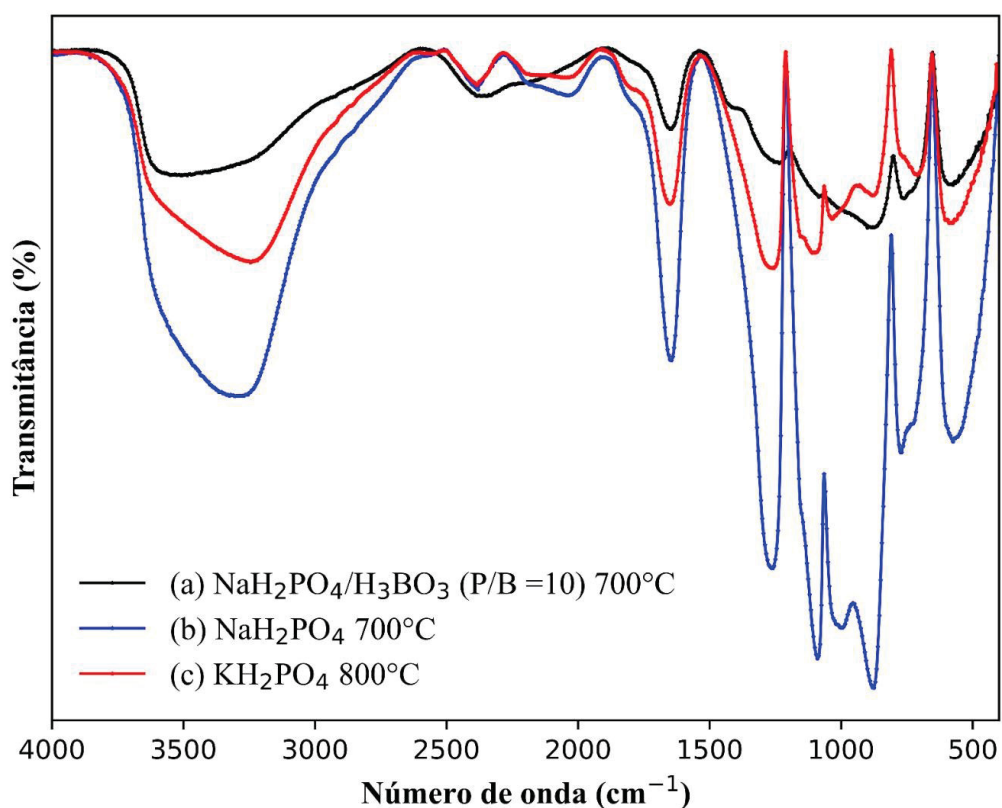
Todos os vidros analisados apresentaram valores de pH abaixo de 7, confirmando um caráter ácido das amostras. A presença de boratos no vidro L contribui diretamente para o menor valor de pH observado (3,43). O ácido bórico (H_3BO_3) é conhecido por atuar como um ácido fraco em solução aquosa, promovendo a liberação de íons H^+ , o que intensifica a acidez do meio. Além disso, os fosfatos presentes no NaH_2PO_4 possuem uma natureza química que favorece a liberação de íons ácidos. A combinação desses dois componentes (boratos e fosfatos) pode resultar em uma maior reatividade do vidro L em solução aquosa, justificando o pH mais baixo.

Os vidros A e K, apesar de serem compostos apenas por fosfato de sódio (NaH_2PO_4), apresentaram valores de pH mais elevados (4,40 e 4,48, respectivamente). No caso dos padrões, as diferenças de pH observadas podem ser atribuídas à natureza química das espécies fosfatadas. O padrão P3, composto por fosfato de sódio (NaH_2PO_4), apresentou um pH mais baixo (3,78), o que é consistente com a maior facilidade de liberação de íons H^+ pelo fosfato monoácido. Já os padrões

P1 e P2, compostos por polifosfatos e hexametafosfatos, apresentaram valores de pH superiores (4,17 e 4,72, respectivamente). Essa diferença pode ser explicada pelo fato de os polifosfatos e hexametafosfatos apresentarem estruturas mais complexas e menos propensas à dissociação completa em meio aquoso, o que reduz a liberação de íons H^+ e, conseqüentemente, eleva o pH.

Os espectros na região do infravermelho foram utilizados com a finalidade de investigar as mudanças estruturais decorrentes dos compostos dos vidros e avaliar o comportamento de bandas características, com faixa espectral de números de onda de 4000 a 500 cm^{-1} , dispostos na Figura 27 e descritos na Tabela 15.

FIGURA 27 - ESPECTROS DE FTIR OBTIDOS DOS VIDROS



FONTE: A autora (2024).

LEGENDA: (a) vidro L, cor preto, (b) vidro A, cor azul e (c) vidro K, cor vermelho.

TABELA 15 - MODOS VIBRACIONAIS NO ESPECTRO INFRAVERMELHO

Frequência (cm ⁻¹)	Indicação	Modo vibracional	Referência
500 - 700	Reticulação da rede vítrea	Deformação do grupo fosfato (PO ₄)	LOCHAIWATANA et al., 2015
1200 - 900	Cadeias fosfato e conectividade PO ₄	Estiramento assimétrico do grupo fosfato (PO ₄)	ENDO e SUZUKI, 2022
3500 - 3000	Higroscopicidade e presença de OH ⁻	Estiramento do grupo OH (água absorvida ou grupos hidroxila)	TACKER et al., 2024

FONTE: A autora (2024).

Os espectros de FTIR apresentados na Figura 27 revelam as características estruturais das amostras vítreas compostas por diferentes combinações de H₃BO₃ e KH₂PO₄, processadas em distintas condições térmicas (700 °C e 800 °C). O intervalo espectral de 4000 a 500 cm⁻¹ foi analisado para identificar as mudanças nas ligações químicas e nas estruturas de rede dos vidros.

Conforme a Tabela 15, a região de 1200 a 900 cm⁻¹ apresenta picos atribuídos às vibrações assimétricas de estiramento do grupo fosfato (PO₄). Esses picos refletem a presença e a conectividade de tetraedros fosfatos na rede vítrea (ENDO e SUZUKI, 2022). As bandas na região de 500 a 700 cm⁻¹ são características das vibrações de deformação do grupo PO₄ (LOCHAIWATANA et al., 2015). Observa-se que essas bandas apresentam pequenas variações de intensidade entre as amostras, sugerindo diferenças na densidade de reticulação da rede vítrea. A região de 3500 a 3000 cm⁻¹ evidencia bandas de estiramento de grupos OH, relacionadas à higroscopicidade do material. A presença mais intensa dessas bandas pode indicar maior quantidade de água absorvida ou grupos hidroxila na rede (TACKER et al., 2024).

