

PREVENÇÃO DE FUNGOS EM PAREDES E TETOS

ALEXANDRE J. A. JERÓNIMO^{1*}, JOSÉ B. AGUIAR¹, NELSON M. LIMA², RUTE M. EIRES¹

1: Universidade do Minho
Campus de Azurém, 4800-058 Guimarães
ajaj@sapo.pt, aguiar@civil.uminho.pt, rute@civil.uminho.pt
www.uminho.pt

2: Universidade do Minho
Campus de Gualtar, 4700-320 Braga
nelson@ie.uminho.pt
www.uminho.pt

Palavras-chave: Fungos, Paredes, Tetos, Nanomateriais

Resumo *A investigação consistiu na identificação dos tipos de fungos existentes em diversos edifícios de habitação da zona norte de Portugal. Foram selecionados quatro edifícios de habitação e recolhidas três amostras de fungos existentes em paredes e tetos. Esta recolha serviu como base para o estudo do tipo de fungos existentes nos edifícios. Houve especial atenção em variar o local, tipo de construção, idade, tipo de revestimentos, tipo de pinturas, exposição solar, entre outros fatores. Esta identificação foi ponto de partida para a caracterização morfológica dos fungos. Através do método fenotípico, foram isolados fungos do género aspergillus, penicillun, cladosporium e alternaria. A caracterização morfológica e molecular dos fungos isolados foi efetuada através de métodos genotípicos. Após a identificação e caracterização dos fungos existentes serão executados ensaios de crescimento acelerado de fungos em materiais correntes (argamassas de cal, gesso ou cimento, em suportes de betão ou tijolo) e materiais com incorporação de nanoaditivos: dióxido de titânio (TiO₂), cobre (Cu) assim como nanopartículas de cortiça). Os resultados destes ensaios permitirão desenvolver materiais inovadores para a prevenção de fungos em paredes e tetos.*

1. INTRODUÇÃO

A existência de microrganismos nos edifícios causa inúmeros problemas, quer para os utilizadores quer para a durabilidade dos edifícios. No caso dos utilizadores as alergias e problemas respiratórios são os mais correntes. As manifestações alérgicas são extremamente frequentes na população em geral, não sendo restritas do ambiente interior dos edifícios. Mas é indiscutível que a presença de grande número de fungos (entre os quais *Aspergillus*, *Candida* e *Alternaria*), constitui uma das grandes causas das manifestações alérgicas [1].

Para além dos problemas de saúde, os fungos visualmente são muito desagradáveis, pois a sua proliferação manifesta-se através de manchas escuras que acompanham a degradação dos rebocos e pinturas obrigando inúmeras vezes à reparação e pintura desses locais. O odor que libertam, associado à humidade, tornam os locais com deficientes condições de habitabilidade. Atualmente em Portugal existe grande dificuldade em prevenir o aparecimento de fungos nos edifícios. Os erros de conceção e construção associados a uma baixa ventilação dos edifícios estão entre as principais causas. Na reabilitação de paredes e tetos verifica-se pouca eficácia dos produtos antifúngicos existentes, ou uma eficácia com durabilidade reduzida.

Cerca de 80% das patologias dos edifícios estão associadas a fissuras e humidade [2]. O excesso de humidade torna o meio propício para o desenvolvimento de microrganismos. Nos países mais desenvolvidos, o futuro da construção passa em grande parte pela reabilitação das construções existentes. Uma das áreas também com grande peso será a manutenção de edifícios. O custo da correção de patologias é elevado, comparado com a adoção de medidas preventivas em fases anteriores do processo construtivo.

A melhoria da qualidade do ar interior das edificações poderá ter um grande avanço com o melhor conhecimento dos microrganismos. Os recentes desenvolvimentos em nanotecnologia vieram contribuir para o desenvolvimento de soluções eco-eficientes para a construção ou reabilitação de edifícios. Assim as limitações existentes nos materiais de construção são quebradas com a introdução da nanotecnologia como potenciadora de novos produtos com novas funcionalidades.

2. PATOLOGIAS EM EDIFÍCIOS

Atualmente os edifícios começam a ser analisados como um todo. Os problemas de mau desempenho começam a ser entendidos dentro de um contexto global e não de forma independente, como anteriormente [3] [4].

Devido à necessidade de consolidar, organizar e ampliar os conhecimentos nesta área, vários organismos nacionais e internacionais têm desenvolvido estudos sobre esta questão. Primeiro fizeram-se e continuam-se a fazer levantamentos da situação dos edifícios em utilização, com o objetivo de catalogar as falhas. Os resultados mostram um grande número de edifícios com falhas, mesmo em países com tradição de bem construir.

O Centre Scientifique et Technique de la Construction (CSTC) na Bélgica, o Building Research Establishment (BRE) na Inglaterra e a Agence Qualité Construction (AQC) em França, têm atuado na área da patologia das construções, tanto no levantamento e análise dos problemas mais frequentes, assim como nas soluções para os evitar e reparar.

Existe uma preocupação crescente com a qualidade da construção, mas muitos dos edifícios construídos nos últimos anos não apresentam o desempenho e a durabilidade esperados. A falta de sistematização da informação origina erros e patologias repetidos muitas vezes [4].

A AQC em França, criou um mecanismo de recolha e análise dos sinistros declarados às companhias seguradoras – sistema SYCODÉS. Analisou, entre 1995 e 2015, 440.000 casos de sinistros declarados às companhias seguradoras [2].

