



# CATÓLICA

UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO  
Escola Superior de Biotecnologia

EFICÁCIA ANTIMICROBIANA DE REVESTIMENTOS COM DIÓXIDO DE TITÂNIO  
EM AMBIENTE REAL HOSPITALAR

por

Dandára Caioque Alves da Cruz Costa

Novembro de 2018



# CATÓLICA

UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO  
Escola Superior de Biotecnologia

## EFICÁCIA ANTIMICROBIANA DE REVESTIMENTOS COM DIÓXIDO DE TITÂNIO EM AMBIENTE REAL HOSPITALAR

Tese apresentada à Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa  
para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Aplicada

por

Dandára Caioque Alves da Cruz Costa

Local: Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa

Orientação: Professora Doutora Paula Teixeira e Professora Doutora Manuela Pintado

*Aos meus pais,  
por tudo.*

## Resumo

As infecções nosocomiais são uma das complicações mais comuns na hospitalização e existe, de facto, um aumento bastante alarmante no número das infecções nosocomiais ou hospitalares. Um dos meios de transmissão, frequentemente descrito como uma fonte de surtos de infecções nosocomiais são as superfícies. Uma abordagem como estratégia preventiva para a contaminação microbiana de superfícies pode ser através de um revestimento incorporado com dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>), uma vez que este material permite atingir áreas de difícil alcance e possibilita uma desinfecção mais ecológica e eficaz.

Este trabalho teve como principal objetivo, estudar a eficácia antimicrobiana de um sistema fotocatalítico *in loco*, em ambiente real hospitalar, através da sua aplicação numa sala de um hospital. Paralelamente a este estudo, testou-se a eficácia do sistema em duas estirpes bacterianas, assim como na qualidade do ar da sala.

A eficiência do sistema fotocatalítico foi testada através da análise microbiológica de colheitas de amostras das superfícies da sala, onde se realizou em paralelo um estudo à qualidade do ar no interior da mesma. Adicionalmente, estudou-se a eficácia da fotocatalise na morte celular de *Pseudomonas aeruginosa* e de *Staphylococcus epidermidis* resistente à meticilina (MRSE) no estado planctónico e em biofilme em diferentes condições e tempos de atividade através de testes realizados unicamente em laboratório, e os resultados foram posteriormente observados por SEM. O crescimento celular planctónico e a formação dos biofilmes sobre as superfícies dos revestimentos foram promovidos através da inoculação de 0,4 ml das suspensões bacterianas nos revestimentos, que foram posteriormente submetidos às diferentes condições de tratamento.

A análise das amostragens efetuadas nas superfícies das salas do hospital não revelaram reduções relevantes e os resultados foram poucos conclusivos, assim como os resultados das colheitas do ar. Os resultados dos testes laboratoriais demonstraram reduções das células planctónicas de *P. aeruginosa* e de *S. epidermidis* de 2,2 e 1,8 Log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup>, respetivamente e de 1,1 e 1,3 Log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> para os biofilmes de *P. aeruginosa* e de *S. epidermidis*, respetivamente. A observação por SEM não permitiu relacionar a redução da densidade bacteriana observada com os resultados obtidos nos testes laboratoriais.

Palavras Chave: Fotocatalise; dióxido de titânio; infecção nosocomial; antimicrobiano; superfícies fotocatalíticas.

## Abstract

Nosocomial infections are one of the most common complications in hospitalization and there is indeed a very alarming increase in the number of nosocomial or hospital-acquired/associated infections. One of the means of transmission, often described as a source of nosocomial infections outbreaks, are surfaces. One approach, as a preventive strategy for microbial contamination of surfaces, can be by the application of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) coatings, as this material allows to reach difficult range areas and a more ecological and profitable disinfection. The key mechanism of titanium dioxide photocatalysis is the microbial death through the production of reactive species on the surface of the catalyst.

The main aim of this work is to study the efficacy of a photocatalytic system *in loco*, in a hospital, against microorganisms through a system made of TiO<sub>2</sub> coatings activated by a solar spectrum fluorescent lamp. The efficacy of the photocatalytic system was tested in a real hospital environment through its application in a hospital room through the microbial analysis of samples of the surfaces of the room. Another study was carried out in parallel, an air quality test in the same room, in order to analyze its relation with the system's application. In addition, the efficiency of photocatalysis on *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis* death of planktonic cells and biofilm at different times of activity under different test conditions through laboratory-only tests was studied and the samples were analysed by SEM observation.

Planktonic cell growth and biofilm formation on the coating surfaces was promoted by the inoculation of 0.4 ml of the bacterial suspensions, which were subsequently subjected to the different treatment conditions.

The analysis of the samplings performed on the hospital surfaces's didn't reveal relevant reductions and the results were few conclusive, as well as the air quality results. The results of the laboratory tests showed reductions in planktonic cells of *P. aeruginosa* and *S. epidermidis* of 2.2 and 1.8 Log<sub>10</sub> CFU/cm<sup>2</sup>, respectively, and of 1.1 and 1.3 Log<sub>10</sub> CFU/cm<sup>2</sup> for *P. aeruginosa* biofilms and *S. epidermidis*, respectively. The SEM observation didn't allow to relate the reduction of bacterial density observed with the obtained results in the laboratory tests.

Keywords: Photocatalysis; titanium dioxide; nosocomial infection; antimicrobial; photocatalytic surfaces.

## **Agradecimentos**

Primeiramente, agradeço aos meus pais, por serem o meu pilar, por nunca me deixarem desistir, por toda a dedicação e esforço que sempre fizeram por mim durante toda a minha vida e por toda a família. Um grande obrigada, por todo o carinho, amor e valores que sempre me transmitiram. Vocês são incríveis. Ao meu irmão Júnior, desde sempre.

À professora Paula Teixeira e à professora Manuela Pintado, por toda a disponibilidade e compreensão durante a realização deste trabalho, assim como, pelo conhecimento transmitido ao longo do mestrado.

Foram muitas as pessoas que se cruzaram comigo na vida e neste meu percurso acadêmico, e por ser difícil mencionar todas, faço um agradecimento geral a todos os amigos pelos momentos de desabafo, motivação e diversão, assim como aos meus colegas de laboratório que contribuíram diretamente para a realização deste projeto.

A todas as pessoas que passaram pela minha vida e me ensinaram algo.

# Índice

Resumo.....	IV
<i>Abstract</i> .....	V
Agradecimentos.....	VI
Lista de figuras.....	IX
<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1 Infecções nosocomiais.....	1
1.1.1. Causas e prevenção.....	2
1.1.1.1. Resistência a antibióticos.....	2
1.1.1.2. Qualidade do ar.....	3
1.1.1.3. Contaminação por superfícies.....	4
1.2. Biofilmes.....	6
1.2.1. Formação de biofilmes.....	6
1.2.2. Produção de EPS ( <i>extracellular polymeric substances</i> ).....	7
1.2.3. <i>Quorum sensing</i> .....	8
1.2.4. Papel dos biofilmes nas infecções.....	8
1.3. Dióxido de titânio.....	9
1.3.1. Superfícies antimicrobianas de dióxido de titânio.....	10
1.3.2. Fotocatálise do dióxido de titânio.....	10
1.4. Objetivo.....	13
<b>2. Materiais e métodos.....</b>	<b>14</b>
2.1. Processo de amostragem em ambiente hospitalar.....	14
2.1.1. Colheitas do ar.....	16
2.2. Testes realizados em laboratório.....	16
2.2.1. Crescimento celular planctónico nas superfícies.....	19
2.2.2. Formação de biofilme nas superfícies.....	20
2.2.3. Observação por microscopia eletrónica de varrimento (SEM).....	21
<b>3. Resultados e Discussão.....</b>	<b>23</b>
3.1. Estudo do impacto do sistema fotocatalítico na carga microbiana em ambiente real hospitalar.....	23
3.1.2. Impacto do sistema fotocatalítico na qualidade do ar.....	26
3.2. Testes laboratoriais.....	29

3.2.1. Avaliação da eficácia do sistema fotocatalítico na sobrevivência de células planctónicas de <i>P. aeruginosa</i> e de <i>S. epidermidis</i> .....	29
3.2.2. Avaliação da eficácia do sistema fotocatalítico na sobrevivência de biofilmes de <i>P. aeruginosa</i> e de <i>S. epidermidis</i> .....	33
3.3. Observação por SEM.....	35
3.3.1. Observação do impacto do sistema fotocatalítico na sobrevivência de células planctónicas após 24 horas de tratamento.....	36
3.3.2. Observação do impacto do sistema fotocatalítico na sobrevivência de biofilmes após 24 horas de tratamento.....	39
<b>4. Conclusões Gerais</b> .....	<b>41</b>
<b>5. Trabalho Futuro</b> .....	<b>42</b>
<b>6. Bibliografia</b> .....	<b>43</b>

## Lista de figuras

**Figura 1.** Medidas preventivas para evitar a resistência aos antimicrobianos (Pina *et al.*, 2010)

**Figura 2.** Cadeia de transmissão de infecção com medidas de básicas de prevenção e isolamento (Pina *et al.*, 2010).

**Figura 3.** Etapas de formação do biofilme. 1- fase reversível, em que as células não se encontram totalmente aderidas à superfície. 2- fase irreversível, onde as células estão aderidas de forma definitiva. 3- formação da matriz EPS. 4- biofilme maduro. 5- fim do ciclo de vida em biofilme para algumas células, que voltam à forma planctónica, podendo mais tarde voltar a formar biofilme (Lappin-Scott *et al.*, 2014).

**Figura 4.** Esquema do mecanismo da fotocatalise do TiO<sub>2</sub>. Após a incidência da radiação UV na superfície, os fotões de alta energia excitam a molécula gerando electrões livres (e<sup>-</sup>) e um buraco de electrão com carga positiva (h<sup>+</sup>). Adaptado de Liou and Chang, 2012.

**Figura 5.** Exemplos de reações de radicais fotogerados na atmosfera e em ambiente aquoso. Adaptado de Hanaor and Sorrell, 2010.

**Figura 6.** Sala de pensos da unidade de internamento do serviço de cirurgia vascular do Hospital de Gaia/Espinho, com o sistema fotocatalítico aplicado no chão, no tampo do balcão e nas paredes.

**Figura 7.** Sala de pensos da unidade de internamento do serviço de urologia do Hospital de Gaia/Espinho sem implementação do sistema fotocatalítico.

**Figura 8.** Esquema de montagem da lâmpada UV e dos fragmentos de revestimento, dentro da placa de Petri, utilizados nos ensaios laboratoriais.

**Figura 9.** Morfologia da superfície do revestimento incorporado com o TiO<sub>2</sub> a azul (A) e do revestimento comum a cor de laranja (B), posicionados no interior de uma placa de Petri.

**Figura 10.** Microscópio electrónico de varrimento utilizado para observação das amostras.

**Figura 11.** Revestimento com  $\text{TiO}_2$  (A) e revestimento comum (B) com as dimensões mais reduzidas e adequadas a serem inseridas no SEM.

**Figura 12.** *Sputter coater* utilizado para revestir as amostras com ouro/paládio.

**Figura 13.** Média da variação da carga microbiana na sala de pensos do serviço de internamento de cirurgia vascular do Hospital de Gaia/Espinho, com o revestimento incorporado com  $\text{TiO}_2$ , na sala após a realização dos pensos (Suja); após a limpeza (Limpa) e 1:30 horas após a realização da limpeza (1:30 h após a utilização antes da limpeza).

**Figura 14.** Média da variação da carga microbiana na sala de pensos do serviço de internamento de urologia do Hospital de Gaia/Espinho, sem o revestimento incorporado com  $\text{TiO}_2$ , na sala depois da realização dos pensos (Suja) e após a limpeza (Limpa).

**Figura 15.** Impacto das condições de tratamentos na sobrevivência de *S. epidermidis* ao longo de diferentes tempos de tratamento no revestimento com  $\text{TiO}_2$  e num revestimento comum. O tempo de tratamento está representado em horas (h) tendo sido analisado o efeito para duas (T2), quatro (T4), seis (T6), oito (T8) e 24 horas (T24).

**Figura 16.** Impacto do sistema na sobrevivência de *P. aeruginosa* ao longo de diferentes tempos de tratamento no revestimento com  $\text{TiO}_2$  e num revestimento comum. O tempo de tratamento está representado em horas (h) tendo sido analisado o efeito para duas (T2), quatro (T4), seis (T6), oito (T8) e 24 horas (T24).

**Figura 17.** Eficácia do sistema fotocatalítico em biofilme de *S. epidermidis* formado nas superfícies dos revestimentos após 1:30 horas e 24 horas nas diferentes condições de tratamento: “com revestimento e com luz”, “com revestimento e sem luz”, “sem revestimento e sem luz” e “sem revestimento e com luz”.

**Figura 18.** Eficácia do sistema fotocatalítico em biofilme de *S. epidermidis* formado nas superfícies dos revestimentos após 1:30 horas e 24 horas nas diferentes condições de tratamento: “com revestimento e com luz”, “com revestimento e sem luz”, “sem revestimento e sem luz”, e “sem revestimento e com luz”.

**Figura 19.** Observação por SEM da superfície do revestimento incorporado com TiO<sub>2</sub> sem inoculação a uma ampliação 35x (A) e a 4000x (B).

**Figura 20.** Observação por SEM da superfície do revestimento comum, sem o TiO<sub>2</sub> e sem inoculação a uma ampliação 35x (A) e a 4000x (B).

**Figura 21.** A- Observação por SEM das amostras da sobrevivência de *P. aeruginosa* após 24 horas no revestimento TiO<sub>2</sub> com exposição à luz UV. B- Amostra da sobrevivência de *P. aeruginosa* após 24 horas no revestimento TiO<sub>2</sub> sem exposição à luz UV. C- Amostra da sobrevivência de *P. aeruginosa* após 24 horas no revestimento sem TiO<sub>2</sub> com exposição à luz UV. D- Amostra da sobrevivência de *P. aeruginosa* após 24 horas de exposição no revestimento sem TiO<sub>2</sub> sem exposição à luz UV.

**Figura 22.** A- Observação por SEM das amostras da sobrevivência de *S. epidermidis* após 24 horas no revestimento TiO<sub>2</sub> com exposição à luz UV. B- Amostra da sobrevivência de *S. epidermidis* após 24 horas no revestimento TiO<sub>2</sub> sem exposição à luz UV. C- Amostra da sobrevivência de *S. epidermidis*

# 1. Introdução

## 1.1. Infecções nosocomiais

A infecção nosocomial, é definida como uma infecção adquirida no hospital por um doente que foi internado por outra razão que não essa infecção, sem haver evidência de que a mesma estivesse presente ou em incubação no momento da admissão do mesmo na instituição, ou seja, que é contraída depois do internamento do doente no hospital (DGS, 2007).

A infecção hospitalar é tão antiga quanto a origem dos hospitais, sendo que as primeiras referências à existência dos mesmos remontam ao ano 325 d.C, os quais eram estrategicamente construídos ao lado das catedrais devido ao elevado índice de mortalidade na época. Durante muito tempo, os doentes eram internados em hospitais sem algum tipo de isolamento e os pacientes em recuperação ou infetados conviviam no mesmo ambiente. Os casos de doenças infecciosas disseminavam-se com grande rapidez entre os internados e, com muita frequência, o paciente era admitido no hospital com uma determinada doença e falecia devido a outra. As condições sanitárias nos hospitais eram precárias, ocorrendo manuseamento inadequado de alimentos, o abastecimento de água era muitas vezes de origem incerta, e até mesmo as camas eram partilhadas por mais de dois doentes (Couto *et al*, 2009).