Fazendo um comparativo entre as amostras testadas, a amostra (a) (NaH₂PO₄/H₃BO₃, P/B=10, 700 °C), apresentou bandas intensas na região de 1200 a 900 cm⁻¹, indicando boa formação de cadeias fosfato, enquanto a presença de H₃BO₃ influencia as ligações P-O-B, como demonstrado pela suavização das bandas. A amostra (b) (NaH₂PO₄, 700 °C), exibiu bandas mais acentuadas e definidas na região de 500 a 700 cm⁻¹, o que sugere maior presença de ligações P-O-P e menor modificação estrutural em comparação às outras amostras. E a amostra (c) (KH₂PO₄, 800 °C), mostrou deslocamentos das bandas para menores números de onda em comparação com (a) e (b), o que pode ser associado ao aumento da densidade de

reticulação devido à maior temperatura de fusão. Esse comportamento também pode estar relacionado à introdução de sódio, que altera as propriedades estruturais e térmicas do vidro.

Por fim, é possível analisar os impactos estruturais e propriedades das amostras. A presença de H_3BO_3 em (a) contribui para a formação de ligações P-O-B, que melhoram a estabilidade térmica e diminuem a higroscopicidade do vidro, como evidenciado por bandas menos intensas na região de 3500 a 3000 cm^{-1} . A maior temperatura de fusão em (c) resulta em uma rede mais densa e organizada, refletida em bandas mais bem definidas e deslocadas para menores números de onda.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho avaliou o potencial antimicrobiano de diferentes vidros de fosfatos bioativos: vidro A (vidro baseado em polifosfato de sódio, obtido com taxa de aquecimento de 20 °C/min, durante 10 min a 700 °C), L (vidro fosfato com 10% (mol) de boro, obtido com taxa de aquecimento de 20 °C/min, durante 10 min a 700 °C), K (vidro com sódio, obtido com taxa de aquecimento de 20 °C/min, durante 10 min a 800 °C), comparados com padrões comerciais. Os vidros A, L e K exibiram efeito inibitório contra *S. aureus* e nenhum efeito foi observado para *E. coli*. Para os fungos filamentosos *Penicillium* sp., *S. chartarum* e a levedura *C. albicans*, todos os vidros apresentaram ação inibitória, onde o vidro L (com boro) apresentou melhores resultados para todos os fungos e a bactéria Gram-positiva. Com base nas imagens de MEV, pode-se concluir que os microrganismos apresentaram alterações morfológicas importantes em contato com os vidros. A determinação da concentração inibitória mínima das formulações dos vidros será importante para trabalhos futuros, visando a incorporação desses elementos vítreos em materiais de revestimento, como a argamassa. Analisar a interação dos microrganismos com a argamassa, com e sem a incorporação dos vidros será uma proposta para futuros trabalhos, permitindo um estudo mais aplicado, fornecendo uma alternativa para utilização de novos biocidas. A análise da estabilidade dos vidros após 15 e 30 dias de diluição indicam que os efeitos variáveis observados, como o aumento da ação sobre alguns microrganismos ao longo dos dias, podem estar relacionados com a despolimerização da matriz vítrea e ao efeito das cadeias poliméricas geradas no processo. Adicionalmente, análises por PAGE, utilizando padrões de DNA, como recomendado por alguns autores, serão realizadas com o intuito de estimar o tamanho das cadeias de fosfato para investigar de forma mais aprofundada a relação entre proporções de fosfato e as atividades antimicrobianas. Em conclusão, para todos os microrganismos testados, a formulação presente no vidro L apresentou melhores resultados de inibição do crescimento microbiano, quando comparado com as outras formulações de vidros e com os padrões testados, sendo um indicativo promissor para futuras aplicações biotecnológicas ambientas na incorporação desse vidro em superfícies e materiais de construção.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-HAMEED, A. A.; KHODER, M. I.; IBRAHIM, Y. H.; SAEED, Y.; OSMAN, M. E.; GHANEM, S. Study on some factors affecting survivability of airborne fungi. **Science of The Total Environment**, v. 414, p. 696–700, 2012.
- ALARJANI, K. M.; SKALICHY, M. Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* and its *in-vitro* potential inhibition efficiency. **Journal of infection and public-health**, v. 14, n. 12, p. 1796-1801, 2021.
- ALEKSIC, B.; DRAGHI, M.; RITOUX, S.; BAILLY, S.; LACROIX, M.; OSWALD, I. P.; BAILLY, J-D.; ROBINE, E. Aerosolization of Mycotoxins after Growth of Toxinogenic Fungi on Wallpaper. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 16, 2017.
- ALONSO, V.; LEMOS, J.; NASCIMENTO, M. Yeast biofilms on abiotic surfaces: Adhesion factors and control methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 400, 2016.
- ARIF, M.; KATAFYGIOTOU, M.; MAZROEI, A.; KAUSHIK, A.; ELSARRAG, E. Impact of indoor environmental quality on occupant well-being and comfort: A review of the literature. **International Journal of Sustainable Built Environment**, 2016, v. 5, p. 1–11, 2016.
- ARORA, R.; ROY, T.; ADAK, P. A review of the impact of nanoparticles on environmental processes. **BIO Web of Conferences**, v. 86, 2024.
- ATRIWAL, T.; AZEEM, K.; HUSAIN, F. M.; HUSSAIN, A.; KHAN, M. N.; ALAJMI, M. F.; ABID, M. Mechanistic Understanding of *Candida albicans* Biofilm Formation and Approaches for Its Inhibition. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 2021.
- AUYEUNG, A.; CASILLAS-SANTANA, M. A.; MARTÍNEZ-CASTAÑÓN, G. A, SLAVIN, Y. N.; ZHAO, W.; ASNIS, J.; et al. Effective Control of Molds Using a Combination of Nanoparticles. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, 2017.
- BADIEE, P.; GHADIMI-MOGHADAM, A.; BAYATMANESH, H.; SOLTANI, J.; SALIMI-KHORASHAD, A. R.; GHASEMI, F.; AMIN SHAHIDI, M.; JAFARIAN, H. Environmental surveillance of fungi and susceptibility to antifungal agents in tertiary care hospitals. **Microbiology Spectrum**, 2024.