Estes dados, bastante recentes, vão de encontro a diversos estudos, onde a patologia relacionada com a humidade e fissuração representa cerca de 80% dos casos. Assim como as principais causas

que estiveram na origem das manifestações observadas onde se salienta a existência de erros de processo (projeto e construção), como a causa mais frequente [5].

Verifica-se que apesar de existirem diversos estudos em anos diferentes, no que se refere à natureza das anomalias observadas, a partir das quais foi possível diagnosticar as respetivas patologias, os dados recolhidos são bastante próximos. Ou seja, as humidades e fissuração representam mais de 80% das situações estudadas cujas causas em cerca de 80% das situações são atribuídas à fase de projeto ou de construção [5].

Os problemas patológicos só se manifestam após o início da execução propriamente dita, a última etapa da fase de produção. Em relação à recuperação dos problemas patológicos, podemos afirmar que "as correções serão mais duráveis, mais efetivas, mais fáceis de executar e muito mais baratas quanto mais cedo forem executadas" [6].

Quando se trata de patologias estruturais, que põem em risco os utilizadores dos edifícios, devem ser corrigidas de imediato ou o edifício é interditado ao uso. Outros tipos de patologias, como humidades, fissuras, condensações, como não têm riscos imediatos, muitas das vezes as suas correções vão-se arrastando no tempo, mas normalmente contribuem para uma degradação da qualidade do edifício e podem causar graves problemas aos utilizadores.

3. DESENVOLVIMENTO DE MICROORGANISMOS

Os fungos estão entre os poluentes do ar interior mais importantes e menos compreendidos, sendo a sua presença frequente e ubíqua nos ambientes urbanos. São organismos heterotróficos com um diâmetro aerodinâmico compreendido entre 1 a 30 μm . Existem dois tipos morfológicos de fungos: fungos filamentosos e fungos leveduriformes (leveduras) [7]. Alguns destes fungos produzem metabolitos, tais como micotoxinas, que podem provocar reações alérgicas no hospedeiro [8].

Num edifício são vários os fatores que potenciam o crescimento da população microbiana, tais como elevados níveis de humidade, ventilação reduzida, disponibilidade de nutrientes, temperatura adequada ao seu desenvolvimento, a existência de fontes de contaminação interiores (sistemas AVAC, materiais de construção e decoração, infiltrações de água, ocupantes), bem como as entradas de ar [8].

Atualmente exige-se cada vez mais conforto térmico no interior dos edifícios. O conforto térmico é um conceito muito subjetivo que não implica uma temperatura exata. Trata-se de um estado de espírito no qual a pessoa sente satisfação com o ambiente térmico. Os seres humanos sentem conforto numa gama de temperaturas entre 20 e 26° C e com uma humidade relativa entre 30 e 85%. Com a humidade relativa inferior a 50% podem sentir conforto até temperaturas de 28° C. Uma forma de solucionar o problema pode ser a arquitetura bioclimática, que permite manter os edifícios em zonas de conforto através de ventilação natural, sem ar condicionado nem aquecimento, evitando vírus, bactérias, pólen e fungos como a legionela [9] [10]. Esta ventilação natural permite sentir as variações sazonais, resultando uma melhor qualidade do ar e do bem-estar psicológico dos utilizadores (Fuente, 2013).

O emprego de materiais saudáveis, biocompatíveis e higroscópicos, facilita a troca de humidade entre a atmosfera e o edifício. O edifício deve respirar. Estes materiais evitam a condensação e tornam um clima interior mais saudável. Materiais como a madeira, cortiça, argila, gesso ou argamassas à base de cal, dão os melhores resultados [11]. O excesso de humidade permite o aparecimento de organismos prejudiciais à saúde, especialmente em caves ou em edifícios que sofrem inundações, assim como em zonas habitáveis onde ocorrem condensação ou entrada de água [9].

A remediação de locais onde surge mofo e a prevenção da sua ocorrência são problemas presentes devido ao esforço de melhorar o ambiente interno dos edifícios. Os fungos são organismos eucarióticos cujos núcleos são dispersos em micélios (conjunto de hifas) contínuos ou septados. Para se desenvolverem precisam de substâncias orgânicas de carbono. As fontes da sua energia são substâncias simples que são produzidas por divisão enzimática de materiais, como alimentos, couro,

papel, plástico, pedras decorativas, betão e argamassas. Produzem substâncias voláteis e micotoxinas além de substâncias simples que prejudicam a saúde humana, causando asma, problemas de pele, etc. [12].

O oxigénio é outra das condições essenciais para a sua vida, assim como a humidade relativa até 80%, mas, para certos tipos, é suficiente humidade relativa em volta de 65%, a temperatura ideal é de 18 a 28 ° C, e o pH entre 5 a 7.

No essencial é necessário evitar a humidade na construção. Adicionalmente temos a desinfeção e aplicação de biocidas nas superfícies afetadas. As condições internas dependem sempre dos utilizadores e dos seus comportamentos. É sempre bom ventilar os edifícios, reduzir os fatores que promovem condensações, reduzir a carga biológica, entre outros. Poderíamos reduzir a humidade de maneira a atingir um mínimo onde os parâmetros do ar interior fossem inadequados ao desenvolvimento de fungos (humidade relativa cerca de 50%), mas constituiria outros riscos para a saúde, como a sequidão das mucosas [13]

O meio ambiente interno dos “edifícios doentes” (especialmente destinados a comércio e serviços), constitui um nicho ecológico com o seu próprio meio bioquímico, fauna e flora. Estes edifícios por serem hermeticamente fechados, apresentam um dilema quanto à regulação da humidade e da temperatura do ar que circula pelos ductos e pelo próprio edifício, pois as diferentes espécies de microrganismos têm diferentes combinações de humidade e temperatura para se desenvolverem [14].