As infecções nosocomiais são uma das complicações mais comuns na hospitalização podendo propagar-se em vários ambientes hospitalares, como por exemplo, nas salas de repouso dos enfermeiros, enfermarias, salas de cirurgia e outros ambientes clínicos, e ter vários tipos de transmissão como: através de equipamentos contaminados, roupa de cama, aerossóis e os próprios funcionários do hospital (Xia *et al.*, 2016). Este tipo de infecções ocorrem durante a hospitalização do paciente levando à morbidez e aumentando a mortalidade, podendo isto, aumentar o tempo de hospitalização, requerer mais tratamentos e diagnósticos, o que leva a custos adicionais ao hospital (Geffers and Gastmeier, 2011). Por consequência, para além da gravidade do problema, relativamente à saúde do doente, acresce ainda o dispêndio em recursos hospitalares e restantes custos associados. De acordo com um estudo epidemiológico realizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em cinquenta e cinco hospitais de quarenta e quatro países de quatro regiões da OMS (Europa, Mediterrâneo

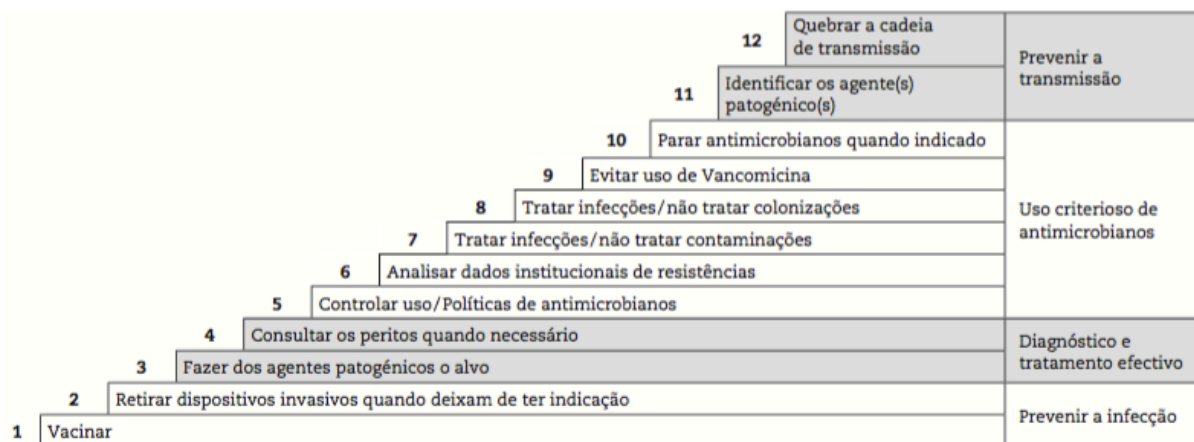
Oriental, sudeste Asiático e Pacífico Ocidental) 8,7 por cento dos pacientes hospitalares tiveram uma infecção nosocomial (Xia *et al.*, 2016).

### 1.1.1. Causas e prevenção

#### 1.1.1.1. Resistência a antibióticos

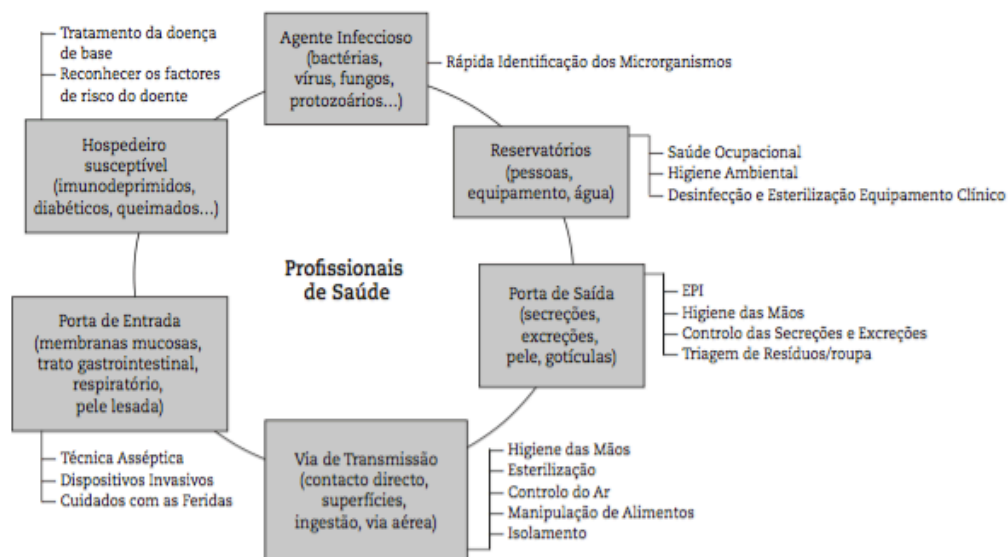
Existe, de facto, um aumento bastante alarmante no número das infecções nosocomiais ou hospitalares. Este aumento, teve em grande parte origem devido ao uso descontrolado de antibióticos, que promove a resistência aos mesmos e a sua propagação, ocorrido maioritariamente devido a uma falha de uma legislação adequada (Magalhães *et al.*, 2017). Após serem infetados, é administrado aos pacientes antibióticos e, através da seleção e da troca de elementos genéticos que conferem resistência, os antibióticos impulsionam o aparecimento de estirpes bacterianas resistentes, uma vez que as bactérias sensíveis são suprimidas ou mortas e as estirpes resistentes sobrevivem ao tratamento, podendo tornar-se endémicas e alastrar-se pelo hospital (Xia *et al.*, 2016).

Algumas medidas preventivas (Figura 1) podem ser adoptadas no sentido de impedir o surto ou a propagação das infecções derivadas à resistência aos antimicrobianos, tais como: a vacinação, fazer o uso criterioso de antimicrobianos através da identificação do patogénico e da direcionalidade da terapia, ou seja, o antibiótico deve ser direccionado para o patogénico considerado o mais provável responsável pela infecção, tendo em conta os padrões de susceptibilidade do mesmo, e suspender a toma apenas quando indicado.



**Figura 1.** Medidas preventivas para evitar a resistência aos antimicrobianos (Pina *et al.*, 2010).

A identificação das causas das infeções hospitalares são de extrema importância, assim como sistemas de vigilância, de modo a que seja possível monitorizar e prevenir a ocorrência das mesmas. As mudanças comportamentais são um grande obstáculo, mas fundamentais, como por exemplo, a infeção cruzada dos pacientes pelos trabalhadores através das mãos apresenta-se como uma das maiores fontes de infeções e vias de transmissão (Kramer *et al.*, 2006). As principais medidas de prevenção e controlo assentam por um lado, no cumprimento das boas práticas, tomando medidas de precauções básicas como: higiene das mãos, o uso adequado de equipamentos de proteção individual, controlo ambiental e isolamento, para além do uso racional dos antimicrobianos (Pina *et al.*, 2010). Algumas das medidas básicas de prevenção recomendadas com o intuito de evitar o surto das infeções encontram-se representadas na Figura 2.



**Figura 2.** Cadeia de transmissão de infeção com medidas de básicas de prevenção e isolamento (Pina *et al.*, 2010).

### 1.1.1.2. Qualidade do ar

A desinfecção apresenta uma elevada importância na qualidade do ar interior e possui grande impacto na saúde humana devido ao risco de exposição a microrganismos nocivos transportados pelo ar, designados por bioaerossóis. Os poluentes biológicos tais como bactérias, fungos e vírus representam um papel importante na definição de qualidade de ar. Alguns destes microrganismos suspensos no ar podem ser patogénicos e responsáveis por

doenças como tuberculose, Doença do Legionário, pneumonia, Aspergilose, entre outras doenças infecciosas causadas tanto por bactérias, vírus ou fungos (Gamage and Zhang, 2010).

Muitos estudos reconhecem o ar do ambiente como fonte de propagação de microrganismos. Embora a maioria das infecções hospitalares esteja associada aos métodos diagnósticos e terapêuticos, essas infecções podem ser veiculadas pelo ar e devem ser consideradas. A matéria particulada (poeira), a taxa de ventilação e a ocupação, a natureza e grau da atividade exercida pelas pessoas que ocupam um espaço físico, são alguns fatores determinantes do grau de contaminação do ar interior (Pereira *et al.*, 2009).

Atualmente, os dados disponíveis demonstram que vários microrganismos podem ser transmitidos por aerossóis. *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, *Pseudomonas aeruginosa* e *Mycobacterium tuberculosis* estão entre as espécies descritas como responsáveis por surtos hospitalares relacionados à contaminação ambiental (Pereira *et al.*, 2009).

### **1.1.1.3. Contaminação por superfícies**

Outro meio de transmissão, frequentemente descrito como uma fonte de surtos de infecções nosocomiais, são as superfícies (Muller *et al.*, 2016), uma vez que podem actuar como reservatórios de microrganismos que, por sua vez, podem levar à disseminação da infecção através do contacto, tanto pelos profissionais de saúde como pelos pacientes (Page *et al.*, 2009). Os patogénicos mais comuns, responsáveis por infecções nosocomiais, são capazes de sobreviver em superfícies durante meses podendo, por conseguinte, ocorrer mais facilmente a sua transmissão caso não haja uma desinfeção regular e eficaz. Nos hospitais, as superfícies que entram em contacto com as mãos, são frequentemente contaminadas com patogénicos nosocomiais e podem servir como vectores de transmissão cruzada dos mesmos, uma vez que, um único contacto de uma mão com uma superfície contaminada pode resultar num grau variável de transferência de patogénicos (Kramer *et al.*, 2006).

Não é surpreendente que a ligação entre a contaminação superficial e infecções nosocomiais tenha sido já demonstrada, particularmente quando alguns microrganismos, como *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), por exemplo, pode sobreviver até 9 semanas numa superfície e mantem-se estável em diferentes condições de temperatura, humidade, exposição à luz solar e dessecação (Page *et al.*, 2009). Foi igualmente demonstrado que, 65%

de uma equipa de enfermagem que havia tratado diretamente um indivíduo infetado, contaminou o seu vestuário ou roupa de trabalho com o microrganismo. A contaminação de luvas por MRSA foi também observada em pessoas que não tiveram contacto direto com o paciente mas que, no entanto, tocaram em superfícies de quartos de pacientes infetados. Para além destes factos, outros estudos demonstraram claramente como as mãos (com luvas ou não) dos profissionais de saúde podem ser contaminadas, presumivelmente, por tocar em superfícies na vizinhança imediata de um paciente infetado (Bhalla et al., 2004, Boyce et al., 1997, Page et al., 2009).

Uma abordagem como estratégia preventiva para a contaminação microbiana de superfícies pode ser através da preparação de uma superfície que apresente maior dificuldade ou que impeça a adesão microbiana, em primeiro lugar (Page *et al.*, 2009). Neste caso, materiais revestidos com químicos com atividade antimicrobiana são uma alternativa para a redução da contaminação microbiana em hospitais, uma vez que é possível revestir superfícies com estes mesmos materiais permitindo ajudar na prevenção da recontaminação de um modo mais eficaz do que apenas com a limpeza periódica por desinfetantes (Muller *et al.*, 2016).

O desenvolvimento de revestimentos com superfícies antimicrobianas pode desempenhar um papel importante na resolução de problemas desta natureza. Tal revestimento seria capaz de reduzir as cargas microbianas numa superfície sem intervenção externa ou de modo a complementar a mesma e, portanto, participaria no reforço do regime de higiene de um ambiente hospitalar. Os revestimentos fotocatalíticos de dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>), por exemplo, podem ser potenciais agentes antimicrobianos por matar microrganismos nas suas superfícies, e particularmente úteis para hospitais e centros de atendimento a idosos, onde o controle de bactérias e vírus nas superfícies e no ar é importante, uma vez que estes locais acolhem pessoas com o sistema imunológico mais suscetível e debilitado (Fujishima *et al.*, 2008). Ao contrário dos agentes antibacterianos químicos, as superfícies de TiO<sub>2</sub> não são venenosas ou tóxicas e não resultam em poluição ambiental. Assim, espera-se num futuro próximo que os materiais de TiO<sub>2</sub> auto-limpantes e antimicrobianos possam ter muitas aplicações médicas, pelo menos, nas superfícies de salas de hospitais, e sujeitos a estudos mais aprofundados relativamente à sua eficácia em determinados microrganismos (Fujishima *et al.*, 2008).

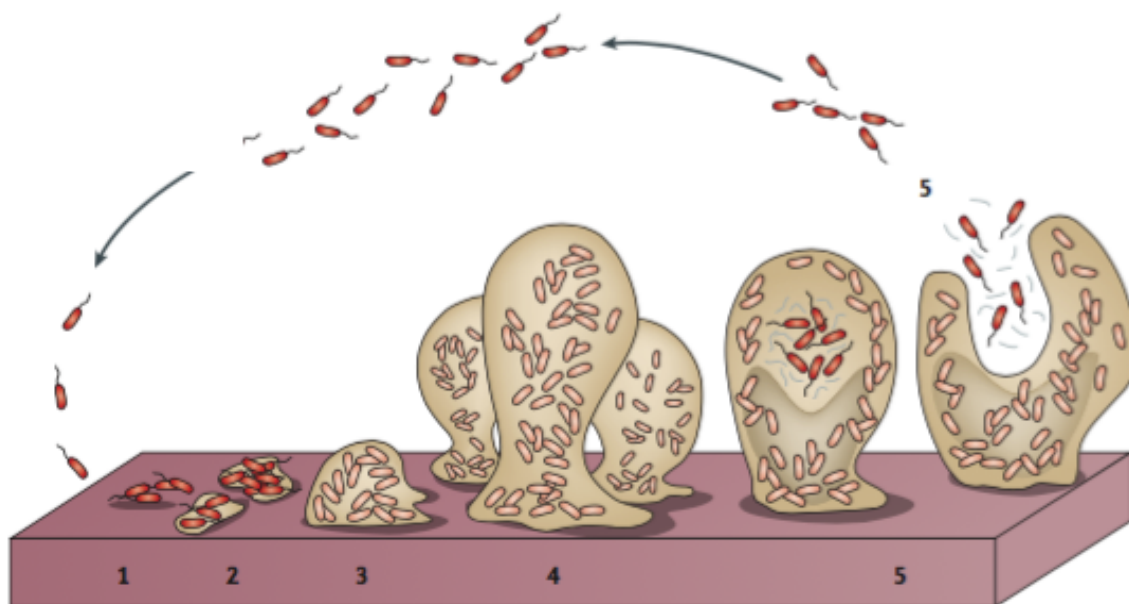
## **1.2. Biofilmes**

Embora há uns anos atrás, houvesse a ideia de que o crescimento bacteriano era apenas planctônico, ou seja, em suspensão líquida, nos dias de hoje os estudos já constataam que a população bacteriana forma, preferencialmente, agregados de várias espécies denominados biofilmes (Henriques *et al.*, 2013). De uma forma concisa, os biofilmes podem ser definidos como uma estrutura de microrganismos aderidos a superfícies bióticas ou abióticas envoltas numa matriz composta por uma substância polimérica extracelular (EPS) (Tutar *et al.*, 2015, Davies, 2003). Os biofilmes são um dos modos de vida mais amplamente distribuídos e bem sucedidos na Terra (Flemming *et al.*, 2016) e possuem a capacidade de apresentar uma ou mais espécies de microrganismos na sua constituição, sendo os casos de comunidades de multiespécies mais predominantes e persistentes (Sanchez-Vizuet *et al.*, 2015).