BELLOTTI, N.; SALVATORE, L.; DEYÁ, C.; DEL PANNO, M. T.; DEL AMO, B.; ROMAGNOLI, R. The application of bioactive compounds from the food industry to control mold growth in indoor waterborne coatings. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 104, p. 140-144, 2013.

BETTAUER, V.; COSTA, A. C. B. P.; OMRAN, R. P.; MASSAHI, S.; KIRBIZAKIS, E.; SIMPSON, S.; DUMEAUX, V.; LAW, C.; WHITEWAY, M.; HALLETT, M. T. A Deep Learning Approach to Capture the Essence of *Candida albicans* Morphologies. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 5, 2022.

BRASIL. Congresso Nacional. Projeto de lei nº 3428/2023. Autor: Arnaldo Jardim. **Congresso Nacional**, Brasília, DF, 2023.

BRAZ, V. S.; MELCHIOR, KMOREIRA, C. G. *Escherichia coli* as a Multifaceted Pathogenic and Versatile Bacterium. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, 2020.

BUŇKOVÁ, L.; PLEVA, P.; BUNKA, F.; VALÁŠEK, P.; KRACMAR, S. Antibacterial effects of commercially available phosphates on selected microorganisms. **Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis**, v. 56, n. 5, p. 19-24, 2008.

CAVALHEIRO, M.; TEIXEIRA, M. *Candida* Biofilms: Threats, Challenges, and Promising Strategies. **Frontiers in Medicine**, v. 5, 2018.

CHAKRAVARTY, P. Mycobiota and mycotoxin-producing fungi in southern California: their colonisation and in vitro interactions. **Mycology**, v. 13, n. 4, p. 293–304, 2022.

CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.

CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard—Third Edition. CLSI document M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.

COOLEY, J. D.; WONG, W. C.; JUMPER, C. A.; STRAUS, D. C. Fungi and the indoor environment: their impact on human health. **Advances in Applied Microbiology**, v. 55, p. 3-30, 2024.

COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; RODRIGUES, A. G. *Candida albicans* Antifungal Resistance and Tolerance in Bloodstream Infections: The Triad Yeast-Host-Antifungal. **Microorganisms**, v. 8, n. 2, p. 154, 2020.

DA SILVA, G.D., GUIDELLI, E.J., DE QUEIROZ-FERNANDES, G.M. et al. Silver nanoparticles in building materials for environment protection against microorganisms. **International Journal Of Environmental Science And Technology**, v.16, p. 1239-1248, 2019.

DE PAIVA, F. F. G.; TAMASHIRO, J. R.; SILVA, L. H. P.; DOS SANTOS, L. S. R.; GOUVEIA, J. S.; MAGDALENA, A. G.; BAFFA, O.; PIRES, R. H.; KINOSHITA, A. Mortar functionalized with silver nanoparticles for antifungal activity. **Journal of Building Engineering**, v. 92, 2024.

DIAS FILHO, F. A. **Preparação e caracterização de coacervatos e vidros a base de fosfato, dopados com európio**. 2003. 110 p. Tese (Doutorado em Química Inorgânica) – Instituto de Química de Araraquara. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2003.

DYLAĞ, M.; SPYCHAŁA, K.; ZIELINSKI, J.; ŁAGOWSKI, D.; GNAT, S. Update on *Stachybotrys chartarum*-Black Mold Perceived as Toxigenic and Potentially Pathogenic to Humans. **Biology**, v. 11, n. 3, p. 352, 2022.

DONALD, I. W. Preparation, properties and chemistry of glass-and glass-ceramic-to-metal seals and coatings. **Journal of Materials Science**, v. 28, n. 11, p. 2841-2886, 1993.

EDIGER, M. D.; ANGELL, C. A.; NAGEL, S. R. Supercooled liquids and glasses. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 100, n. 31, p. 13200-13212, 1996.

EL ZAWAWY, N. A.; EL-SAFETY, S.; KENAWY, E. R.; IBRAHIM SALEM, S.; ALI, S. S.; MAHMOUD, Y. A. Exploring the biomedical potential of a novel modified glass ionomer cement against the pandrug-resistant oral pathogen *Candida albicans* SYN-01. **Journal of Oral Microbiology**, v. 15, n. 1, 2023.

ENDO, J.; SUZUKI, Y. Reassessment of vibration spectra in alkaline earth metaphosphate crystals. **Journal of the ceramic society**, v. 130, n. 5, p. 351-354, 2022.

FAVERO-LONGO, S. E.; BRIGADECI, F.; SEGIMIRO, A.; VOYRON, S.; CARDINALI, M.; GIRLANDA, M.; PIERVITTORI, R. Biocide efficacy and consolidant effect on the mycoflora of historical stuccos in indoor environment. **Journal of Cultural Heritage**, v. 34, p. 33-42, 2018.

GADD, G. M.; FOMINA, M.; PINZARI, F. Fungal biodeterioration and preservation of cultural heritage, artwork and historical artefacts: extremophily and adaptation **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 88, 2024.

GADD, G. M.; MCGREGOR, L. Fungal colonization and penetration of mortar as a suitable simulant for concrete: Implications for fungal biodeterioration in the built environment. **Fungal Biology**, v. 128, n. 5, p. 1899-1906, 2024.

GUEVARA-SUAREZ, M.; SUTTON, D. A.; CANO-LIRA, J. F.; GARCÍA, D.; MARTIN-VICENTE, A.; WIEDERHOLD, N.; GUARRO, J.; GENÉ, J. Identification and Antifungal Susceptibility of *Penicillium*-Like Fungi from Clinical Samples in the United States. **Journal Clinical Microbiology**, v. 54, n. 8, p.2155-2161, 2016.

HASSAN, M.; TUCKMAN, H. P.; PATRICK, R. H.; KOUNTZ, D. S.; KOHN, J. L. Cost of hospital-acquired infection. **Hospital Topics**, v. 88, p. 82–89, 2010.

HEKMAT-SHOAR, M. H.; HOGARTH, C. A.; MORIDI, G. R. A study of the electrical properties of molybdenum phosphate glasses. **Journal of Materials Science**, v. 20, n. 3, p. 889-894, 1985.

HENCH, L. L.; JONES, J. R. Bioactive glasses: frontiers and challenges. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 3, 2015.