4. REABILITAÇÃO DE EDIFÍCIOS

Nos países mais desenvolvidos o futuro da construção passa em grande parte pela reabilitação das construções existentes. Uma das áreas também com grande peso será a manutenção de edifícios ou outro tipo de construções. Nestas fases o custo da correção de patologias é elevado, comparado com a adoção de medidas preventivas em fases anteriores do processo construtivo.

O uso de produtos antifúngicos na construção é amplamente publicitado por empresas que comercializam materiais de construção ou de limpeza. Quase todas as marcas de tintas possuem nos seus catálogos tintas ou aditivos antifúngicos. Para a sua limpeza o produto mais recomendado é uma solução a 5% de hipoclorito de sódio (lixívia) em água.

Os fungos são os agentes mais agressivos na deterioração da pintura. Os fungicidas mais comuns para esta finalidade são: iodo propinil butil carbamato, carbendazim, octilisotiazolinona, dicloro isotiazolinona e piritionato de zinco [15].

Os produtos designados por biocidas compreendem uma vasta gama de substâncias ativas e preparações que as contêm, de características muito diversas e cobrindo um amplo leque de utilizações. Tratam-se de produtos com benefícios para a proteção da saúde (humana e animal) e para o ambiente, mas alguns deles comportam um risco potencial, pelo que a respetiva colocação no mercado pode requerer um processo de registo ou de autorização. Para as tintas com ação fungicida/algicida, aditivo concentrado de fungicida para adicionar às tintas para uso no interior, aditivo concentrado de fungicida/algicida para adicionar às tintas para uso no exterior e tintas com ação inseticida ou repelente de insetos esse processo de registo ou autorização é da responsabilidade da Direção Geral de Saúde (DGS) [16].

Nas pinturas o crescimento dos fungos funciona como um bioindicador da eficiência dos biocidas antifúngicos usados. O uso de biocidas em tintas ou produtos de limpeza contribui em grande escala para a contaminação de águas superficiais e profundas [17]. O carbendazim é tóxico para os seres humanos, animais e plantas. A toxicidade em mamíferos conduz a anomalias e falhas na espermatogénese [18]. Este composto surge nas águas, solo e alimentos [19].

A resistência dos microrganismos aos biocidas também pode ser devido à biodiversidade existente no local [20].

Sabe-se que os produtos com características antifúngicas são prejudiciais para o ambiente e saúde

de pessoas e animais. Por este motivo, a indústria das tintas investiga melhores tintas com biocidas degradáveis, assim como consideram a inclusão de nanopartículas de prata, cobre, óxido de zinco e dióxido de titânio como aditivos para a protecção das tintas contra a degradação microbiana, física e química. No futuro, os biocidas degradáveis serão substituídos por nanomateriais. Resultados iniciais indicam que o uso de nanomateriais em tintas não resultará num maior nível de exposição e que não haverá um maior risco para a saúde comparativamente aos produtos convencionais [21].

5. APLICAÇÃO DE NANOTECNOLOGIA

Na construção civil, os nanomateriais vão ter um papel importante no futuro (aplicações estruturais em cerâmicos, revestimentos, metais, compósitos), assim como em muitas áreas diversas: cosmética, tecnologias de informação, biotecnologia, medicina, aplicação de sensores, aplicações ambientais, entre muitas outras [22]. Os recentes desenvolvimentos da nanotecnologia vieram contribuir para o envolvimento da construção de edifícios nas questões ambientais, de sustentabilidade/reabilitação. Assim as limitações existentes nos materiais de construção são quebradas com a introdução da nanotecnologia como potenciadora de novos produtos com novas funcionalidades [23].

A nanotecnologia é considerada como uma das principais tecnologias do futuro. O termo “nanotecnologia” é usado para produção, análise ou utilização de produtos com menos de 100 nanómetros (nm) como por exemplo partículas, películas ou tubos em pelo menos uma dimensão. Em nanoescala os materiais têm novas propriedades muito importantes para o desenvolvimento de novos produtos e aplicações. Nos últimos anos, o uso de dióxido de titânio (TiO_2) tem atraído consideravelmente a atenção da comunidade científica e do setor industrial devido às suas características de autolimpeza das superfícies e de purificação de alguns poluentes atmosféricos [24].

Diversos estudos sobre a propriedade purificadora das tintas e outros materiais, devido à adição de dióxido de titânio à escala nanométrica na presença de luz ultravioleta mostraram um forte poder de remoção de gases como o óxido nítrico, óxido de azoto e dióxido de azoto devido às suas propriedades fotocatalíticas [25].

A prevenção da ocorrência de fungos em edifícios, pode ser realizada usando métodos clássicos (pulverização, pintura, etc.) ou novos métodos - que incluem o uso de nanotecnologia. As nanofibras têm características funcionais específicas (por exemplo, grande área de superfície) de acordo com a sua produção e podem ser utilizadas para prevenção contra fungos filamentosos. O efeito das nanofibras pode ser aumentado pela adição de nanopartículas ou outra substância antimicrobiana [26].