### **1.2.1. Formação de biofilmes**

A formação do biofilme inicia-se com a aderência das células planctônicas a uma superfície, sucedendo-se em duas fases, a aderência reversível, em que a célula pode libertar-se da superfície voltando à forma planctônica, e a aderência irreversível, em que a célula se mantém na estrutura do biofilme até à fase de desenvolvimento final do mesmo. A aderência irreversível é sucedida pela maturação, fase onde ocorrem mudanças fenotípicas no formato da estrutura (Petrova and Sauer, 2016). Posteriormente à maturação, é frequente suceder a libertação e dispersão de células para o meio envolvente, voltando à forma planctônica, marcando o fim do ciclo de vida do biofilme. No entanto, estas mesmas células podem voltar a originar biofilme, tal como ilustrado na Figura 3 (Uppuluri and Lopez-Ribot, 2016).

O crescimento do biofilme ou aumento da densidade bacteriana, pode também estar associado a um certo perigo e desvantagem para algumas células, uma vez que, à medida que ocorre um aumento da densidade, estas podem ficar demasiado afastadas da interface líquida da estrutura e, conseqüentemente, da fonte de energia e nutrientes. Do mesmo modo, a produção de resíduos e toxinas pode ser um desafio (Petrova and Sauer, 2016).



**Figura 3.** Etapas de formação do biofilme. 1- fase reversível, em que as células não se encontram totalmente aderidas à superfície. 2- fase irreversível, onde as células estão aderidas de forma definitiva. 3- formação da matriz EPS. 4- Biofilme maduro. 5- Fim do ciclo de vida em biofilme para algumas células, que voltam à forma planctônica, podendo mais tarde voltar a formar biofilme (Lappin-Scott *et al.*, 2014).

### 1.2.2. Produção de EPS (*extracellular polymeric substances*)

A matriz produzida pelo biofilme, denominada de EPS (*extracellular polymeric substances*) tem, normalmente, uma espessura de 0,2 a 1,0  $\mu\text{m}$  sendo que, em algumas espécies, não ultrapassa valores de espessura de 10 a 30 nm, e a sua composição compreende diferentes classes de macromoléculas como polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos, glicoproteínas e fosfolípidos (Czaczyk and Myszka, 2007). A densidade celular e a concentração dos polímeros no interior do biofilme são, em grande parte, regulados por vias complexas de sinalização intercelular e genética (Stewart *et al.*, 2015). Foi demonstrado que entre as microcolônias existem canais abertos de água, que funcionam como um sistema circulatório primitivo, para facilitar o transporte de nutrientes e para a remoção de resíduos metabólicos (Davies, 2003).

Na maior parte dos biofilmes, os microrganismos correspondem a menos de 10% da massa seca enquanto a matriz equivale a cerca de 90%, sendo que o componente em maior quantidade é a água. Ao estar envolvido por uma camada altamente hidratada, formada pela

EPS, o biofilme consegue prevenir a desidratação que poderia ser letal e proteger-se contra as variações diárias de humidade (Flemming and Wingender, 2010, Sutherland, 2001). A EPS formada à volta das células proporciona uma barreira que restringe a penetração de biocidas químicos no interior do biofilme, até mesmo reduzindo a concentração dos mesmos, levando a uma resistência a agentes antimicrobianos como desinfetantes, antibióticos e surfactantes (Sutherland, 2001, Czaczyk and Myszka, 2007).

### **1.2.3. *Quorum sensing***

Quando em biofilme, as células estabelecem um processo de comunicação entre si, denominado de *Quorum-sensing* (QS), face ao aumento da densidade bacteriana e que envolve a produção, deteção e resposta a moléculas de sinalização extracelular denominadas de auto-indutores (AIs), responsáveis por expressar um fenótipo que se ajuste à nova estrutura (Rutherford and Bassler, 2012, Huber et al., 2003).

Embora os princípios por trás da expressão genética mediada por sinalização do QS sejam partilhados nas bactérias Gram-negativo e Gram-positivo, os mecanismos moleculares e a sinalização molecular diferem (Bjarnsholt and Givskov, 2007). O sistema de comunicação QS, apresenta um papel crítico na fase de maturação do biofilme, e regula a diferenciação e desenvolvimento da estrutura, sendo que, uma falha na comunicação pode fazer com que as células permaneçam na fase planctónica (Chen and Wen, 2011).

### **1.2.4. Papel dos biofilmes nas infeções**

Os biofilmes têm sido amplamente reconhecidos por apresentarem um papel importante nas doenças humanas, dado ao número de doenças associadas aos biofilmes bacterianos ser considerado bastante elevado (Davies, 2003). Uma das propriedades em comum nos biofilmes, tanto de bactérias Gram-negativo como Gram-positivo, é o facto de serem induzidos por concentrações sub-letais de antibióticos (Oliveira *et al.*, 2015). Em biofilme, as bactérias apresentam 10 a 1000 vezes menos suscetibilidade a antimicrobianos específicos quando comparadas com os seus homólogos no estado planctónico. Esta suscetibilidade deve-se a diferentes fatores, tais como: a fraca penetração dos antibióticos na EPS, a presença arbitrária de células que apresentem um fenótipo resistente designadas por “persistentes”, a presença de células que não crescem ou células que desencadeiam uma

resposta ao stresse estando sob condições desfavoráveis dentro do biofilme e o facto das células se encontrarem protegidas da fagocitose (Balcazar *et al.*, 2015, Farina *et al.*, 2017).

O grande problema das bactérias produtoras de biofilme é o facto de originarem infeções crónicas caracterizadas por inflamação persistente e dano tecidual que, apesar de comprometerem a qualidade de vida, raramente são fatais sendo geralmente atribuídas a espécies de bactérias como, por exemplo, *P. aeruginosa* ou *S. epidermidis*, microrganismos que são omnipresentes na água, no ar, no solo ou na pele e patogénicos oportunistas que persistem visto que, preferencialmente, optam pela formação de biofilmes, nos quais encontram-se protegidos (Hoiby *et al.*, 2010). Um exemplo comum de infeção crónica bastante frequente, é o caso da infeção broncopulmonar causada por *P. aeruginosa*, em pacientes com fibrose cística, em que a bactéria persiste apesar do sistema imunitário estar são e do tratamento com antibióticos (Davies, 2003).

Para além da resistência a antibióticos, há também uma crescente resistência ao stresse ambiental e à ação de desinfetantes que tem sido subestimada (Sanchez-Vizuet *et al.*, 2015). Nomeadamente, a lixívia (hipoclorito de sódio), agente biocida oxidante, que é considerado um dos mais eficazes agentes antibacterianos, requer um aumento de concentração de 600 vezes mais para erradicar células de *S. aureus* em biofilme quando comparada com células planctónicas da mesma espécie (Davies, 2003).

### **1.3. Dióxido de titânio**

O dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ), é o quarto metal mais abundante do mundo e o nono elemento mais abundante, constituindo cerca de 0,63% da crosta terrestre. Foi descoberto em 1791 em Inglaterra por William Gregor, ao descobrir a presença de um novo elemento na ilmenite ( $\text{FeTiO}_3$ ) (Carp, 2004). A capacidade do  $\text{TiO}_2$  como fotocatalisador é conhecida há mais de 90 anos (Foster *et al.*, 2011). Este composto, existe na natureza em três formas distintas: anatase, rutilo e broquite, sendo a anatase e o rutilo as formas fotocatalíticas ativas e a anatase o fotocatalisador mais eficiente (Muranyi *et al.*, 2010). É um composto não tóxico e é utilizado frequentemente como aditivo em produtos de cosmética, alimentos e produtos farmacêuticos (Muranyi *et al.*, 2010). Possui ainda a característica de ser muito estável e

resistente à degradação, uma vez que é inorgânico e, de acordo com a legislação europeia, não há um valor máximo de  $\text{TiO}_2$  especificado sendo recomendado o uso em quantidades de acordo com as boas práticas de fabricação (Ammendolia *et al.*, 2014).

### **1.3.1. Superfícies antimicrobianas de dióxido de titânio**

A desinfecção, é um dos métodos mais importantes e comuns de controlo do número de patogénicos em instrumentos e superfícies em hospitais e outras unidades de cuidados de saúde, no entanto, muitos desinfetantes tradicionais à base de químicos, como álcoois, aldeídos, iodo, fenóis e cloro, podem ser voláteis e os seus produtos secundários podem ser tóxicos e cancerígenos para os humanos (Liou and Chang, 2012).

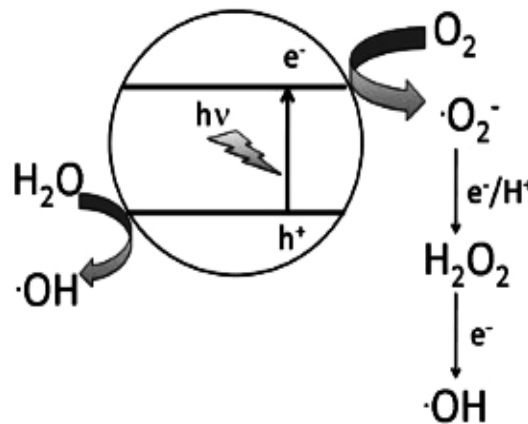
Neste sentido, é de elevada importância alcançar novas estratégias de desinfecção que sejam ecológicas e com baixo custo associado, como é o caso do dióxido de titânio, que pode ser um promissor método alternativo de desinfecção de superfícies através da produção de espécies reativas de oxigénio (Kumar *et al.*, 2015). Estes radicais que, ao contrário dos desinfetantes referidos anteriormente, não têm um alvo específico dentro de um microrganismo, ou seja, são microbicidas não-seletivos, tendo este aspeto uma importante implicação, uma vez que evita os potenciais problemas dos microrganismos que desenvolvem resistência a um tratamento antimicrobiano (Page *et al.*, 2009).

Superfícies em ambientes hospitalares, por exemplo, onde a carga microbiana pode ser elevada, podem ser áreas em que a aplicação de um revestimento incorporado com  $\text{TiO}_2$  pode ser bastante vantajosa, uma vez que permite atingir áreas de difícil alcance e permitem uma desinfecção mais ecológica e eficaz (Fisher *et al.*, 2014). As superfícies fotocatalíticas podem ainda ser super-hidrofílicas, ou seja, a água alastra-se na superfície permitindo que esta desempenhe a função de autolimpante (Foster *et al.*, 2011)

### **1.3.2. Fotocatálise do dióxido de titânio**

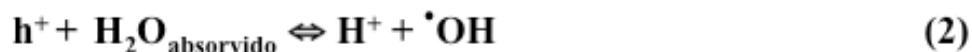
O processo da fotocatalise inicia-se através da absorção de um fóton pelo  $\text{TiO}_2$  que, com um *gap* de energia (*gap energy*,  $E_g$ ) suficiente, promove o eletrão excitado da banda de valência para a banda de condução, ficando assim com carga positiva na banda de valência, criando um buraco de eletrão de carga positiva ( $h^+$ , falta de eletrão na camada de valência)

(Liou and Chang, 2012). Na forma de anatase, o *gap* de energia necessário para promover um elétron é aproximadamente 3,2 eV, o que significa que a fotocatalise pode ser ativada por fótons com um comprimento de onda, aproximadamente, inferior a 385 nm, ou seja, radiação ultravioleta A (UVA) (Foster *et al.*, 2011). O esquema do mecanismo da fotocatalise pode ser observado através da Figura 4.



**Figura 4.** Esquema do mecanismo da fotocatalise do  $\text{TiO}_2$ . Após a incidência da radiação UV na superfície, os fótons de alta energia excitam a molécula gerando elétrons livres ( $e^-$ ) e um buraco de elétron com carga positiva ( $h^+$ ). Adaptado de Liou and Chang, 2012.

Os radicais, espécies atômicas com um elétron livre não emparelhado, formam-se devido a uma reação de uma molécula adsorvida, como o  $\text{O}_2$  ou o  $\text{H}_2\text{O}$ . Os elétrons na banda de condução facilitam a redução de aceptores de elétrons e os buracos de elétrons facilitam a oxidação dos doadores de elétrons (Hanaor and Sorrell, 2010). Na Figura 5, é possível ver exemplos de reações de radicais fotogerados na atmosfera e em ambiente aquoso.



**Figura 5.** Exemplos de reações de radicais fotogerados na atmosfera e em ambiente aquoso. Adaptado de Hanaor and Sorrell, 2010.

Estas espécies reativas, participam em processos de oxidação e redução quer com a própria molécula de  $\text{TiO}_2$  quer com moléculas adsorvidas na superfície. Este é o mecanismo chave da fotocatalise do dióxido de titânio, a produção de espécies reativas na superfície do catalisador. A principal espécie reativa é o radical hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ), que é produzido por reações redox entre o  $\text{TiO}_2$  fotoexcitado e o  $\text{H}_2\text{O}$  adsorvido, o oxigénio molecular e por grupos hidróxido na superfície do catalisador. Os radicais hidroxilo produzidos pelos processos de oxidação e redução na superfície do  $\text{TiO}_2$  são altamente reativos e totalmente não seletivos. Estes atributos fazem das espécies radicais biocidas extremamente potentes, com a capacidade de oxidar a maioria dos compostos orgânicos na superfície (Page *et al.*, 2009). As espécies reativas geradas, têm posteriormente um papel muito importante na desinfecção das superfícies uma vez que foi demonstrado que as espécies reativas de oxigénio (ROS) geradas nos revestimentos de  $\text{TiO}_2$  fotoirradiadas têm a capacidade de atacar os fosfolípidos polinsaturados nas bactérias e causar danos no DNA, sendo que isto pode levar à morte celular (Liou and Chang, 2012). Com os buracos ( $\text{h}^+$ ) e os radicais hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ) gerados na banda de valência, e eletrões e iões gerados na banda de condução, a fotocatalise do  $\text{TiO}_2$  consegue decompor e mineralizar compostos orgânicos participando em reações de oxidação e originando dióxido de carbono (Huang *et al.*, 2000).

No caso da desinfecção do ar por superfícies fotocatalíticas, é necessário numa fase inicial remover ou desativar os bioaerossóis. Neste caso o processo deve seguir três passos sequenciais: os bioaerossóis têm que ser separados do ar e imobilizados na superfície, após este passo deve ocorrer a morte na superfície e por fim serem decompostos oxidativamente. O desaparecimento da massa celular em superfícies fotocatalíticas já foi observado (Jacoby *et al.*, 1998), assim como foi demonstrado que a *Escherichia coli* pode ser completamente mineralizada no ar através de uma superfície revestida com  $\text{TiO}_2$  (Gamage and Zhang, 2010). Para além disso, existem evidências de que uma superfície fotocatalítica usada para desinfecção também pode ser auto-limpante em um sistema sólido-ar (Jacoby *et al.*, 1998).