HERRERA, J.; OMODON, M. E.; DILLAVOU, C. L. The sporocidal and sporostatic effect of sodium polyborate and boron-treated cellulose insulation on common indoor fungal species. **Micología Aplicada Internacional**, v. 19, n. 2, p. 35-49. Colegio de Postgraduados, Puebla, México, 2007.

HOLME, J. A.; ØYA, E., AFANOU, A. K. J.; ØVREVIK, J.; EDUARD, W. Characterization and pro-inflammatory potential of indoor mold particles. **Indoor Air**, v. 30, p. 662-681, 2020.

HOWDEN, B. P.; GIULIERI, S. G.; WONG FOK LUNG, T. *et al.* *Staphylococcus aureus* host interactions and adaptation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 21, p. 380–395, 2023.

IBRAHIM, S. R. M.; CHOUDHRY, H.; ASSERI, A. H.; ELFAKY, M. A.; MOHAMED, S. G. A.; MOHAMED, G. A. *Stachybotrys chartarum* - A Hidden Treasure: Secondary Metabolites, Bioactivities, and Biotechnological Relevance. **Journal of Fungi**, v. 8, p. 504, 2022.

IHTISHAM, M.; NOORI, A.; YADAV, S.; SARRAF, M.; KUMARI, P.; BRESTIC, M.; IMRAN, M.; JIANG, F.; YAN, X.; RASTOGI, A. Silver Nanoparticle's Toxicological Effects and Phytoremediation. **Nanomaterials (Basel)**, v. 11, n. 9, 2021.

IYIGUNDOGDU, Z.; SARIBAS, I. The effect of various boron compounds on the antimicrobial activity of hardened mortars. **Construction and Building Materials**, v. 351, 2022.

JADHAV, G.; SALUNKHE, D.; NERKAR, D.; BHADEKAR, R.; Novel *Staphylococcus* sp. isolated from wall scrapings of a historical building in India. **Annals of Microbiology**, v. 60, n. 2, 2010

JAYATILAKE, J. A. A review of the ultrastructural features of superficial candidiasis. **Mycopathologia**, v. 171, n. 4, p.235-250, 2011.

KARASU, B.; BEREKET. O.; BIRYAN. E.; SANOĞLU.D. The Latest Developments in Glass Science and Technology. **Ei-Cezerî Journal of Science and Engineering**, v. 4, n. 2, p. 209-233, 2017.

KIRTHIKA, S.K.; GOEL, G.; MATTHEWS, A.; GOEL, S. Review of the untapped potentials of antimicrobial materials in the construction sector. **Progress in Materials Science**, v. 133, 2023.

KOHZADI, S.; MÜLLER, A.; ÖSTERLUND, H.; VIKLANDER, M. Building surface materials as potential sources of biocides: Insights from laboratory leaching investigations of different material types. **Chemosphere**, v. 368, n. 143741, 2024.

KUMAR, Binod. Phosphate glasses and glass-ceramics for biomaterials. **Transactions of the Indian Ceramic Society**, v. 44, n. 6, p. 123-127, 1985.

LEE, M. J.; KIM, M. J.; MANGAL, U.; SEO, J. Y.; KNOW, J. S.; CHOI, S. H.. Zinc-modified phosphate-based glass micro-filler improves *Candida albicans* resistance of auto-polymerized acrylic resin without altering mechanical performance. **Scientific reports**, v. 12, n. 19456, 2022.

LEVINSKAITĖ, L. Susceptibility of food-contaminating *Penicillium* genus fungi to some preservatives and disinfectants. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 19, n. 1, p. 85-89, 2012.

LINDEMANN, V.; SCHLEINER, T.; MAIER, U.; FELS, H.; CRAMER, B.; HUMPF, H-U. Analysis of mold and mycotoxins in naturally infested indoor building materials. **Mycotoxin Research**, v. 38, p. 205–220, 2022.

LOCHAIWATANA, Y.; POOLTHONG, S.; HIRATA, I.; OKAZAKI, M.; SWASDISON, S.; VONGSAVAN, N. The synthesis and characterization of a novel potassium chloride-fluoridated hydroxyapatite varnish for treating dentin hypersensitivity. **Dental Materials Journal**, v. 34, n. 1, p. 31–40, 2015.

LOPEZ, G. P.; GALLEGOS, M. V.; PELUSO, M. A.; DAMONTE, L. C.; SAMBETH, J. E.; BELLOTTI, N. ZnO recovered from spent alkaline batteries as antimicrobial additive for waterborne paints. **Emergent Materials**, v. 6, n. 1, p. 147-158, 2023.

MADUKA, C. M.; IGWILO, N. Microorganisms Survive In Paints. **Current Analysis on Biotechnology**, v. 2, p. 1-5, 2019.

MAIER, S. K.; SCHERER, S.; LOESSNER, M. J. Long-chain polyphosphate causes cell lysis and inhibits *Bacillus cereus* septum formation, which is dependent on divalent cations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 9, p. 3942-3949, 1999.

MAILLARD, J. Y.; CENTELEGHE, I. How biofilm changes our understanding of cleaning and disinfection. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, v.12, n. 95, 2023.

MENDES, E.; MENDES, E.; SAVI, G. D.; ANGIOLETTO, E.; RIELLA, H. G.; FIORI, M. A. High performance bactericidal glass: evaluation of the particle size and silver nitrate concentration effect in ionic exchange process. **Cerâmica**, v. 64, n. 370, p. 156-165, 2018.

MOLINS, R. A. Phosphates in foods. **CRC Press, Boca Raton, Fla**, 1991.

MOMENI, A.; FILIAGGI, M. J. Synthesis and characterization of different chain length sodium polyphosphates. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 382, p. 11–17, 2013.

MURTONIEMI, T.; NEVALAINEN, A.; HIRVONEN, M. R. Effect of plasterboard composition on *Stachybotrys chartarum* growth and biological activity of spores. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 7m p. 3751-3757, 2003.

NARAIAN, R.; GAUTAM, R. L. *Penicillium* Enzymes for the Saccharification of Lignocellulosic Feedstocks. In: Gupta VK & Rodriguez-Couto S (Eds), New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering. **Netherlands: Elsevier**, p. 121-136, 2018.

NIELSEN, K. F. Mycotoxin production by indoor molds. **Fungal Genetics and Biology**, v. 39, p. 103-117, 2003.