As nanofibras como proteção antimicrobiana são muito usadas em várias áreas, como na medicina para pensos respiráveis usados nas cirurgias, na reconstrução da pele e dos ossos [27], vasos sanguíneos, músculos e tecido nervoso, e também, transporte e administração controlada de drogas ou células. Nos têxteis, componentes eletrónicos, tratamento de água, etc. [28]. Nestes casos, o efeito antimicrobiano é obtido com a adição de nanopartículas de prata em solução básica de polímeros para nanofibras mas com este tipo de utilização libertam-se nanopartículas de polímero e diminui a atividade antimicrobiana [29]. A Nanospider™ tem uma tecnologia, que permite a produção de nanofibras a partir de solventes de polímeros em água, em ácidos e assim por diante. Os tecidos de nanofibra são produzidos sob a forma de têxteis não tecidos. O tecido de nanofibra é fino, enquanto os tecidos fortes são porosos, os buracos formam a estratificação de fibras com orientação diferente [30]. O polímero sozinho é usado como um apoio para agente de nanopartículas com efeito antimicrobiano. São usados nanodiamante, cobre, titânio, zinco e, na maioria das vezes, prata e cobre [31]. Os seus benefícios são: baixo custo, fácil aplicação e pode ser aplicado de várias formas.

Um estudo realizado na República Checa com recolha de fungos na cidade de Litvinov confirmou a existência de fungos do género *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Culvularia*, *Epicoccum*, *Penicillium* e *Pithomyces*. Com a identificação dos fungos selecionaram os mais frequentes *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata* e em placas petri compararam o efeito de nanofibras de poli (álcool vinílico) (PVA) com adição de iões de prata e cobre, verificando

assim as propriedades antifúngicas destes materiais [26].

A nanotecnologia é útil para a proteção contra os fungos existentes em edifícios. As maiores vantagens são seu baixo custo e a sua fácil aplicação na superfície. Através de resultados experimentais com as nanofibras, que podem ser aplicadas no local onde aparecem os fungos, ou nos locais onde é previsível o aparecimento, verifica-se que com a adição de prata e cobre conseguem-se bons resultados para a proteção antifúngica, sendo um método útil de proteção dos edifícios contra a deterioração biológica em alternativa aos métodos clássicos (pulverização de biocidas e tintas) [26].

Os materiais antimicrobianos inorgânicos são geralmente constituídos por iões metálicos com ação biocida e um substrato. O cobre e a prata são conhecidos como uma das nanopartículas inorgânicas multifuncionais com atividade antibacteriana [32]. Entre os substratos, um dos fosfatos de cálcio, hidroxiapatita sintética (HAP, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) é o mais promissor, principalmente devido à sua alta afinidade pelos microrganismos patogénicos. Estes materiais podem ser viáveis para múltiplas aplicações (em novos edifícios, hospitais e na reabilitação de construções de património cultural). Também para a proteção de artefactos de pedra contra fatores ambientais (chuva ácida) e biodeterioração, são uma opção para diminuir o uso substâncias tóxicas [33].

Na área da medicina e farmácia existem estudos de desenvolvimento de formas farmacêuticas de ação tópica com potencial antifúngico de derivados da cortiça. Em particular, sobre um subproduto da indústria corticeira, granulado de cortiça. Considerando a ação terapêutica já comprovada deste antifúngico, os alvos da formulação são a pele e unhas. Atualmente a capacidade antioxidante apresentada por alguns compostos existentes na cortiça tem atraído a indústria farmacêutica. Para além disso, os compostos antioxidantes de origem natural podem tornar-se menos onerosos e/ou menos tóxicos do que os compostos sintéticos o que é promissor no desenvolvimento de novas terapias [34]. Será um material que poderá ter interesse na área da construção.

Algumas propostas referem-se a revestimentos fotocatalíticos, nanopartículas de prata e de sílica entre outras para uma redução dos microrganismos nos edifícios [35].

Com a conexão entre a biotecnologia, a engenharia civil e a nanotecnologia será possível desenvolver soluções que permitam a prevenção de fungos em paredes e tetos.

6. IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS

6.1 Introdução

A identificação das espécies fúngicas existentes em edifícios de habitação na zona norte de Portugal. Servirá para criar uma solução com os fungos mais representativos que serão pulverizados em suportes que pretendem simular os materiais característicos de paredes e tetos que estarão colocados em estufas com condições ideais para acelerar o seu crescimento.

Em todas as regiões do mundo existem fungos no interior dos edifícios. Em climas moderados a húmidos as comunidades fúngicas são dominadas pelos géneros *Alternária*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, entre outra [36]. Os fungos desenvolvem-se à superfície, no interior de poros e fissuras das paredes e tetos e têm um papel muito importante na degradação da qualidade dos edifícios e do seu ambiente interior.

A composição das comunidades fúngicas tem sido caracterizada de forma muito simplificada e na sua maioria as análises referem-se a monumentos e edifícios antigos [37].

No interior dos edifícios o crescimento de fungos em áreas húmidas, além dos problemas de higiene e estéticos pode causar também problemas de alergia respiratória. Os sintomas mais comuns são dores de garganta, rinite, tosse entre outros. No País de Gales verificou-se que 30 a 40% de ocupantes de habitações “contaminadas” com fungos sofrem de asma. *Penicilium* e *Cladosporium* são os fungos predominantes no interior das habitações [38]. Num estudo realizado nas cidades de São Paulo e São Bernardo do Campo no Brasil verificou-se que *Cladosporium* foi o género mais

frequente, seguido pelos *Penicillium* e *Aspergillus* [39].