#### 1.4. Objetivo

Tendo em consideração as problemáticas anteriormente referidas, conclui-se que há, efetivamente, uma relação entre elas: o elevado número de infeções nosocomiais e o seu aumento crescente, a formação de biofilmes e a sua relação com o aumento das infeções hospitalares e a resistência a antibióticos, assim como as infeções adquiridas através de superfícies contaminadas. Uma vez que estes fatores contribuem para um aumento na taxa de mortalidade e de prolongamento de internamento dos doentes, pretendeu-se, com este trabalho, estudar uma forma de contornar este problema através de uma estratégia de apoio aos processos convencionais de desinfeção.

Uma vez que, a contaminação das superfícies hospitalares, e de outras instalações de cuidados de saúde são, muitas vezes, uma fonte de contaminação por patogénicos, e consequente transmissão dos mesmos aos pacientes, este trabalho é direcionado neste sentido, consistindo na aplicação de revestimentos em superfícies à base de dióxido de titânio que são ativadas pela radiação UV e testar a sua eficácia antimicrobiana.

Posto isto, o principal objetivo deste trabalho centrou-se em estudar a eficácia antimicrobiana de um sistema fotocatalítico *in loco* em ambiente real hospitalar, através da sua aplicação nas superfícies de uma sala de um hospital. Em paralelo a este estudo, foi também analisado o efeito do mesmo sistema na qualidade do ar, assim como, a sua eficácia na morte, e consequente redução celular de *P. aeruginosa* e de *S. epidermidis* resistente à metilina, através de ensaios realizados unicamente em laboratório.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Processo de amostragem em ambiente hospitalar

Neste estudo, pretendeu-se testar o impacto que o sistema fotocatalítico exercia na redução da carga microbiana após a aplicação do mesmo num ambiente real hospitalar. Para tal, realizaram-se colheitas de amostras das superfícies de duas salas de pensos distintas do Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia e Espinho, uma delas revestida com o sistema fotocatalítico pertencente à unidade de internamento do serviço de cirurgia vascular (Figura 6) e outra sem o sistema pertencente à unidade de internamento do serviço de urologia (Figura 7). As colheitas das amostras foram realizadas entre o período dos meses de outubro e junho.

Efetuuou-se colheitas a pontos de amostragem de zonas do chão, do balcão e das paredes, através de esfregaço das superfícies com zaragatoas estéreis. As zaragatoas foram conservadas em 10 ml de água peptonada em tubos estéreis de 15 ml, bem acondicionadas e em ambiente refrigerado até ao momento da análise. A área de colheita para cada ponto de amostragem manteve-se sempre constante, sendo obtida através da utilização de um molde, previamente desinfetado com álcool, com uma área de 522,5 cm<sup>2</sup>.



**Figura 6.** Sala de pensos da unidade de internamento do serviço de cirurgia vascular do Hospital de Gaia/Espinho, com o sistema fotocatalítico aplicado no chão, no tampo do balcão e nas paredes.



**Figura 7.** Sala de pensos da unidade de internamento do serviço de urologia do Hospital de Gaia/Espinho sem implementação do sistema fotocatalítico.

O período das colheitas consistiu em momentos estratégicos com o objetivo de testar as diferentes variáveis, sendo elas as seguintes: “sala suja” que consistia no período após a realização dos pensos efetuados durante toda a manhã e antes da limpeza da sala por parte das funcionárias; “uma hora e meia após utilização e antes limpeza” de modo a analisar o efeito do sistema durante este intervalo de tempo; e “sala limpa” que correspondia ao momento após a limpeza da sala para comparação do efeito do sistema fotocatalítico com o da limpeza efetuada pelo hospital. Excepcionalmente, não foram colhidas amostras das paredes de ambas as salas na condição “limpa”, uma vez que não era efetuada a limpeza das paredes, nem realizadas colheitas de amostras da sala sem o revestimento na condição “1:30 horas após utilização e antes da limpeza”, devido a não se encontrar revestida com o material testado. A luz UV instalada na sala, com o propósito de ativar a fotocatalise, encontrava-se ligada por um período ininterrupto de 15 horas, das 7:00 às 22:00 horas.

Procedeu-se à contagem de unidades formadoras de colónias (UFC) através do método de espalhamento em placas de *plate count agar* (PCA). As placas foram preparadas em duplicado e incubadas a uma temperatura de 37 °C durante 48 horas tendo sido, posteriormente, efetuada a contagem de colónias de células viáveis. O número de UFC/cm<sup>2</sup> foi quantificado através das equações 1 e 2.

$$UFC.ml^{-1} = \left( média\ n^{\circ}\ colónias \times \frac{1}{diluição} \times \frac{1}{(volume\ adicionado)} \right) \quad (1)$$

$$\frac{UFC.ml^{-1}}{A} \quad (2)$$

Sendo “A” o valor da área do molde utilizado.

### **2.1.1. Colheitas do ar**

Paralelamente às colheitas de amostras realizadas às superfícies das duas salas de pensos do Hospital de Gaia/Espinho, efetuou-se ainda colheitas do ar em ambas as salas uma vez por mês, entre o período de novembro e junho, com colaboração dos técnicos do laboratório de análises técnicas SAGILAB Laboratório Análises Técnicas SA, sediado na cidade do Porto. Os materiais de colheita foram fornecidos pelo laboratório, assim como os ensaios microbiológicos para obtenção dos resultados. A quantificação de microrganismos viáveis foi efetuada a 30 °C e obtida para bactérias e fungos.

Efetuaram-se, no total, seis colheitas em meses consecutivos, uma vez por mês, com a exceção do mês de dezembro, tendo sido os resultados expressos em UFC/cm<sup>3</sup> de bactérias e fungos. O horário da realização das colheitas foi sempre compreendido entre as 14:30 e as 15:30 horas e os dias da semana foram selecionados aleatoriamente.

## **2.2. Testes realizados em laboratório**

Subsequentemente à realização dos estudos realizados no hospital, pretendeu-se testar um sistema fotocatalítico, denominado sistema PureHealth<sup>TM</sup>, composto pela lâmpada UV e pelos revestimentos incorporados com TiO<sub>2</sub>, um produto comercializado pela empresa Orion Portugal, Lda.

Para estudar o impacto da fotocatalise na redução da carga microbiana em ensaios realizados apenas em laboratório, recorreu-se à utilização de uma estrutura incorporada com uma lâmpada UV, necessária para ativar as propriedades fotocatalíticas do sistema fotocatalítico, com uma base para o posicionamento das placas de Petri (Figura 8), com o propósito de simular as condições reais a que os microrganismos estariam sujeitos de maneira a haver mais controle das variáveis analisadas. A lâmpada UV apresentava uma potência de 15 W e encontrava-se a uma distância aproximada de 35 cm da base. Utilizaram-se fragmentos quadrados do revestimento incorporado com o TiO<sub>2</sub>, e de um revestimento comumente utilizado sem nenhuma atividade antimicrobiana (Figura 9), a funcionar como controlo, todos com uma área de 6,25 cm<sup>2</sup>. As condições de tratamento a que os

microrganismos foram submetidos após a preparação das amostras nos ensaios laboratoriais e inoculação (pontos 2.2.1, 2.2.2 e 2.2.3) foram as seguintes:

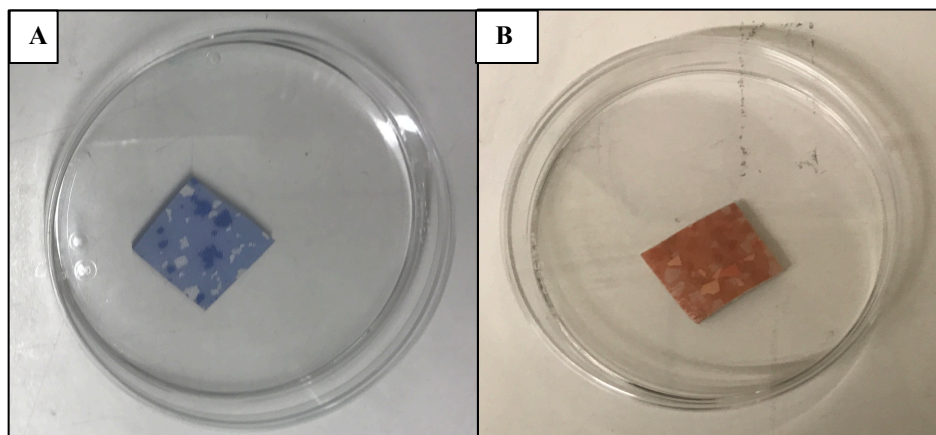
- Revestimento  $\text{TiO}_2$  com exposição à luz UV;
- Revestimento  $\text{TiO}_2$  sem exposição à luz UV;
- Revestimento comum com exposição à luz UV;
- Revestimento comum sem exposição à luz UV;

A condição onde os microrganismos foram submetidos ao revestimento com  $\text{TiO}_2$  juntamente com a luz UV permite avaliar a eficácia da fotocatalise na morte das bactérias; a condição “revestimento  $\text{TiO}_2$  sem exposição à luz UV” permite avaliar um possível efeito apenas do revestimento com  $\text{TiO}_2$  na morte bacteriana; “revestimento comum com exposição à luz UV” permite analisar se apenas a luz UV exerce alguma influência na morte das bactérias e a condição “revestimento comum sem exposição à luz UV” representa o controlo negativo uma vez que as amostras não estão sujeitas a nenhum tipo de tratamento.

Os resultados foram todos obtidos através da contagem de UFC em placas de PCA e expressos em  $\text{Log}_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup>.



**Figura 8.** Esquema de montagem da lâmpada UV e dos fragmentos de revestimento, no interior da placa de Petri, utilizados nos ensaios laboratoriais.



**Figura 9.** Morfologia da superfície do revestimento incorporado com o  $\text{TiO}_2$  a azul (A) e do revestimento comum a cor de laranja (B), posicionados no interior de uma placa de Petri.

Para a realização dos ensaios laboratoriais utilizou-se uma estirpe da bactéria *P. aeruginosa*, isolado pertencente à coleção de culturas da Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa, e uma estirpe de *S. epidermidis* resistente à metilina, ATCC 51625.

A importância do estudo de *S. epidermidis*, reside no facto deste microrganismo ser um patogénico oportunista, habitante habitual dos epitélios das mucosas do corpo humano e a espécie mais prevalente e persistente na maioria das membranas cutâneas e mucosas. É a causa de infeções nosocomiais em recém-nascidos, pacientes gravemente doentes e imunocomprometidos, sendo também, frequentemente, isolado de infeções pós-cirúrgicas, com a capacidade de produzir biofilme exibindo ainda uma crescente resistência a antibióticos (Rohde *et al.*, 2007, Arciola *et al.*, 2005). No que concerne à *P. aeruginosa*, esta bactéria representa o quinto patogénico mais frequente no mundo e a principal causa de morbidade e mortalidade em pacientes com pneumonia adquirida por aparelhos de ventilação mecânica e fibrose cística (Pereira *et al.*, 2015).

Os procedimentos dos ensaios laboratoriais dos pontos 2.2.1, 2.2.2 e 2.2.3, mencionados posteriormente, foram todos executados através da mesma metodologia para ambas as bactérias.

### 2.2.1. Crescimento celular planctônico nas superfícies

Para testar o impacto do sistema na redução celular e aderência das células nas superfícies dos revestimentos, analisou-se o comportamento da variação da carga microbiana em diferentes tempos e condições de tratamento. O procedimento experimental adotado foi adaptado da norma ISO 22196:2007 “*Plastics- Measurement of antibacterial activity on plastics surfaces*”, que especifica um método para avaliar a atividade antibacteriana dos produtos de plástico incorporados com antibacterianos.

Para promover o crescimento das bactérias sobre as superfícies dos revestimentos, iniciou-se a preparação do inóculo transferindo um *loop* da respectiva cultura em placa de PCA, com uma ansa de inoculação estéril, para rampa de *Nutrient Agar* (NA) e incubou-se a 37 °C durante 24h. Transferiu-se novamente um *loop* da cultura obtida para outro tubo com o mesmo meio e incubou-se nas mesmas condições durante 24h. Deste último tubo, transferiu-se um *loop* da cultura para uma suspensão de *Nutrient Broth* 1/500 (1/500 NB), a ser utilizada como o inóculo.

Inoculou-se, com o auxílio de uma micropipeta, cada um dos quatro fragmentos dos revestimentos, que foram previamente desinfetados com álcool e secos, com 400 µl da suspensão bacteriana preparada. Posteriormente, espalhou-se com uma vareta de vidro em forma de “L”, passada por álcool e flamejada, sobre as superfícies dos revestimentos seguidamente dipostos dentro de diferentes placas de Petri fechadas. Os tempos de exposição dos revestimentos às diferentes condições de tratamento foram 0, 2, 4, 6, 8 e 24 horas, correspondendo a T0, T2, T4, T6, T8 e T24, respetivamente.

Após o tempo de exposição às condições testadas, iniciou-se o processo de recuperação das bactérias do revestimento e, para isso, adicionou-se ao interior de cada placa de Petri 10 ml de *Soybean casein digest broth with lecithin and polyoxyethylene sorbitan monooleate* (SCDLP) suplementado com Tween 20/80, para parar a reação e iniciar o processo de recuperação e contagem das células viáveis. Removeu-se todo o conteúdo para um tubo estéril de 50 ml, assim como o fragmento de revestimento, no sentido de recuperar também as células que se encontrassem aderidas à superfície, e agitou-se no vórtex durante 2 minutos de modo a desagregar as bactérias do revestimento.

Estimou-se o número de bactérias viáveis através de diluições decimais em série em solução salina tamponada com fosfato, plaqueou-se em placas de PCA em duplicado através do método de espalhamento em placa e calculou-se o número de UFC/cm<sup>2</sup> através das equações 1 e 2 anteriormente referidas.

Inicialmente, estimou-se o número de bactérias em placas de PCA através do mesmo processo, no tempo inicial T<sub>0</sub>, que representa a quantificação do número de células viáveis imediatamente após a inoculação dos revestimentos e extração do inóculo para contagem, de modo a garantir que a concentração de bactérias estivesse entre 2,5x10<sup>5</sup> e 10x10<sup>5</sup> cél/ml.

### **2.2.2. Formação de biofilme nas superfícies**

Para além do estudo do comportamento celular planctónico, pretendeu-se, de igual forma, estudar o efeito da fotocatalise nos biofilmes formados pelas duas estirpes de bactérias utilizadas sendo que, para isso, foi necessário promover a formação de biofilme nas superfícies dos revestimentos. O procedimento experimental utilizado foi igualmente adaptado da norma ISO 22196:2007, com algumas alterações.

Iniciou-se o processo de elaboração do inóculo através da preparação de uma suspensão transferindo, com uma ansa estéril, um *loop* da cultura da bactéria da placa de Petri para um tubo de 1/500 NB e agitou-se no vórtex de forma a homogeneizar a solução. As superfícies foram todas inoculadas com 400 µl da suspensão bacteriana e, seguidamente reservadas durante 24 horas de crescimento para a formação de biofilme, cada uma dentro de uma placa de Petri ao abrigo da luz. Posteriormente, as superfícies foram cuidadosamente lavadas com 400 µl de água desionizada esterilizada adicionada com o auxílio de uma micropipeta para retirar as células não aderidas ao revestimento e de seguida transferidas para outra placa de Petri.