OBIDI, O. F.; ABOABA, O. O.; MAKANJUOLA, M. S.; NWACHUKWU, S. C. U. Microbial evaluation and deterioration of paints and paint-products. **Journal of Environmental Biology**, v. 30, n. 5, 2009.

OBRITSCH, J. A.; R. Y. U, D.; LAMPILA, L. E.; BULLERMAN, L. B. Antibacterial effects of long-chain polyphosphates on selected spoilage and pathogenic bacteria. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 7, p. 1401-1405, 2008.

OGBULIE, J. N.; OBI AJURU, I. O. C. Microbial deterioration of surface paint coatings. *Global Journal of Pure and Applied Sciences*, v. .4 , n. 10, 485-490, 2004.

OZOADUCHE, C. L.; IDEMUDIA, I. B. Identification of fungi isolated from bathrooms in female student's hostel, university of Benin, Benin city. **African Journal of Health, Safety and Environment**, v. 25, p. 24-35, 2021.

ÖZGÜR, C.; ÇOLAK, F.; ŞAN, O. Preparation, characterization and antimicrobial property of micro-nano sized Na-borosilicate glass powder with spherical shape. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 357, n. 1, p. 116-120, 2011.

PARALKAR, V.; DAMLE R. Moisture buffering and mould growth characteristics of naturally ventilated lime plastered houses. **UCL Open Environment**, v. 6, 2024.

PERRINE-WALKER, F. Use of calcofluor white to detect β -glucan changes in *Phytophthora palmivora* oospores by fluorescence microscopy. **Indian Phytopathology**, v. 75. p. 869-874, 2022.

PIONTEK, M.; ŁUSZCZYŃSKA, K. Testing the Toxicity of *Stachybotrys chartarum* in Indoor Environments - A Case Study. **Energies**, n. 14, p. 1602, 2021.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. Fungi and Food spoilage. **New York, Springer**, p. 7-9, 2009.

PYARE, R. Leachability of zinc ions from ternary phosphate glasses. **Journal of Materials Science**, v. 38, n. 9, p. 2079-2086, 2003.

RAJA, F. N. S.; WORTHINGTON, T, DE SOUZA, L. P. L.; HANAEI, S. B.; MARTIN, R. A. Synergistic Antimicrobial Metal Oxide-Doped Phosphate Glasses; a Potential Strategy to Reduce Antimicrobial Resistance and Host Cell Toxicity. **ACS Biomaterials Science & Engineering Journal**, v. 8, n. 3, p. 1193-1199, 2022.

RASLI, N.; RAMLI, N.; ISMAIL, M. Indoor Biological Contaminants In The Built Environment. **Current World Environment**, v. 16, n. 1, p. 34-35, 2021.

RUSSELL, N.; GOULD, G. W. Food preservatives. **New York, USA: Kluwer Academic/Plenum Publishers**, p.74-75, 2003.

SCHOOFS, H.; SCHMIT, J.; RINK, L. Zinc Toxicity: Understanding the Limits. **Molecules**, v. 29, n. 13, 2024.

SHARMIN, N.. HASAN, M. S.. PARSONS, A. J.. FURNISS, D.. SCOTCHFORD, C. A.. AHMED, I.; RUDD, C. D. (2013). Effect of Boron Addition on the Thermal, Degradation, and Cytocompatibility Properties of Phosphate-Based Glasses. **BioMed Research International**, p. 1-12, 2013.

SHARMIN, N.; RUDD, C. D.; PARSONS, A. J.; AHMED, I. Structure, viscosity and fibre drawing properties of phosphate-based glasses: effect of boron and iron oxide addition. **Journal of Materials Science**, v. 51, n. 16, p. 7523-7535, 2016.

SHIRAKAWA, M. A.; BEECH, I. B.; TAPPER, R.; CINCOTTO, M. A.; GAMBALE, W. The development of a method to evaluate bioreceptivity of indoor mortar plastering to

fungal growth. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, p. 83-92, 2003.

SIMCHI, A.; TAMJID, E.; PISHBIN, F.; BOCCACCINI, A. R. Recent progress in inorganic and composite coatings with bactericidal capability for orthopaedic applications. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 7, n.1, p. 22-39, 2011.

SINGH, R. B.; DEVI, K. R. A comparative study on antifungal susceptibility of *Penicillium marneffeii* (*Talaromyces marneffeii*) and nonmarneffeii *Penicillium* species. **Journal of Medical Society**, v. 32, n. 1, p 22-26, 2018.

ŚLOSARCZYK, A.; KLAPISZEWSKA, I.; SKOWROŃSKA, D.; JANCZAREK, M.; JESIONOWSKI, T.; KLAPISZEWSKI, Ł. A comprehensive review of building materials modified with metal and metal oxide nanoparticles against microbial multiplication and growth. **Chemical Engineering Journal**, v. 466, 143276, 2023.

SMITH, S. A.; WANG, Y.; MORRISSEY, J. H. DNA ladders can be used to size polyphosphate resolved by polyacrylamide gel electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 39, n. 19, p. 2454-2459, 2018.

SOBRINHO, M. **Estudo da Ocorrência de fungos e da permeabilidade em revestimentos de argamassa em habitações de interesse social - estudo de caso na cidade de Pitangueiras/SP**. 91 f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Construção Civil, Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2008.

STROHL, W. A., ROUSE, H, FISHER, B. D. **Microbiologia Ilustrada**. Porto Alegre: Artmed, p. 531, 2004.

SUHR, K. I.; NIELSEN, P. V. Effect of weak acid preservatives on growth of bakery product spoilage fungi at different water activities and pH values. **International Journal of Food Microbiology**, v. 95, n. 1, p. 67-78, 2004.

TACKER, R. C.; RAKOVAN, J.; HARLOV, D.; HUGHES, J. M.; CICHY, S. B. The OH-stretching region in infrared spectra of the apatite OH-Cl binary system. **American Mineralogist**, v. 109, n. 12, p. 2086-2094, 2024.

TEMIZEL-SEKERYAN, S.; HICKS, A. L. Global environmental impacts of silver nanoparticle production methods supported by life cycle assessment. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 156, 2020.

TRIBELHORN, K.; TWARUŽEK, M.; KOSICKI, R.; STRAUBINGER, R. K.; EBEL, F.; ULRICH, S. A Chemically Defined Medium That Supports Mycotoxin Production by *Stachybotrys chartarum* Enabled Analysis of the Impact of Nitrogen and Carbon Sources on the Biosynthesis of Macrocyclic Trichothecenes and Stachybotrylactam. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 89, 2023.