Em Portugal não existem dados na literatura sobre os fungos mais frequentes nos edifícios. Encontram-se alguns estudos de identificação de espécies fúngicas em monumentos, mas no exterior do edifício, por exemplo na Sé de Lamego [40]. Para identificar e discriminar microrganismos (géneros, espécies e estirpes) existem métodos fenotípicos, que consideram as características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas e métodos genotípicos que utilizam ferramentas moleculares baseadas na análise total, ou de segmentos do genoma. Os métodos fenotípicos baseiam-se em fenómenos bioquímicos, fisiológicos e biológicos, enquanto os métodos genotípicos detetam polimorfismos ao nível dos ácidos nucleicos, ou variação alélica ao nível de enzimas [41].

Na Figura 1 encontra-se o fluxograma do procedimento usado para a caracterização morfológica e molecular de fungos.

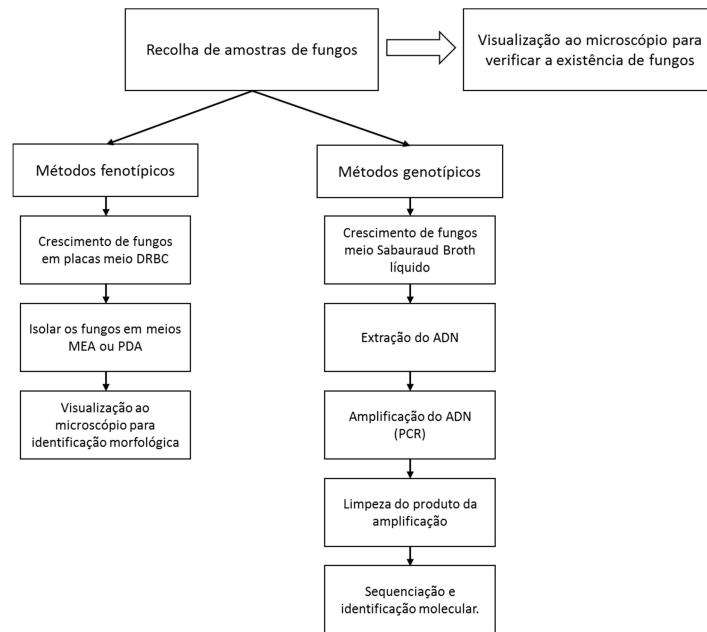


Figura 1 - Fluxograma usado na identificação dos fungos

6.2 Recolha das amostras

As amostras para a visualização e isolamento de fungos foram recolhidas em vários dias, por raspagem direta e pontual, utilizando-se lâminas esterilizadas. O material amostrado foi colocado em folhas de alumínio, que foram imediatamente isoladas. No total foram recolhidas 12 amostras.

Selecionaram-se vários locais na zona norte para recolha de amostras de fungos existentes em paredes e tetos de diversas construções Figura 2.



Figura 2 - Locais de recolha de amostras de fungos

Na Tabela 1 encontra-se um resumo das características dos locais onde foi feita a recolha dos fungos e a data de recolha das amostras.

Tabela 1 - Locais de recolha dos fungos.

Nº AMOSTRA	LOCAL	RECOLHA	CARACTERÍSTICAS	AMBIENTE
1	SENDIM	10.03.2017	Construção com mais de 35 anos. Casa não habitada desde 2005, rebocada, areada e pintada com tinta de água.	Teto da cozinha
2				Parede da cozinha
3				Parede do quarto
4	VILA REAL	11.03.2017	Construção com cerca de 20 anos. Apartamento último piso, paredes e tetos em gesso projetado e pintada com tinta acrílica.	Teto do quarto
5				Teto do quarto (armário)
6				Teto sótão
7	PORTO	11.03.2017	Construção de 2006. Habitação unifamiliar tetos em gesso cartonado e pintura acrílica com protecção anti-insectos.	Teto WC
8				Teto do corredor
9				Teto quarto
10	VILA REAL	11.03.2017	Construção com cerca de 25 anos. Teto em reboco estanhado, local já foi pintado várias vezes com pintura anti fungos.	Teto WC
11				
12				

6.3 Visualização ao microscópio eletrónico

Com recurso ao microscópio eletrónico de varrimento (MEV) existente no Laboratório de Serviços de Caracterização de Materiais (SEMAT) da Universidade do Minho foram visualizadas as amostras recolhidas. Com essa visualização verificamos a existência de fungos.

6.4 Caracterização morfológica de fungos

Após amostragem, procedeu-se ao isolamento das espécies fúngicas no Laboratório de Micologia da Micoteca da Universidade do Minho. Para poder determinar o género do fungo e efetuar a sua caracterização morfológica, foi feita numa primeira fase a inoculação em meio de cultura DRBC (Agar Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol Base).

Sempre que necessário, devido ao aparecimento de contaminações, as amostras foram repicadas para novo meio de cultura. A obtenção dos isolamentos demorou em média 3 a 5 dias em estufa a 25°C e no escuro. Após a obtenção das culturas puras os isolamentos foram mantidos em meio PDA (Potato Dextrose Agar).