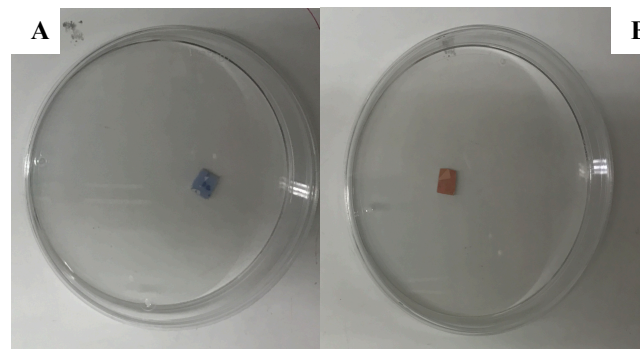
Após a preparação do material a ser utilizado na experiência, os revestimentos foram então submetidas às seguintes condições: revestimento TiO<sub>2</sub> com luz UV; revestimento TiO<sub>2</sub> sem luz UV; revestimento comum com luz UV; e revestimento comum sem luz UV. O efeito do sistema foi testado em dois tempos distintos para todas as condições: após 1:30 horas e após 24 horas de tratamento. Os resultados foram expressos em UFC/cm<sup>2</sup>, calculados através das equações 1 e 2.

### 2.2.3. Observação por microscopia eletrônica de varrimento (SEM)

Com o intuito de observar, através de uma análise visual, as diferenças no crescimento bacteriano planctônico e em biofilme nos dois tipos de revestimentos nas diferentes condições a que foram submetidos, recorreu-se à observação e análise das amostras por microscópio electrónico de varrimento (SEM) (Figura 10). A preparação dos revestimentos iniciou-se com a redução do tamanho dos mesmos a uma dimensão de 1 cm<sup>2</sup>, de forma a apresentarem as medidas adequadas para inserção no microscópio (Figura 11). Repetiu-se novamente o procedimento experimental utilizado nos ensaios dos pontos 2.2.1 e 2.2.2 para os novos fragmentos. Posteriormente, ainda na preparação para a observação no SEM, as amostras foram submetidas a um processo de desidratação, onde foram imersas durante 5 minutos em soluções com diferentes concentrações de etanol de 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 70% e 90%, por ordem crescente de concentração, apresentando-se secas antes de passar de uma solução para a outra.



**Figura 10.** Microscópio electrónico de varrimento utilizado para observação das amostras.



**Figura 11.** Revestimento com TiO<sub>2</sub> (A) e revestimento comum (B) com as dimensões mais reduzidas e adequadas a serem inseridas no SEM.

O equipamento utilizado foi o Microscópio Electrónico de Varrimento JEOL-56000 (Tokyo, Japão) equipado com um *SPRITE HR Four Axis Stage Controller* (Deben Research). As amostras foram dispostas em bases metálicas com fita de carbono e revestidas com ouro/paládio usando um *Sputter Coater* (Polaron, Bad Schwalbach, Germany), ilustrado na Figura 12. As imagens foram obtidas usando um *spot size* de 30-35 e um potencial de 10-22 kV. Todas as análises foram realizadas à temperatura ambiente (20 °C).



**Figura 12.** *Sputter coater* utilizado para revestir as amostras com ouro/paládio.

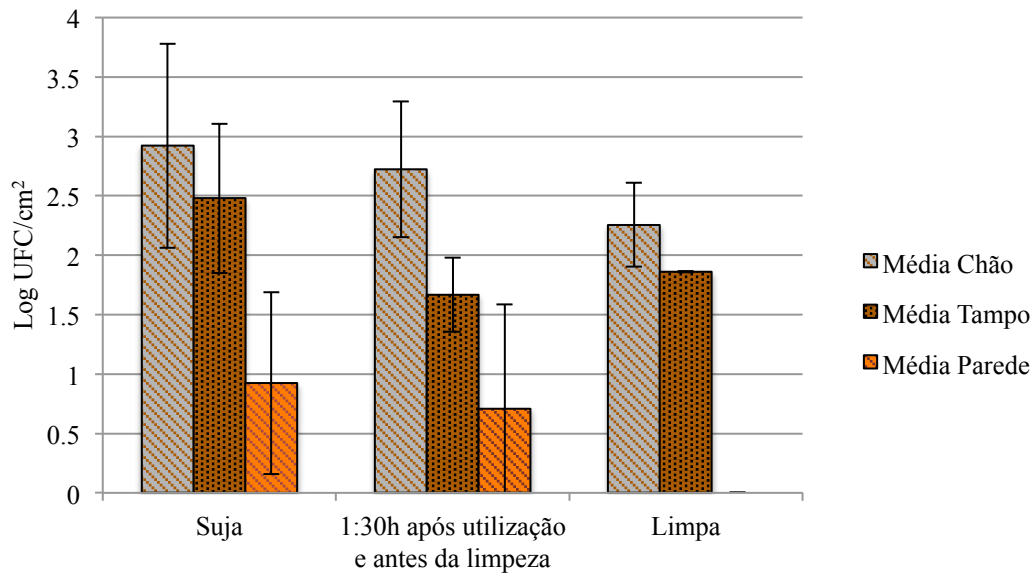
### **3. Resultados e Discussão**

Neste capítulo encontram-se apresentados os resultados obtidos, assim como uma discussão dos mesmos assente numa breve revisão da literatura. Os resultados encontram-se subdivididos nas duas etapas de testes realizados ao sistema fotocatalítico: as análises das amostras obtidas das colheitas realizadas nas superfícies das salas do hospital, assim como das colheitas realizadas ao ar, e os testes laboratoriais.

#### **3.1. Estudo do impacto do sistema fotocatalítico na carga microbiana em ambiente real hospitalar**

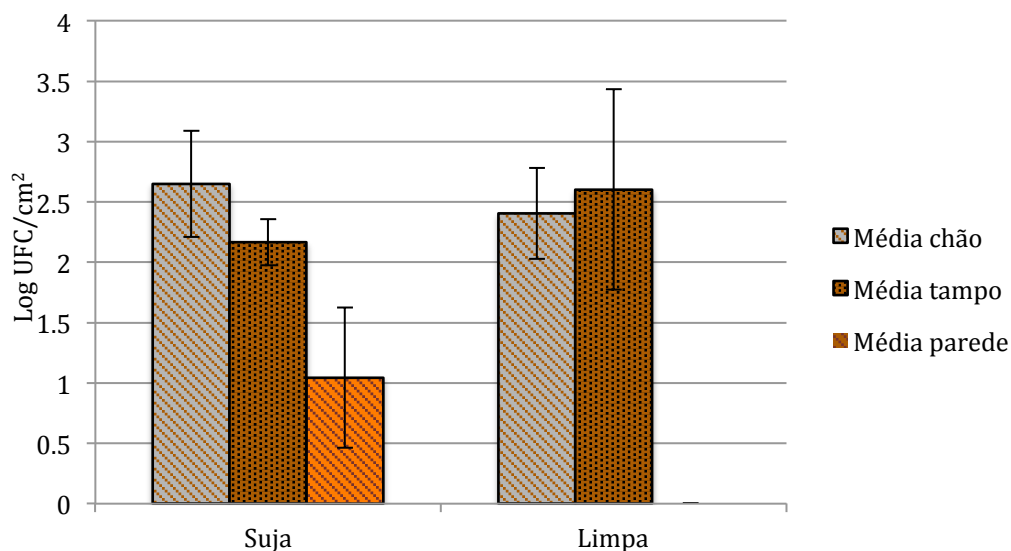
Com o objetivo de efetuar uma análise do impacto do sistema fotocatalítico, com todos os fatores aleatórios do dia a dia de uma rotina de um ambiente hospitalar associados, e devido à necessidade de se fazerem estudos de avaliação da eficácia de agentes antimicrobianos em superfícies cujo tipo de material seja o mais representativo da situação real onde esses agentes serão aplicados, recorreu-se a duas salas do Hospital de Gaia/Espinho como objeto de estudo.

As amostragens efetuadas na sala com o sistema fotocatalítico implementado (Figura 13), não revelaram uma redução relevante dos valores da carga microbiana entre cada local analisado nos três momentos de amostragem, com a exceção do tampo, onde atingiu a redução mais elevada de  $0,9 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/cm}^2$  do tampo da sala “suja” para “1:30 após utilização e antes da limpeza”, indicando que esta redução, possivelmente, foi devida ao efeito do sistema, uma vez que deste último momento até após a limpeza por parte do hospital ocorreu um aumento no mesmo local, ainda que mínimo de  $0,2 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/cm}^2$ .



**Figura 13.** Média da variação da carga microbiana na sala de pensos do serviço de internamento de cirurgia vascular do Hospital de Gaia/Espinho, com o revestimento incorporado com  $\text{TiO}_2$ , na sala após a realização dos pensos (Suja); após a limpeza (Limpa) e 1:30 horas após a realização da limpeza (1:30 h após a utilização antes da limpeza).

Apartir da quantificação do  $\text{Log UFC/cm}^2$  respetiva à sala do serviço de urologia, sem o revestimento incorporado com  $\text{TiO}_2$  (Figura 14), não se registaram reduções relevantes após a limpeza das salas por parte dos funcionários do hospital. A limpeza efetuada pelo hospital ao tampo, não originou um decréscimo dos valores ocorrendo, pelo contrário, um aumento, ainda que não relevante, dos mesmos. O valor obtido para as amostras das paredes sujas permitiu constatar que a carga microbiana registada nestas superfícies é bastante semelhante à da sala com o revestimento. A contagem de microrganismos realizada no tampo, revela um acréscimo dos valores da carga microbiana da sala suja quando comparados com a sala limpa, sugerindo uma possível estratégia de limpeza pouco correta, tal como ocorrido na sala com o revestimento na mesma zona.



**Figura 14.** Média da variação da carga microbiana na sala de pensos do serviço de internamento de urologia do Hospital de Gaia/Espinho, sem o revestimento incorporado com TiO<sub>2</sub>, na sala depois da realização dos pensos (Suja) e após a limpeza (Limpa).

Estes últimos dados podem ainda sugerir que o aumento de valores, ou a não redução dos mesmos após a limpeza, possa dever-se aos métodos de limpeza utilizados. Fatores como a utilização dos mesmos panos e da mesma esfregona, sem que houvesse o descarte da parte de recarga de forma periódica após a limpeza de cada espaço, pode ter influência no aumento inesperado da carga microbiana após a limpeza da sala, uma vez que pode ocorrer a recontaminação de microrganismos provenientes de outros espaços anteriormente limpos com o mesmo equipamento.

Os valores de UFC/cm<sup>2</sup> mais baixos para as duas salas foram registados para as amostras das paredes, uma vez que, naturalmente, esta é a zona onde as pessoas e objetos têm menor contacto e ocorre, por isso, menor contaminação, e os valores mais elevados foram registados para o chão, zona de maior contacto direto com a entrada e saída de pessoas e, conseqüentemente, maior contaminação do piso através da sola dos sapatos dos profissionais e dos doentes, que têm contato tanto com o ambiente exterior como com locais críticos do hospital.

A obtenção de resultados pouco conclusivos neste estudo, pode estar relacionada com fatores como a dificuldade no acompanhamento da dinâmica hospitalar, sendo que este foi um dos obstáculos a tentar contornar durante o período de amostragem das salas, uma vez que o

horário de limpeza não se manteve sempre constante, e a necessidade de tratar dos doentes variava em algumas ocasiões, originando situações em que a sala era limpa e novamente utilizada para a realização de pensos. De igual modo, a realização de algumas colheitas em momentos em que a sala se encontrava quer com o ar condicionado ligado quer desligado, uma vez que a regulação do mesmo variava consoante a temperatura diária, pode também ter influenciado algumas amostragens. A variação do número de doentes em ambas as salas não foi utilizada como fator relevante, uma vez que, embora o número de doentes não fosse sempre exatamente igual nas duas salas, os valores nunca ultrapassavam os 4-6 doentes por dia.

Os resultados não evidenciaram reduções elevadas e valores conclusivos, uma vez que a sala do hospital não é um sistema isolado e, tal como mencionado, não foi possível um controle tão preciso das variáveis, levando a mais aleatoriedade e dispersão nos resultados, sendo este facto visível nos elevados desvios padrões dos gráficos, indicando uma grande dispersão dos valores em torno das médias.

### **3.1.2. Impacto do sistema fotocatalítico na qualidade do ar**

Uma vez que o ambiente hospitalar é destinado a cuidados de prestação de saúde a pacientes que se encontram frequentemente com o sistema imunitário debilitado, apresentando assim mais suscetibilidade a um ar contaminado, e podendo estes mesmos ser uma fonte de contágio e propagação de infeções, é importante encontrar soluções de desinfeção que garantam a constante qualidade do ar nestas instalações.

O presente trabalho, realizado em paralelo com a análise microbiológica às superfícies das duas salas, relaciona a concentração de bioaerossóis em ambientes internos das salas do hospital e a instalação e a não existência da mesma, de um sistema fotocatalítico, levando em consideração alguns parâmetros que influenciam na qualidade do ar, como a utilização do ar condicionado e o número diário de ocupantes.

As amostras de ar colhidas em ambas as salas (Tabela 1) referentes ao mês de novembro, demonstram que quer a sala com o revestimento quer a sala sem o revestimento, apresentam os valores de UFC/cm<sup>3</sup>, tanto para bactérias como para fungos, mais elevados de todos meses, e a sala sem o revestimento o valor mais elevado de todos para bactérias. Do

mês de janeiro até ao mês de março os valores mais elevados foram registados na sala com o revestimento, com a exceção do valor de UFC/cm<sup>3</sup> para fungos no mês de Fevereiro. No que concerne ao mês de abril, sucedeu-se o oposto, havendo o registo mais baixo dos valores para bactérias e fungos.

**Tabela 1.** Resultados das colheitas de ar realizadas nas duas salas de pensos do hospital de Gaia/Espinho.

<b>Resultados (UFC/ cm<sup>3</sup>)</b>		
	<b>Sala com o sistema</b>	<b>Sala sem o sistema</b>
<b>Dia 30/11/2015</b>		
Bactérias	426	618
Fungos	182	283
<b>Dia 11/01/2016</b>		
Bactérias	229*	165
Fungos	165	262
<b>Dia 15/02/2016</b>		
Bactérias	208*	81
Fungos	165	154
<b>Dia 14/03/2016</b>		
Bactérias	208	186
Fungos	218	208
<b>Dia 15/04/2016</b>		
Bactérias	40	295
Fungos	40	91
<b>Dia 9/05/2016</b>		
Bactérias	165**	81
Fungos	123	273

\*Colheitas realizadas com o ar condicionado ligado.

\*\*Colheitas realizada após a realização dos pensos e antes da limpeza (sala “suja”).