UNGER, A.; SCHNIEWIND, A.; UNGER, W. Conservation of Wood Artifacts. Springer Science & Business Media, Eds. **Natural Science in Archaeology. A handbook**. Verlag Berlin Heidelberg New York, p. 1-578, 2001.

VARSHNEYA, A. K.; MAURO, J. C. **Fundamentals of Inorganic Glasses**. 3. ed. Elsevier, 2019. 229 p.

VERNÉ, E.; MIOLA, M.; VITALE-BROVARONE, C.; CANNAS, M.; GATTI, S.; FUCALE, G.; MAINA, G.; MASSÉ, A.; DI NUNZIO, S. Surface silver-doping of biocompatible glass to induce antibacterial properties. Part I: Massive glass. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 20, n. 3, p. 733-740, 2009.

VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J. C.; HONG, S.-B.; KLAASSEN, C. H. W.; PERRONE, G.; SEIFERT, K. A.; VARGA, J.; YAGUCHI, T.; SAMSON, R. A. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Studies in Mycology**, v. 78, p. 343–371, 2014.

VOICU, G.; BADANOIU, A. I.; STOLERIU, S. P.; NICOARA A-I.; HOLBAN A. M. Portland Cement Pastes and Mortars with Antibacterial Properties. **Journal of Composites Science**, v. 8, n. 11, p. 445, 2024.

WANG, J.; MA, W.; FANG, Y.; LIANG, H.; YANG, H.; WANG, Y.; DONG, X.; ZHAN, Y.; WANG, X. Core Oligosaccharide Portion of Lipopolysaccharide Plays Important Roles in Multiple Antibiotic Resistance in *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 65, n. 10, 2021.

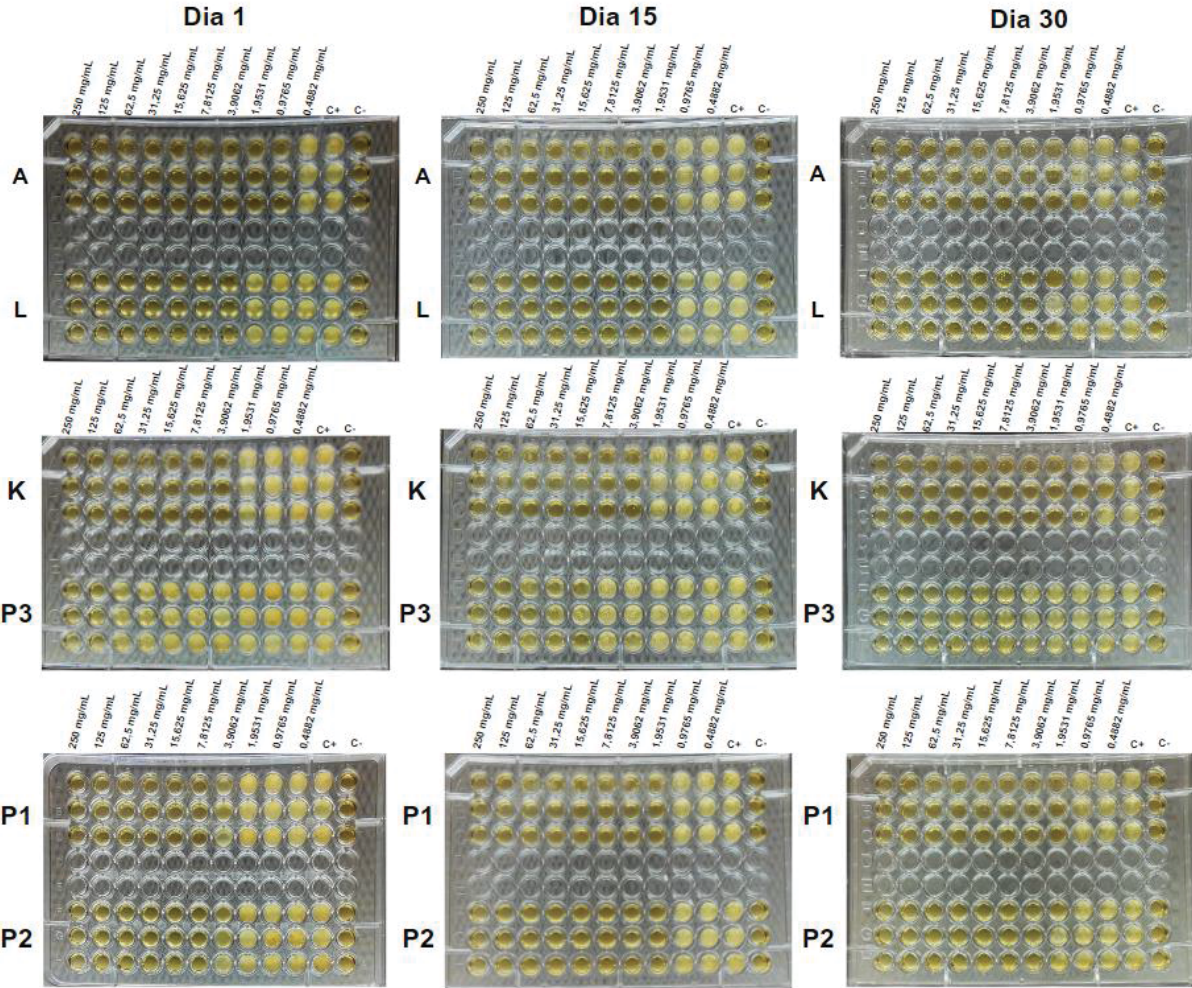
YADAV, M. R.; RAJA, B. J.; AVINASH, M.; KRISHNA, C. R.; RAVIKUMAR, R. V. S. S. N. Structural and optical properties of Cu (II) ions doped calcium borophosphate

(CaBP) nanophosphor by solid-state synthesis. **Journal of Materials Science: Materials in Electronics**, v. 27, n. 2, p. 1318-1327, 2016.

ZIA, S.; PENG, S.; BASHIR, A.; KAUSAR, T.; KHAN, S. R.; MUNEER, A.; NAWAZ, A.; ALNAJJAR, L. I.; SAEED, M.; ALSHAMMARI, N.; et al. Resistance Modulation of Individual and Polymicrobial Culture of *S. aureus* and *E. coli* through Nanoparticle-Coupled Antibiotics. **Biomedicines**, v. 11. n. 11, 2023.