Na Figura 3, apresenta-se um esquema do processo de inoculação das placas em meio de cultura. Parte do material obtido da coleta será colocado a crescer em 4 placas com meio DRBC, a 25°C no escuro, durante 3 a 5 dias. O restante material será guardado para ser utilizado posteriormente na meta genómica. Foram preparadas 12 amostras x 4 placas= 48 placas + 2 para controlo.

Posteriormente isolaram-se os fungos crescidos para placas de 45 mm num meio de cultura diferente: MEA; PDA.

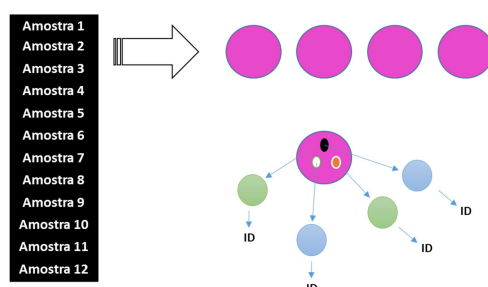


Figura 3 – Esquema da inoculação de placas em meio de cultura

O exame direto dos fungos isolados permite a determinação da cor da colónia e outras características, como a quantidade de esporos, a presença ou ausência de esclerócios e o tipo de estruturas reprodutivas. Para determinar o género a que pertence o fungo isolado, é necessário observar microscopicamente.

Através do método fenotípico, foram isolados fungos do género *aspergillus*, *penicillun*, *cladosporium* e *alternaria*. Houve fungos que foram isolados e não foi possível identificação através deste método.

Assim, podemos afirmar que fungos do género *aspergillus*, *penicillun*, *cladosporium* e *alternaria*, existem em paredes e tetos contaminados em habitações da zona norte de Portugal. As amostras foram recolhidas em habitações com idades entre 10 e 35 anos localizadas em Sendim, Vila Real e Porto, cujos materiais usados nos rebocos foram o gesso, gesso cartonado, reboco e reboco estanhado.

6.5 Caracterização morfológica e molecular de fungos

Para a extração de ácido desoxirribonucleico (ADN) das espécies fúngicas foi usado o homogeneizador FastPrep-24 Classic Instrument (Figura 5) que oferece a máxima velocidade e desempenho para a lise de amostras biológicas. O homogeneizador inclui kit Fast DNA, que rápida e eficazmente isola o genoma do ADN de várias fontes.

Com a execução das etapas descritas na Figura 6 foi possível obter a identificação molecular dos fungos isolados. Na Figura 7 podemos ver uma imagem da reação em cadeia da polimerase (PCR) que é uma técnica rotineira de laboratório usada para fazer múltiplas cópias (milhões ou bilhões) de uma região específica do ADN.

Posteriormente a PCR é enviada para um laboratório externo, onde é efetuada a sequenciação molecular. Com essa sequenciação e através do site: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, mais conhecido por BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), introduzimos a sequenciação e é possível identificar o tipo de fungo (Figura 8).



Figura 5 - Homogeneizador FastPrep-24™ Classic Instrument

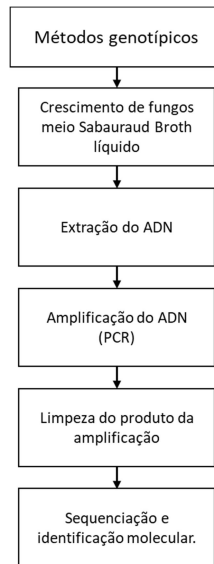


Figura 6 – Etapas usadas para identificação molecular dos fungos isolados

Com a identificação dos fungos existentes nos edifícios objeto de estudo com a sua caracterização morfológica e molecular, vamos criar uma mistura com os fungos mais representativos das amostras recolhidas, para podermos efetuar ensaios de crescimento acelerado em laboratório, em diferentes suportes.

Investigadores efetuaram a comparação de diversos métodos para avaliar a variação temporal do crescimento de fungos em materiais de construção, tendo obtido variação de resultados entre eles. Deve ser encorajado o uso de vários métodos para obter informações sobre o número de células vivas, bem como a biomassa fúngica total em superfícies de materiais de construção [42].

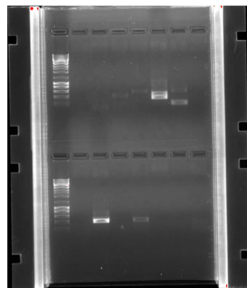


Figura 7 – Imagem da PCR

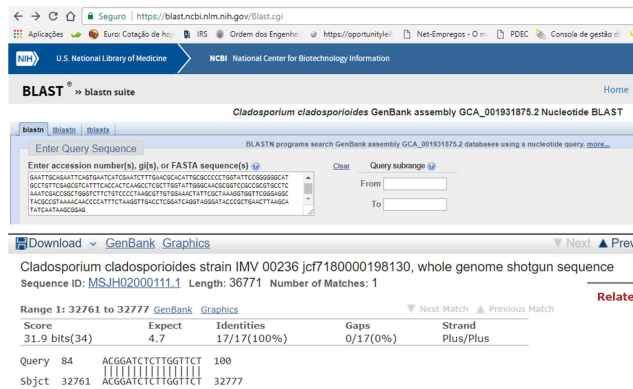


Figura 8 - Identificação molecular do fungo através no site BLAST

7. CONCLUSÕES

Podemos afirmar que fungos do género *aspergillus*, *penicillium*, *cladosporium* e *alternaria*, existem em paredes e tetos contaminados em habitações da zona norte de Portugal. As amostras foram recolhidas em habitações com idades entre 10 e 35 anos localizadas em Sendim, Vila Real e Porto, cujos materiais usados nos rebocos foram o gesso, gesso cartonado, reboco e reboco estanhado.