Tendo em conta a sazonalidade da incidência das infeções respiratórias e gripes na população, assim como a propagação dos patogénicos responsáveis pelas mesmas através do ar, que ocorrem com mais frequência no outono/inverno, e que faz com que a afluência nos hospitais seja maior, o expectável seria que os valores mais elevados de UFC/cm<sup>3</sup> de microorganismos no ar fossem nesta altura do ano. Os registos da sala com o sistema corroboram o expectável, uma vez que os valores mais elevados foram do fim do mês de

novembro até à metade do mês de março, ocorrendo no mês de abril e maio um decréscimo das contagens tanto para fungos como para bactérias, correspondendo ao período da Primavera. A análise das contagens para bactérias e fungos, efetuadas na sala de pensos sem o sistema, não permite relacionar os valores obtidos com a sazonalidade da incidência de infecções respiratórias e a afluência no hospital, uma vez que os valores oscilam, não se sendo possível verificar um decréscimo linear do período do Outono/Inverno para a Primavera.

Outro facto que merece destaque em relação ao aumento do número de bioaerossóis são as atividades exercidas pelos ocupantes, que podem levar a emissão ou suspensão de partículas (Buttner and Stetzenbach, 1993). No presente trabalho não houve correlação entre o número de ocupantes e a contagem de bactérias, uma vez que o número se manteve praticamente constante, podendo neste caso a influência estar relacionada com a atividade desenvolvida pelos profissionais de saúde e doentes momentos antes da colheita do ar.

Um dos fatores que pode ter condicionado o resultado das colheitas foi a utilização do ar condicionado, uma vez que algumas colheitas foram efetuadas com o equipamento ligado, assinalado na tabela por um “\*”, e outras com mesmo desligado. O ar condicionado projeta microrganismos que ficam retidos nos filtros e água estagnada e, aliado ao fenómeno cumulativo de 90% do ar reciclado, promove um aumento do número de microrganismos na ordem de 1.000 a 100.000 vezes comparado aos ambientes externos (Buttner and Stetzenbach, 1993, Fernandes *et al.*, 2000). Do mesmo modo, as colheitas nem sempre foram efetuadas com a sala limpa (indicado através de “\*\*”) ao lado dos valores), uma vez que, este fator demonstrou ser uma das condicionantes impossíveis de contornar, dado ao facto dos funcionários nem sempre possuírem horários definidos para a limpeza.

De acordo com o Decreto-Lei no 118/2013, de 20 de agosto e demais legislação a concentração máxima de referência para bactérias e fungos em interiores é de 500 UFC/cm<sup>3</sup> (Jardim *et al.*, 2015). A comparação dos valores obtidos indica que os parâmetros microbiológicos analisados na sala com o sistema estiveram todos em conformidade. O mesmo não se observa para uma das amostras realizada na sala de pensos sem o sistema, com um valor de 618 UFC/cm<sup>3</sup> para a quantificação de bactérias no mês de novembro.

A análise microbiológica da qualidade do ar permite concluir que, embora os valores mais baixos tenham sido registados na sala com a aplicação do sistema fotocatalítico, os

mesmos não são todos inferiores aos registados na sala de pensos sem o sistema nem apresentam uma redução linear, o que não permite relacioná-los com a eficácia do sistema fotocatalítico testado.

### **3.2. Testes laboratoriais**

Para os estudos laboratoriais selecionaram-se duas estirpes, uma de *P. aeruginosa* e outra de *S. epidermidis*; ambas apresentam capacidade de formação de biofilmes num curto período de tempo e são responsáveis por um elevado número de infeções nosocomiais de grande importância clínica (Vuong et al., 2003, Saraswathi and Beuerman, 2015, Rohde et al., 2007). Foi ainda critério de escolha, diferenças ao nível da estrutura da parede celular (*P. aeruginosa* - Gram-negativo; *S. epidermidis* - Gram-positivo) para avaliar o possível impacto da fotocatalise no crescimento e morte bacteriana.

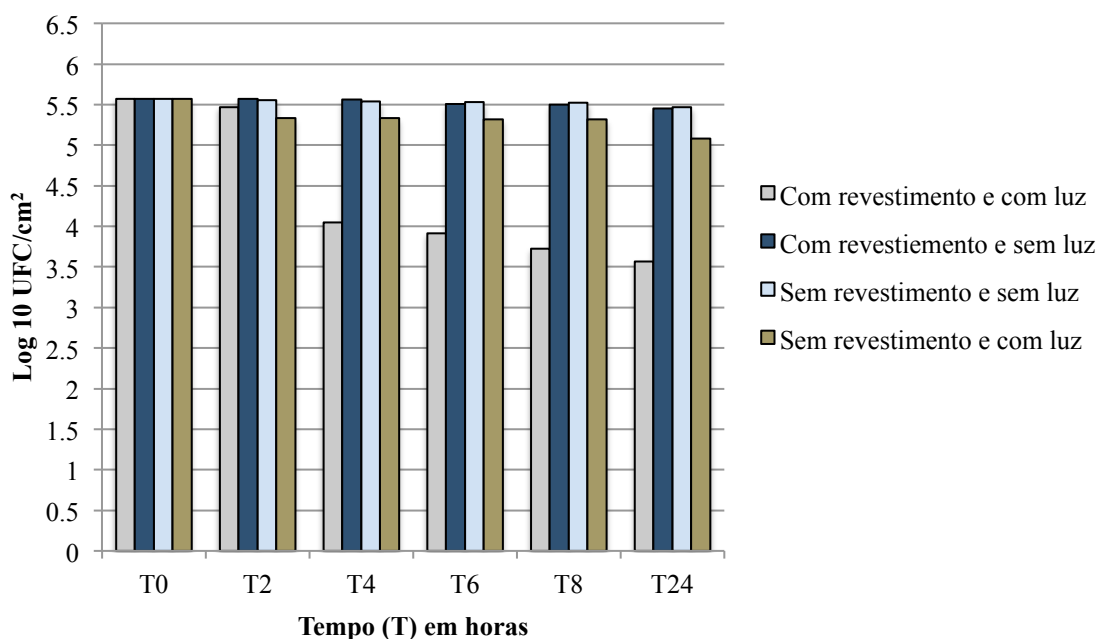
Estudou-se o efeito do sistema fotocatalítico, composto pelo revestimento incorporado com TiO<sub>2</sub> e pela luz UV, através de ensaios laboratoriais com a finalidade de testar as variáveis de uma forma mais controlada. Utilizou-se como controlo um revestimento comumente empregado em superfícies, sem atividade antibacteriana, para posterior comparação com o impacto do sistema na variação da carga microbiana em diferentes condições.

#### **3.2.1. Avaliação da eficácia do sistema fotocatalítico na sobrevivência de células plactónicas de *P. aeruginosa* e de *S. epidermidis***

Pretendeu-se estudar o impacto que a fotocatalise exercia no crescimento bacteriano em diferentes tempos de exposição à mesma, uma vez que a eficiência de um produto antibacteriano depende de vários fatores, sendo um deles o tempo de contacto do produto com as bactérias. Para isso, procedeu-se ao crescimento celular sobre a estrutura superficial dos revestimentos que foram, posteriormente, submetidos às seguintes condições: “revestimento com TiO<sub>2</sub> com exposição à luz UV”, “revestimento com TiO<sub>2</sub> sem exposição à luz UV”; “revestimento sem TiO<sub>2</sub> com exposição à luz UV” e “revestimento sem TiO<sub>2</sub> sem exposição à luz UV”, durante 0 (T0), 2 (T2), 4 (T4), 6 (T6), 8 (T8), e 24 (T24) horas. O tempo “zero” (T0) corresponde ao inóculo inicial (teste de controlo).

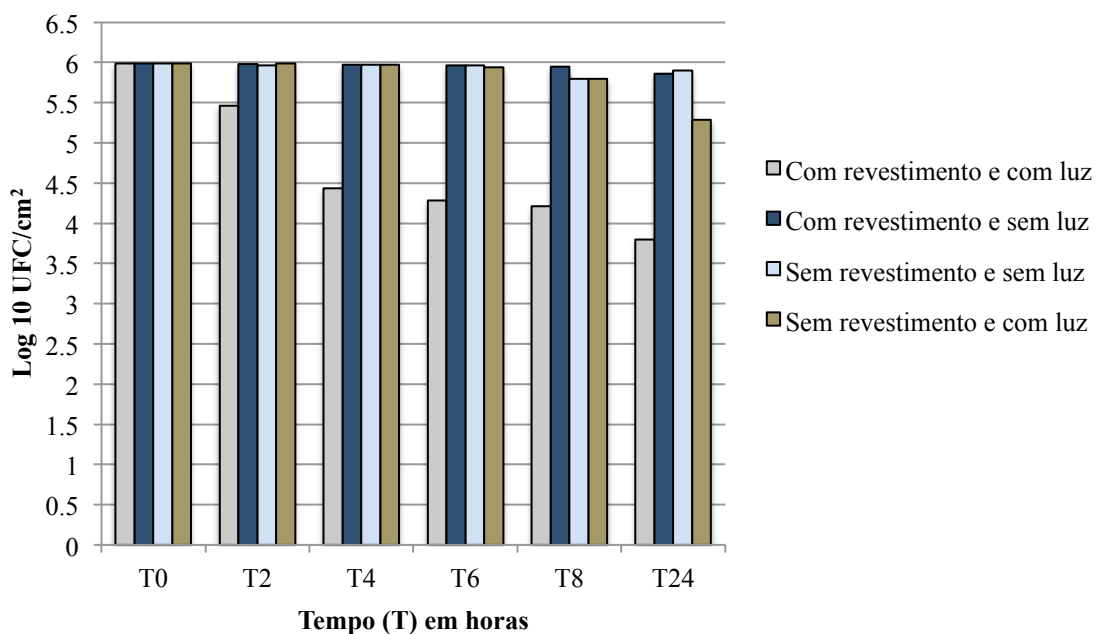
A contagem obtida para o inóculo inicial (T0) foi de 5,6 Log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> e de 6,0 Log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup>, respetivamente, para *S. epidermidis* e para *P. aeruginosa*.

A variação da sobrevivência de *S. epidermidis* durante 24 horas nas diferentes condições de crescimento encontra-se apresentada na Figura 15. Através da análise da figura, constata-se que, em comparação com a carga microbiana inicial, não se observa uma redução relevante para nenhuma condição passadas duas horas de tratamento (T2). No entanto, passadas as quatro horas (T4) a amostra do revestimento com TiO<sub>2</sub> exposta à luz apresenta uma redução de 1,3 Log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup>, sendo que os valores das restantes condições encontram-se praticamente inalterados do ponto de vista microbiológico. Os valores das restantes amostras, não apresentam uma variação relevante desde o T4 até aos valores para T6, T8 e T24, para nenhuma condição testada, com a exceção da condição em que o revestimento com TiO<sub>2</sub> encontrava-se exposto à luz UV, apresentando uma redução de 1,8 Log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> comparativamente ao T0, após as 24 horas de tratamento.



**Figura 15.** Impacto das condições de tratamentos na sobrevivência de *S. epidermidis* ao longo de diferentes tempos de tratamento no revestimento com TiO<sub>2</sub> e num revestimento comum. O tempo de tratamento está representado em horas (h) tendo sido analisado o efeito para duas (T2), quatro (T4), seis (T6), oito (T8) e 24 horas (T24).

Os dados respetivos ao estudo da variação da carga microbiana de *P. aeruginosa* durante 24 horas nas diferentes condições de tratamento (Figura 16), demonstram que, comparativamente ao valor inicial de T0, os valores registados em T2 não revelam uma redução bacteriana relevante. Após as primeiras quatro horas de tratamento (T4), observa-se um decréscimo na quantificação bacteriana da amostra submetida à condição em que o revestimento com TiO<sub>2</sub> encontrava-se exposto à luz UV, de 1,6 Log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup>, não sendo possível observar uma redução relevante nas restantes condições. Os valores registados apresentam-se praticamente inalterados de T4 até aos tempos T6, T8 e T24, com a exceção do valor da amostra em que o revestimento com TiO<sub>2</sub> encontrava-se exposto à luz UV após 24 horas, com uma redução de 2,2 Log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> em relação ao T0.



**Figura 16.** Impacto do sistema na sobrevivência de *P. aeruginosa* ao longo de diferentes tempos de tratamento no revestimento com TiO<sub>2</sub> e num revestimento comum. O tempo de tratamento está representado em horas (h) tendo sido analisado o efeito para duas (T2), quatro (T4), seis (T6), oito (T8) e 24 horas (T24).

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que, comparativamente às restantes condições de tratamento, as amostras expostas à condição “revestimento com TiO<sub>2</sub> com luz”, apresentam uma maior redução da carga bacteriana indicando um efeito da fotocatalise na morte celular. A análise simultânea da Figura 15 e da Figura 16, permite ainda constatar que o sistema fotocatalítico apresenta maior eficácia (embora uma diferença pouco

relevante) na inativação de *P. aeruginosa*, uma vez que o sistema apresentou para esta bactéria uma redução superior à de *S. epidermidis* no final da experiência comparativamente aos respectivos valor de T0.

Para além da redução bacteriana conferida pelo sistema fotocatalítico, a redução de 0,7 e 0,5 Log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> para as amostras de *P. aeruginosa* e de *S. epidermidis*, respetivamente, submetidas apenas à ação da luz UV após 24 horas de tratamento, sugere que, para além da atividade fotocatalítica, a radiação UV emitida pela lâmpada, por si só, possa exercer alguma influência na morte bacteriana. Esta ocorrência não é surpreendente, uma vez que vai ao encontro de resultados já obtidos em estudos precedentes que relataram um efeito da radiação UV através da observação de uma melhoria em amostras sem o TiO<sub>2</sub>, mas expostas apenas à luz UV (Muranyi *et al.*, 2010).