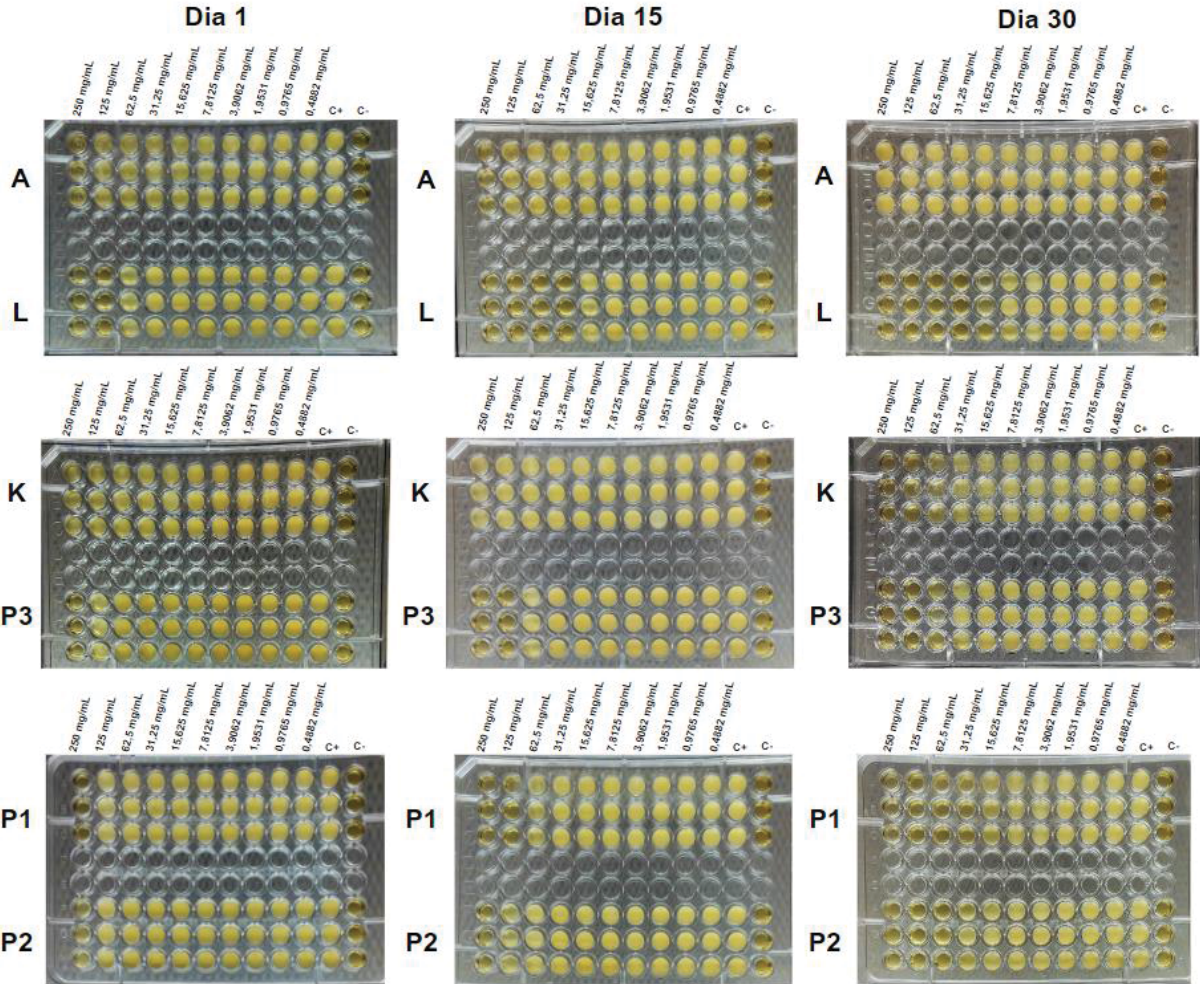
ZANOTTO, E. D., MAURO, J. C. The glassy state of matter: Its definition and ultimate fate. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 471, p. 490-495, 2017.

**APÊNDICE A - RESULTADOS DO TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE
ANTIMICROBIANA (CIM) DOS VIDROS E PADRÕES PARA *S. aureus* AO
LONGO DE 30 DIAS**



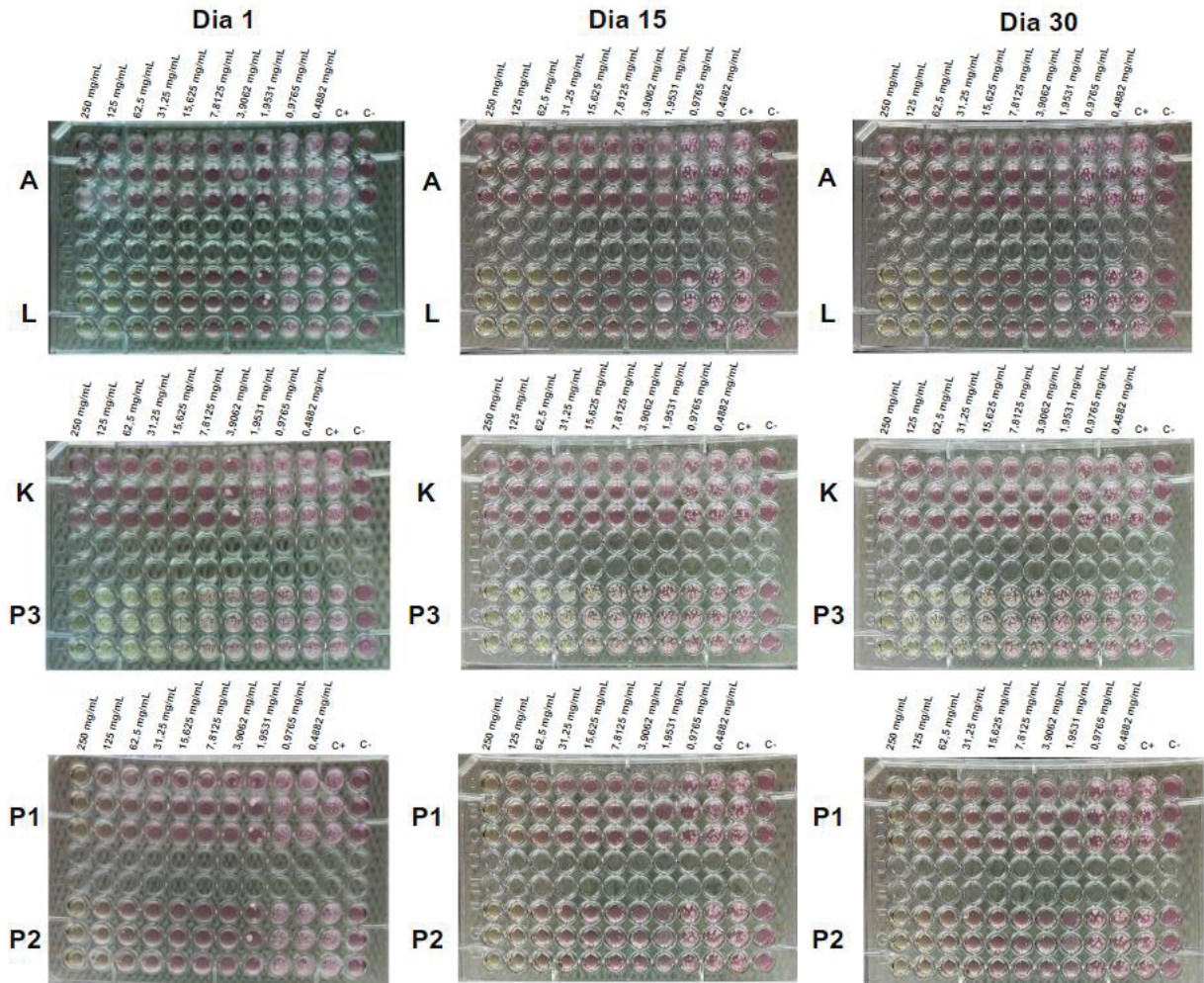
FONTE: A autora (2024).