Sabe-se que os produtos com características antifúngicas correntes são prejudiciais para o ambiente e saúde das pessoas e animais. As características antifúngicas destes produtos vão diminuindo com o tempo.

Esperamos comprovar as propriedades antifúngicas das argamassas nanoaditivadas (TiO_2 , Cu e nanopartículas de cortiça). Os resultados obtidos poderão ser um ponto de partida para uma transição das proteções antifúngicas correntes para novas proteções antifúngicas recorrendo a nanoaditivos.

Essa transição de proteções antifúngicas vai permitir uma melhoria da qualidade das construções, a saúde dos utilizadores assim como a qualidade ambiental.

REFERÊNCIAS

- [1] Filipe C. K. Os edifícios e a saúde humana: breves notas sobre alguns problemas de saúde relacionados com edifícios, Revista Portuguesa de Saúde Pública, Vol. 19 nº1, 2001.
- [2] Observatoire de la Qualité de la Construction Sycodés 2016, Agence Qualité Construction, Paris, 2016.
- [3] Lichtenstein N. B. Patologia das Construções, São Paulo, EPUSP, 1986.
- [4] Freitas, Vasco Peixoto, Alves, Sandro M. e Sousa, Marília. Um contributo para a sistematização do conhecimento da patologia da construção em Portugal, 4º Congresso Português de Argamassas e ETICS, 2º Congresso Nacional de Argamassas de Construção - Sob a Égide da Reabilitação, Lisboa, 2007.
- [5] Rodrigues, Rui Calejo e Flora, Silva Análise estatística da patologia em edifícios recentes, Coimbra, 2007.
- [6] Sitter, W.R. Costs for Service Life Optimization, the Law of Five, Technical Bulletin nº 152, International Workshop on Durability of Concrete, CEB Comitê Euro-international du Beton, Paris, 1984, p.131-134.
- [7] Quadros, Mariana Eller; Lisboa, Henrique de Melo; Oliveira, Vetúria Lopes de e Schirmer, Waldir Nagel, Qualidade do ar em ambientes internos hospitalares: estudo de caso e análise

- crítica dos padrões atuais, *Eng Sanit Ambient.*, Vol. v.14 n.3, 2009, p. 431-438.
- [8] Bergman, A.; Lignell, A. and Melhus, A. The first documented case of *Aspergillus* cardiac surgical site infection in Sweden: an epidemiology study using arbitrarily primed PCR., *APMIS*, 2009 - p. 568-74.
- [9] Garrido, Luis de. *Arquitectura para la felicidad*, Monsa, Barcelona, Espanha, 2013.
- [10] Fuente Javier António de la. *O edifício doente: relação entre construção, saúde e bem-estar*, Dissertação de Mestrado, Universidade do Minho, Guimarães, 2013.
- [11] Lledó, Camilo Rodriguez, *Guía de Bioconstrucción, sobre materiales y tecnicas constructivas saludables y de bajo impacto ambiental*, Mandala Ediciones, 1999, 1ª edição.
- [12] Shoemaker, Ritchie C. , Rash, Judith M. and Simon, Elliott W. Sick building syndrome in water damaged buildings: generalization of the chronic biotoxin - Associated illness paradigm to indoor toxigenic fungi, *Health Effects II – Toxicology and Neurological Effects*, National Center for Biotechnology Information, 2006, p.52-63.
- [13] Deng, Qinqin; Yang, Xudong and Zhang, Jianshun Jensen Key factor analysis of VOC
- [14] Sterling, Theodor D.; Collett, Chris and Rumel, Davi A epidemiologia dos "edifícios doentes", *Revista Saúde Pública*, São Paulo Brasil, 1991, p. 56-63. sorption and its impact on indoor concentrations: The role of ventilation, *Building and Environment* 47(1), January 2012, p. 182–187.
- [15] Paulus, W. *Directory of microbicides for the protection of materials - A handbook*, Springer, Vol. 1, 2005, p. 347-375.
- [16] Associação Portuguesa de Tintas (APT) <http://www.aptintas.pt/biocidas.aspx>. consultado em 29 de 06 de 2017
- [17] Kupper, T.; Burkhardt, M.; Rossi, L.; Chèvre, L.F.N. Biocidal products in urban water systems – occurrence, fate and impacts. Literature review and proposal for further studies carried out within the project Urbic, <http://www.sea.eawag.ch> consultado em 29 de Julho de 2017
- [18] Nakai M and Hess R A Effects of carbendazim (methyl 2-benzimidazole carbamate; MBC) on meiotic spermatocytes and subsequent spermiogenesis in the rat testis, *Anat. Rec.*, Vols. 247, 1997, p. 379-387.
- [19] Readman, J.W.; Albanis, T.A.; Barcelo, D.; Galassi, S.; Tronczynski, J.; Gabrielides, G.P. Fungicide contamination of Mediterranean estuarine waters: Results from a MED POL pilot survey, *Marine Pollution Bulletin*, Volume 34, Issue 4, April 1997, p. 259-263.
- [20] Uemoto, K. L. *Impacto ambiental das tintas imobiliárias - Relatório final*, São Paulo, Brasil, 2001.
- [21] Kaiser, J.P.; Zuin, S. and Wick, P. Is nanotechnology revolutionizing the paint and lacquer industry? A critical opinion, *Science of The Total Environment*, Vol. 442, 2013, p. 282-289.
- [22] Conde, João Pedro Nanomateriais. *Revista Sociedade Portuguesa de Quimica* nº 97, Junho de 2005, p. 57-59.
- [23] Broeckhuizen, Fleur van and Broeckhuizen, Pieter van *Nanotechnology in the European Construction Industry*, European Federation of Building and Woodworkers. Amesterdão, 2009.
- [24] Mathiazhagan A. and Rani J. *Nanotechnology-A New Prospective in Organic Coating - Review*, *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, Vol. 2 nº4, 2011, p. 225-237.
- [25] Auvinen, J. and Wirtanen, L. The influence of photocatalytic interior paints on indoor air quality, *Atmospheric Environment*, Volume 42, Issue 18, June 2008, p. 4101-4112.