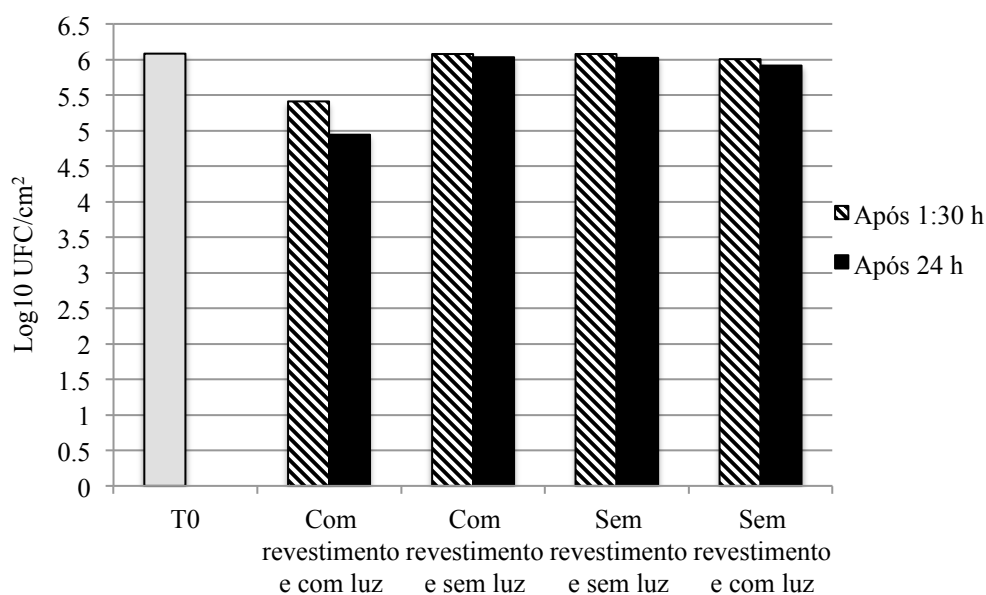
Embora a atividade fotocatalítica já tenha sido referenciada como sendo capaz de matar um grande número de bactérias, tanto Gram-positivo como Gram-negativo, diversos estudos já demonstraram que as bactérias Gram-positivo podem apresentar maior resistência à desinfecção por fotocátalise do que as bactérias Gram-negativo (Kim *et al.*, 2003, Liu and Yang, 2003, Sheel *et al.*, 2008, Skorb *et al.*, 2008). Os dados obtidos sugerem a possibilidade de constatarem esse facto, uma vez que a *P. aeruginosa* apresenta uma maior redução na amostra com revestimento com TiO<sub>2</sub> exposta à luz UV do que o *S. epidermidis*, podendo esta ocorrência estar relacionada com o facto desta bactéria ser um Gram-positivo e possuir uma parede celular com uma camada mais espessa de peptidoglicano sem membrana externa e, por sua vez, *P. aeruginosa* como Gram-negativo, possuir uma parede celular de tripla camada, com uma membrana interna, uma camada mais fina de peptidoglicano e uma membrana externa. Estando, no primeiro caso, a membrana menos vulnerável a danos externos, uma vez que a camada espessa de peptidoglicano pode conferir uma maior proteção à membrana interna da célula (Magalhães *et al.*, 2017).

A revisão bibliográfica, permite concluir que os resultados de estudos para testes da eficácia antibacteriana de sistemas fotocatalítico são variáveis, sendo que, um dos grandes problemas em comparar estudos já realizados sobre a atividade da fotocátalise é não existir um método padronizado para testar a eficácia antimicrobiana destes processos, uma vez que muitas investigações realizam diferentes estudos e ensaios com diferentes meios e condições de testes (Foster *et al.*, 2011).

### 3.2.2. Avaliação da eficácia do sistema fotocatalítico na sobrevivência de biofilmes de *P. aeruginosa* e de *S. epidermidis*

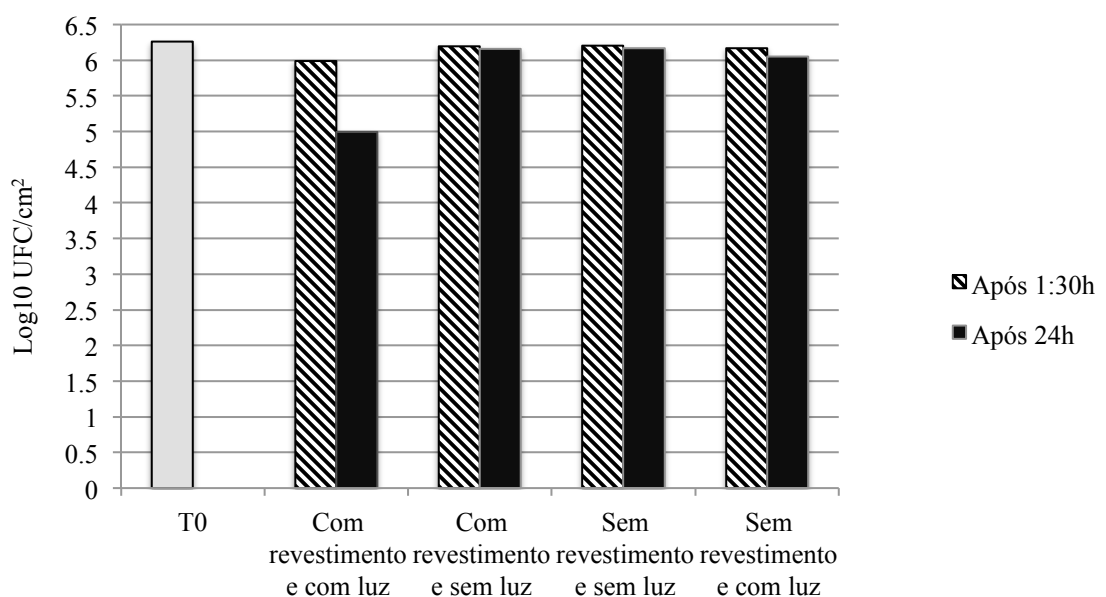
Para além do estudo do efeito da fotocatalise em células plactónicas, pretendeu igualmente testar-se o efeito do sistema em biofilmes e, para isso, induziu-se a formação dos mesmos para ambas as bactérias durante 24 horas sobre as superfícies dos revestimentos. Obteve-se um valor de densidade bacteriana inicial (T0) de 6,1 Log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> e 6,3 Log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> para *S. epidermidis* e para *P. aeruginosa*, respetivamente, e o estudo do impacto do sistema foi testado após 1:30 e 24 horas de tratamento para as duas bactérias.

Os resultados obtidos para *S. epidermidis*, ilustrado na Figura 17, revelam uma redução no número de bactérias de 0,7 Log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> passadas 1:30 horas de tratamento na amostra com revestimento exposta à luz UV, não havendo a ocorrência de nenhuma redução relevante nas demais condições para os dois revestimentos. Decorridas as 24 horas, observa-se um decréscimo ainda mais notório no impacto exercido na densidade bacteriana da amostra submetida à ação da fotocatalise de 1,1 Log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup>, em relação ao valor do controlo. Os valores das restantes amostras submetidas às “condições com revestimento e sem luz”, “sem revestimento e sem luz” e “sem revestimento e com luz” não representam uma redução relevante no final das 24 horas de experiência.



**Figura 17.** Eficácia do sistema fotocatalítico em biofilme de *S. epidermidis* formado nas superfícies dos revestimentos após 1:30 horas e 24 horas nas diferentes condições de tratamento: “com revestimento e com luz”, “com revestimento e sem luz”, “sem revestimento e sem luz” e “sem revestimento e com luz”.

Os dados relativos ao desenvolvimento da variação de *P. aeruginosa* (Figura 18), demonstram que, à semelhança do estudo do crescimento do biofilme de *S. epidermidis*, não se observa a ocorrência de nenhuma redução relevante após 1:30 horas de tratamento para nenhuma condição estudada, contudo, após as 24 horas de tratamento verifica-se uma redução substancial da carga microbiana de 1,3 Log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> na amostra com o revestimento com o TiO<sub>2</sub> e com luz, indicando um efeito causado pelo sistema, mantendo-se os restantes valores praticamente inalterados.



**Figura 18.** Eficácia do sistema fotocatalítico em biofilme de *S. epidermidis* formado nas superfícies dos revestimentos após 1:30 horas e 24 horas nas diferentes condições de tratamento: “com revestimento e com luz”, “com revestimento e sem luz”, “sem revestimento e sem luz”, e “sem revestimento e com luz”.

A análise simultânea da Figura 17 e da Figura 18, permite constatar que 1:30 horas de tratamento não representou tempo suficiente para se obter resultados satisfatórios no decréscimo da densidade bacteriana através do uso do sistema, no entanto, após 24 horas já foi possível verificar uma redução mais relevante.

Comparativamente aos resultados obtidos no estudo anterior, constata-se que as bactérias apresentam maior suscetibilidade ao sistema no estado planctónico do que em biofilme. Esta ocorrência pode estar relacionada com a existência da EPS produzida no biofilme, barreira que protege as células e dificulta a passagem da luz e o seu contacto, assim

como o das células, com o TiO<sub>2</sub>. Este facto apresenta relevância, uma vez que já foi relatado que o contacto próximo entre as bactérias e o TiO<sub>2</sub> aumenta a amplitude do dano oxidativo, e realçada a importância desse contacto uma vez que pode aumentar a permeabilidade da membrana. Foi igualmente demonstrado que a presença da EPS interferiu na desinfeção fotocatalítica de biofilmes de *P. aeruginosa* (Gage et al., 2005, Foster et al., 2011, Dunlop et al., 2010).

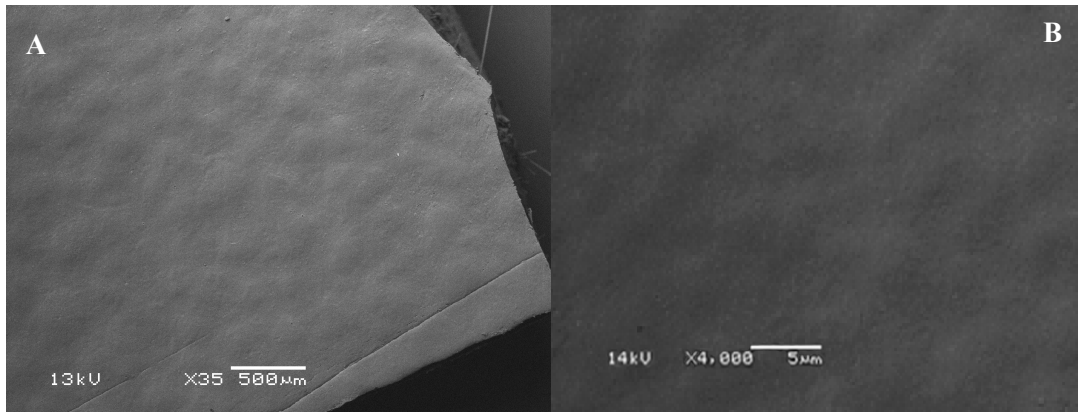
### **3.3. Observação por SEM**

Com o propósito de efetuar a caracterização das superfícies dos revestimentos, e na expectativa de observar o impacto do efeito do sistema na morte e densidade celular tanto das células plactónicas como em biofilme das bactérias testadas, recorreu-se à visualização e análise das amostras por SEM. A análise e seleção das micrografias, foi realizada de forma a que fosse possível obter imagens mais representativas possível do todo de cada amostra. A observação da morfologia superficial de ambos os revestimentos, apenas para caracterização física dos mesmos, foi efetuada sem a inoculação bacteriana, permitindo uma posterior comparação com as superfícies inoculadas.

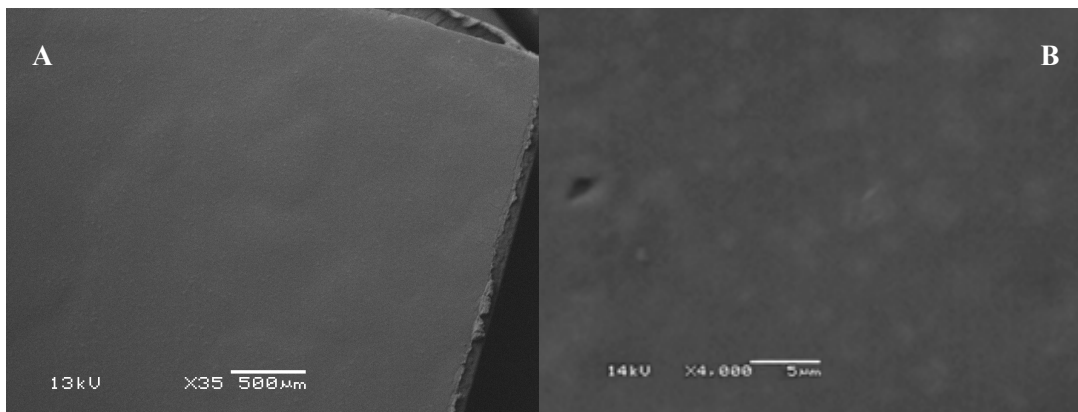
As experiências referidas nos pontos 3.2.1 e 3.2.2, da secção Resultados e Discussão, relativas ao crescimento celular planctónico e de biofilme nas superfícies, respetivamente, foram novamente reproduzidas e visualizadas apenas para 24 horas após os referidos tratamentos, uma vez que os resultados mais relevantes foram obtidos para este tempo. De igual modo, observou-se o crescimento celular planctónico para as quatro condições: com revestimento e com luz, com revestimento e sem luz, sem revestimento e com luz e sem revestimento e com luz e a formação de biofilme foi observada apenas para as condições com revestimento e com luz e sem revestimento e sem luz, dado ao facto dos valores alcançados para estes ensaios, nos estudos anteriormente realizados, permitirem uma análise comparativa mais relevante. As observações foram documentadas através de registo fotográfico para posterior análise das mesmas.

A caracterização da morfologia das superfícies do revestimento com o TiO<sub>2</sub> e do revestimento comum na ampliação de 35x (Figuras 19 e 20), indicam que o revestimento com TiO<sub>2</sub> apresenta uma estrutura mais rugosa enquanto que, por sua vez, a superfície do revestimento sem o TiO<sub>2</sub> apresenta-se mais lisa. Quando analisadas a uma ampliação de

4000x, é possível observar que ambas apresentam uma morfologia bastante similar. Observa-se de igual forma que ambos os revestimentos analisados a uma ampliação de 4000x não apresentam a existência de bactérias, tal como expectável, fator que indica que foram devidamente desinfetados.



**Figura 19.** Observação por SEM da superfície do revestimento incorporado com TiO<sub>2</sub> sem inoculação a uma ampliação 35x (A) e a 4000x (B).

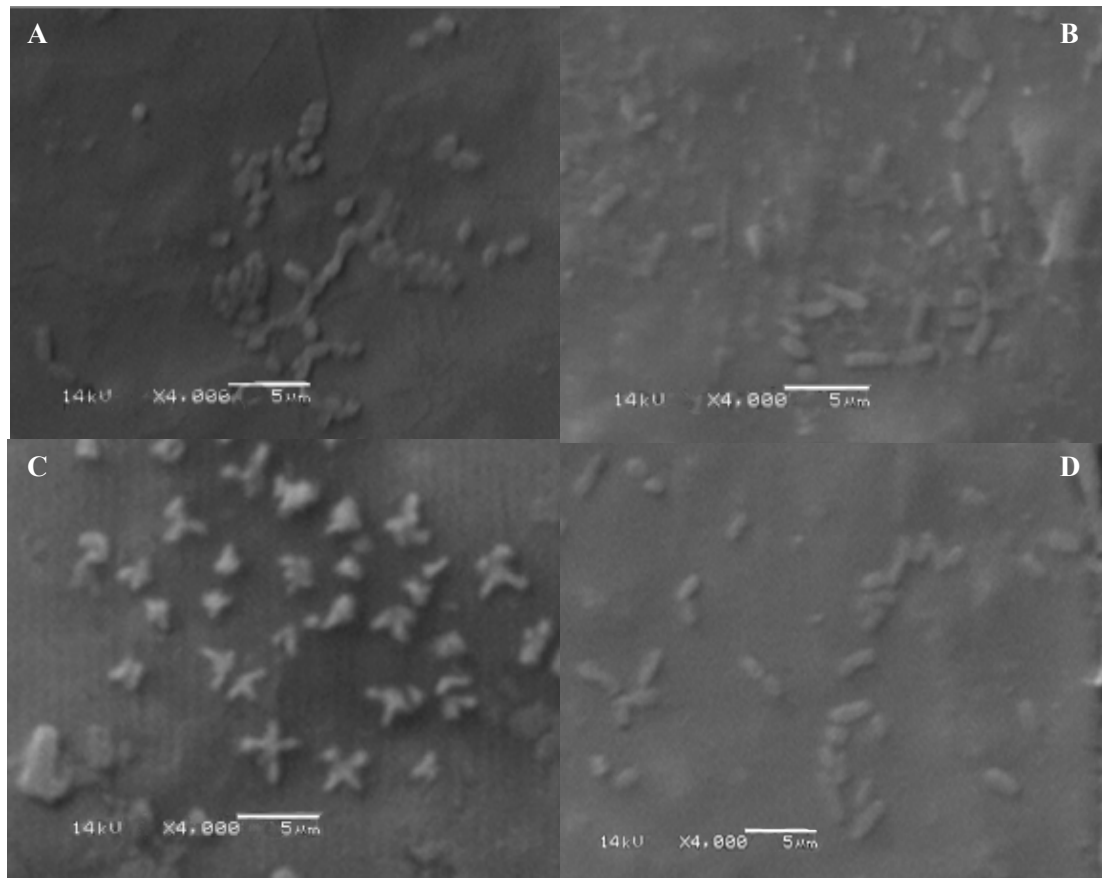


**Figura 20.** Observação por SEM da superfície do revestimento comum, sem o TiO<sub>2</sub> e sem inoculação a uma ampliação 35x (A) e a 4000x (B).