**APÊNDICE B - RESULTADOS DO TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE
ANTIMICROBIANA (CIM) DOS VIDROS E PADRÕES PARA *E. coli* AO LONGO
DE 30 DIAS**



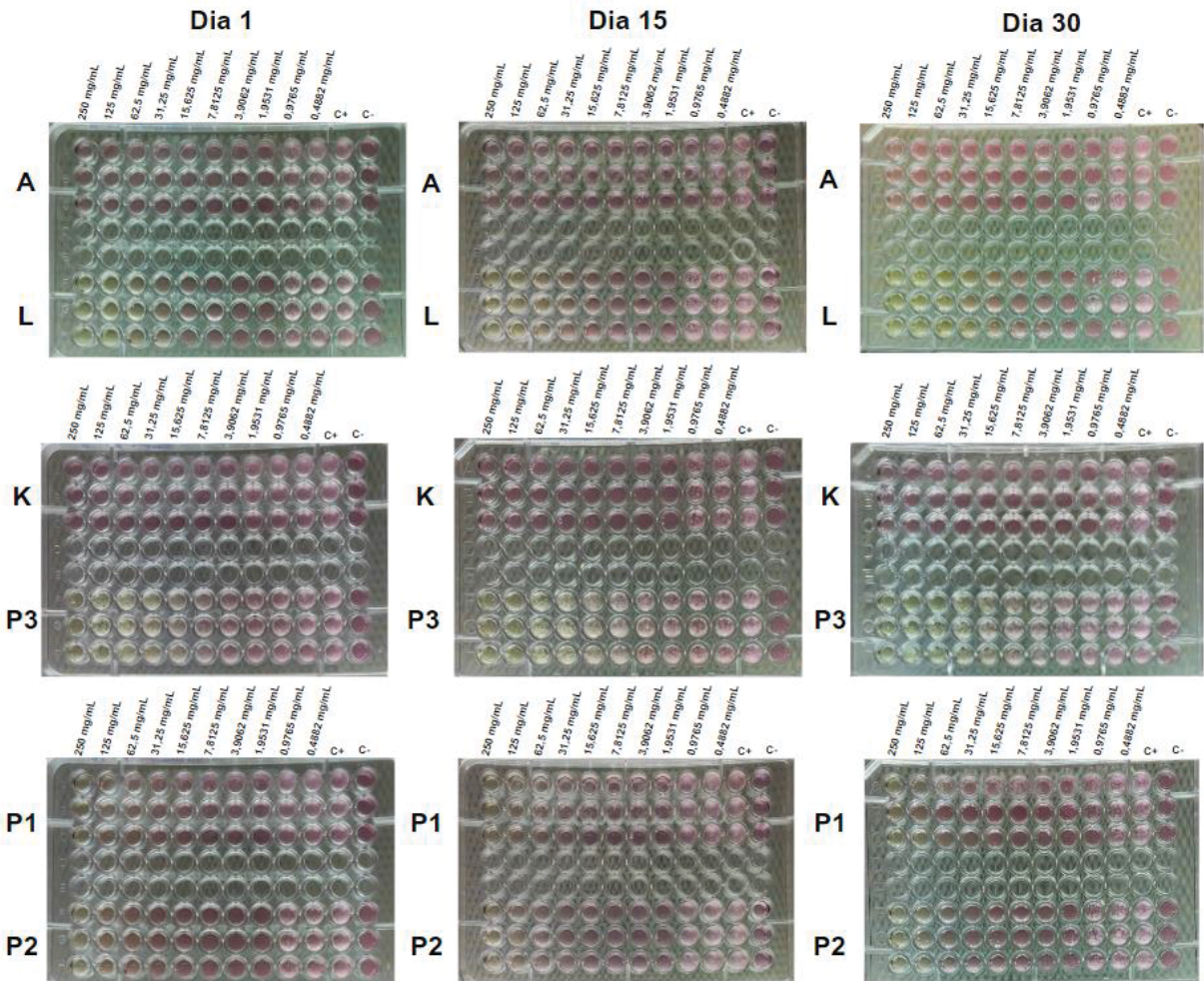
FONTE: A autora (2024).

APÊNDICE C - RESULTADOS DO TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA (CIM) DOS VIDROS E PADRÕES PARA *C. albicans* AO LONGO DE 30 DIAS



FONTE: A autora (2024).

**APÊNDICE D - RESULTADOS DO TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE
ANTIMICROBIANA (CIM) DOS VIDROS E PADRÕES PARA *S. chartarum* AO
LONGO DE 30 DIAS**



FONTE: A autora (2024).