- [26] Rácová, Zuzana; Wasserbauer, Richard; Ryparová, Pavla, Microscopic filamentous fungi in buildings, preventing their occurrence and their remediation using nanofibers, *Advanced Materials Research*, Vol. 649, 2013, p. 89-92.
- [27] Parizek, M.; Douglas, T.E.; Novotna, K.; Kromka, A.; Brady, M.A.; Renzing, A.; Voss, E.; Jarosova, M.; Palatinus, L.; Tesarek, P.; Ryparova, P.; Lisa, V.; dos Santos, A.M.; Warnke, P.H. and Bacakova, L. Nanofibrous poly(lactide-co-glycolide) membranes loaded with diamond nanoparticles as promising substrates for bone tissue engineering, *Int J Nanomedicine*, Vol.7, 2012, p.1931-51.
- [28] Ashby, M.F.; Ferreira, P.J.S.G. and Schodek, D.L. Nanomaterials and nanotechnologies in health and the environment. *Nanomaterials, Nanotechnologies and Design: An Introduction for Engineers and Architects*, Vol, chapter 11. Butterworth-Heinemann, Oxford, 2009.
- [29] Geranio, L.; Heuberger M. and Nowack B. The Behavior of Silver Nanotextiles during Washing. *Environ. Sci. Technol*, 43 (21), 2009, pp 8113–8118.
- [30] Faggio, G.; Modafferi, V.; Panzera, G.; Alfieri, D. and Santangelo, S. Micro-Raman and photoluminescence analysis of composite vanadium oxide/poly-vinyl acetate fibres synthesised by electro-spinning, *Journal of Raman Spectroscopy*. Volume 43, Issue 6, June 2012, p. 761–768.
- [31] Wang, Yan; Zhang, Qun; Zhang, Chen-lu; Li, Ping, Characterisation and cooperative antimicrobial properties of chitosan/nano-ZnO composite nanofibrous membranes, *Food Chemistry*, Volume 132, Issue 1, 1 May 2012, Pages 419-427.
- [32] Ortan, A.; Fierascu, I.; Ungureanu, C.; Fierascu, R.C.; Avramescu, S.M.; Dumitrescu, O. and Dinu-Pirvu, C.E. Innovative phytosynthesized silver nanoarchitectures with enhanced antifungal and antioxidant properties, *App. Surf. Sci.*, Vol. 358, Dec. 2015, p. 540-548.
- [33] Ion, R.M.; Turcanu-Carutiu, D.; Fierascu, R. C.; Fierascu, I.; Bunghez, I.R.; Ion, M.L.; Teodorescu, S.; Vasilevici, G. and Raditoiu, V. Caosite-Hydroxyapatite composition as consolidating material for the chalk stone from Basarabi-Murfatlar churches ensemble, *App. Surf. Sci.*, Vols. 358, Dec. 2015, p. 612-618.
- [34] Mendes, Sandra Teresa de Oliveira. Desenvolvimento de formas farmacêuticas de ação tópica, Tese de Mestrado, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2013.
- [35] Gaylarde, C.C.; Morton, L.H.G.; Loh, K.; Shirakawa, M.A. Biodeterioration of external architectural paint films - A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, Vol 65, 2011.
- [36] Sterflinger, K. Fungi: Their role in deterioration of cultural heritage, *Fungal Biology Reviews*, Vol. 24, 2010, pp. 47-55.
- [37] Hallmann, C.; Rüdrieh, J.; Enseleit, M.; Friedl, T. and Hoppert, M. Microbial diversity on a marble monument: a case study. *Environmental Earth Science*, Vol. 63, 2011, p. 1701-1711.
- [39] Shirakawa, Márcia Aiko Biodeterioração de argamassas por fungos: desenvolvimento de teste acelerado para avaliação da bio-receptividade, Instituto de Ciências Biomédicas da
- [38] Arthur, R.A.; Gregory, C.J. and Matthews, I.P. The amount of surface mould contamination in homes in South Wales and the prevalence and relative abundance of differing mould genera, Vol. II, *Proceedings of International Society of Indoor Air Quality and Climate*, Lisbon, 2006.
- [40] Machado, Bárbara Cláudia Cabral Alves Caracterização das litogias e patologias da Sé de Lamego - Tese de Doutoramento, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, 2012.
- [41] Alves, A.; Henriques, I.; Santos, A.; Tação, M.; Correia, A. Tipagem Genética de Microrganismos. Lab. de Diversidade Microbiana, Aveiro, 2003.