### **3.3.1. Observação do impacto do sistema fotocatalítico na sobrevivência de células planctónicas após 24 horas de tratamento**

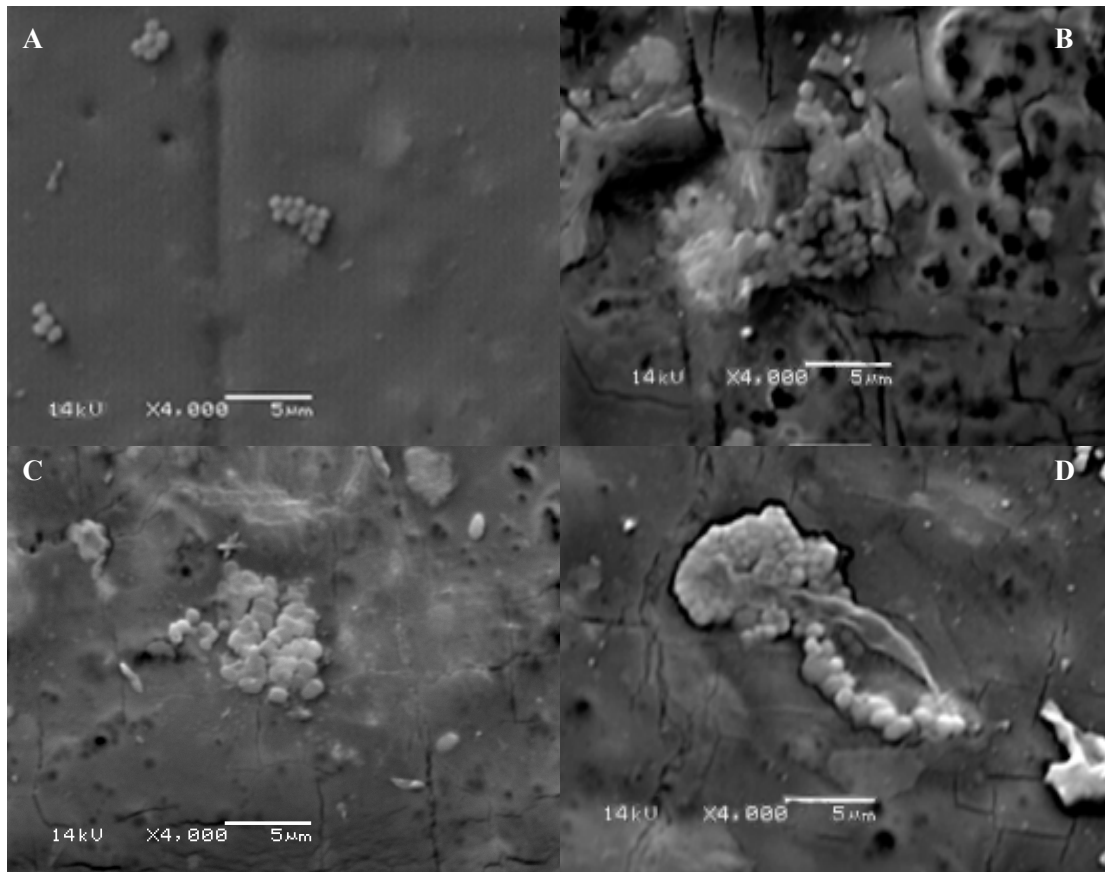
As imagens obtidas por SEM, respetivas à sobrevivência de *P. aeruginosa* durante 24 horas exposta às diferentes condições de estudo (Figura 21), evidenciam a existência de bactérias em forma de bacilos em todas as amostras, assegurando a presença do microrganismo em estudo. Conquanto, não se observa uma diferença notória na densidade bacteriana entre os dois tipos de tratamento de modo a ser possível relacionar com o decréscimo de células obtido nas experiências laboratoriais para as mesmas condições

estudadas, observando-se quantidades semelhantes de bactérias em todas as imagens analisadas.



**Figura 21.** A- Observação por SEM das amostras da sobrevivência de *P. aeruginosa* após 24 horas no revestimento TiO<sub>2</sub> com exposição à luz UV. B- Amostra da sobrevivência de *P. aeruginosa* após 24 horas no revestimento TiO<sub>2</sub> sem exposição à luz UV. C- Amostra da sobrevivência de *P. aeruginosa* após 24 horas no revestimento sem TiO<sub>2</sub> com exposição à luz UV. D- Amostra da sobrevivência de *P. aeruginosa* após 24 horas de exposição no revestimento sem TiO<sub>2</sub> sem exposição à luz UV.

No que respeita à análise dos fragmentos de revestimentos com *S. epidermidis* (Figura 22), constata-se que em todas as amostras é possível visualizar cocos em forma de “cachos” em diferentes quantidades e com diferente dispersão de acordo com a condição de crescimento a que foram submetidos, contrariamente às imagens das amostras de *P. aeruginosa*. A imagem da amostra no revestimento com TiO<sub>2</sub> exposta à luz UV, revela uma quantidade de células inferior e mais dispersas do que as restantes amostras que, por sua vez, apresentam quantidades bastante semelhantes de bactérias e mais aglomeradas sugerindo que, nestas condições, o crescimento bacteriano tenha ocorrido de uma forma mais eficaz, uma vez que não houve a ação da fotocatalise.



**Figura 22.** A- Observação por SEM das amostras da sobrevivência de *S. epidermidis* após 24 horas no revestimento TiO<sub>2</sub> com exposição à luz UV. B- Amostra da sobrevivência de *S. epidermidis* após 24 horas no revestimento TiO<sub>2</sub> sem exposição à luz UV. C- Amostra da sobrevivência de *S. epidermidis* após 24 horas no revestimento sem TiO<sub>2</sub> com exposição à luz UV. D- Amostra da sobrevivência de *S. epidermidis* após 24 horas de exposição no revestimento sem TiO<sub>2</sub> sem exposição à luz UV.

Embora o equipamento de microscopia electrónica de varrimento utilizado não possuísse a resolução para exibir ou realçar pormenores mais detalhados a nível celular, como alterações a nível da membrana ou da parede celular, estudos anteriormente realizados permitiram a visualização de danos causados pela fotocatalise na parede celular de *P. aeruginosa* através de imagens obtidas por SEM (Amezaga-Madrid et al., 2003, Amezaga-Madrid et al., 2002). No entanto, alterações na camada de peptidoglicano podem não ser tão óbvias através das micrografias, uma vez que o peptidoglicano possui uma estrutura altamente reticulada, podendo ocorrer danos consideráveis sem a destruição da sua aparência geral (Foster *et al.*, 2011).

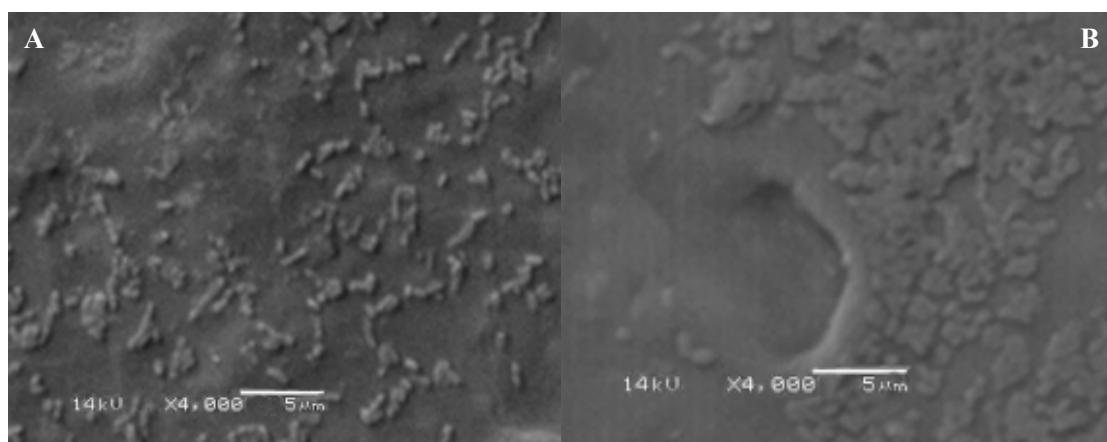
Apesar do resultados obtidos relativamente aos testes realizados no laboratório demonstrarem reduções relevantes após 24 horas de tratamento, estas mesmas diferenças não

foram perceptíveis através da análise por SEM, sobretudo para *P. aeruginosa*, podendo esta ocorrência estar relacionada com o facto de algumas células, apesar de já não se apresentarem viáveis serem, ainda assim, exibidas nas micrografias da superfície do revestimento (Amezaga-Madrid *et al.*, 2002).

### 3.3.2. Observação do impacto do sistema fotocatalítico na sobrevivência de biofilmes após 24 horas de tratamento

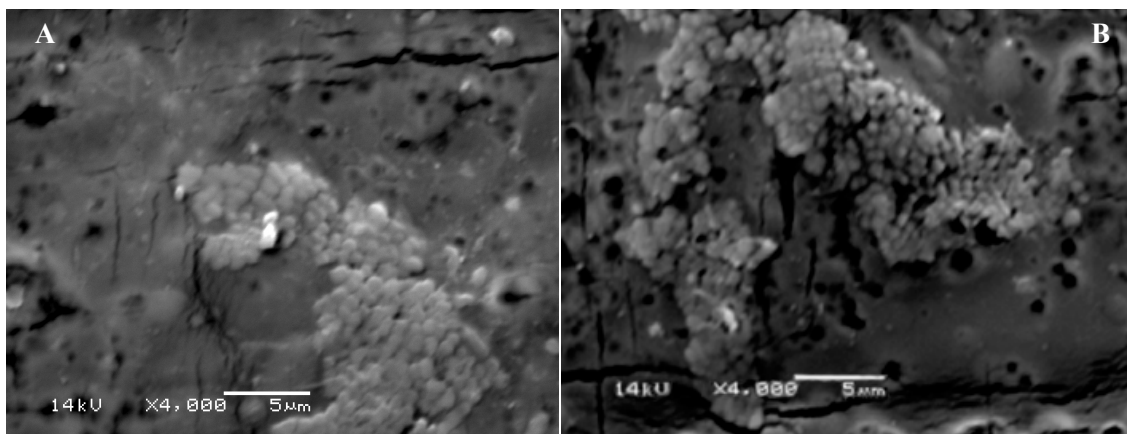
Visto que, como consequência da aplicação de um sistema fotocatalítico com uma possível ação antimicrobiana, a densidade celular e a estrutura da EPS do biofilme pode vir a ser afetada, dado a existir a função de barreira protetora às agressões externas (Gilbert *et al.*, 2002) e, conseqüentemente, a estrutura superficial do biofilme apresentar alterações na sua morfologia, recorreu-se à análise das superfícies por SEM com o intuito de observar as potenciais alterações. As bactérias foram submetidas às condições de tratamento com o revestimento com TiO<sub>2</sub> exposto à luz e sem o revestimento com TiO<sub>2</sub> sem luz durante 24 horas e observadas por SEM.

As micrografias respetivas à formação de biofilme de *P. aeruginosa* nas superfícies dos revestimentos nas duas condições analisadas (Figura 23), não demonstram uma diferença relevante na densidade bacteriana entre cada uma delas. Do mesmo modo, não é perceptível a formação da EPS pelas células, sendo apenas visível a existência de células em forma de bacilos sem a presença de uma camada que evidencie ser a matriz de biofilme.



**Figura 23.** A- Observação por SEM de biofilme de *P. aeruginosa* após 24 horas no revestimento com TiO<sub>2</sub> exposto à luz UV. B- Observação por SEM de biofilme de *P. aeruginosa* após 24 horas no revestimento sem TiO<sub>2</sub> e sem exposição à luz UV.

Contrariamente às imagens de *P. aeruginosa*, as células observadas nas amostras de *S. epidermidis* (Figura 24), apresentam-se mais agregadas e com uma densidade bacteriana nitidamente mais elevada.



**Figura 24.** A- Observação por SEM de biofilme de *S. epidermidis* após 24 horas no revestimento com TiO<sub>2</sub> exposto à luz UV. B- Observação por SEM de biofilme de *S. epidermidis* após 24 horas no revestimento sem TiO<sub>2</sub> e sem exposição à luz UV.

Por outro lado, não é perceptível a presença da EPS nas imagens da Figura 23 nem da Figura 24, conquanto as células observadas nas amostras se encontrem dispostas de uma forma mais agregada e em maior densidade do que nas amostras das células planctónicas registadas na experiência anterior.

#### 4. Conclusões gerais

De atualidade inquestionável e importância indiscutível, os estudos de alternativas ou de apoio à desinfecção às unidades de saúde têm-se vindo a impor como obrigatórios no que toca ao planeamento e aplicação de estratégias eficazes e baixo custo.

O principal objetivo deste trabalho, consistia em estudar a eficácia antimicrobiana do sistema fotocatalítico em superfícies das salas de um hospital. Os resultados obtidos do estudo realizado no hospital, permitiram constatar que o sistema pode ser utilizado não como um substituinte mas sim como um complemento, ou auxílio aos métodos de limpeza convencionais, aumentando a eficácia da limpeza uma vez que pode alcançar locais inatingíveis através da intervenção humana, apresentando-se como um método promissor devido ao seu baixo custo.

A amostragem do ar, não permitiu correlacionar os resultados obtidos com a aplicação do sistema fotocatalítico, uma vez que não ocorreu uma redução linear ou uma diferença relevante entre os valores de UFC/cm<sup>3</sup> registados nas duas salas.

A realização dos testes laboratoriais permitiu concluir que é notório um impacto, ainda que pouco relevante, do sistema fotocatalítico testado nas duas bactérias, no entanto, aparenta demonstrar mais dificuldade em erradicar as bactérias em biofilme do que no estado planctónico. Para além do presente estudo, já foi reportado o impacto exercido pelo sistema fotocatalítico no crescimento celular planctónio e em biofilme, embora as reduções obtidas variem bastante entre estudos já realizados, sendo que a realização de estudos de vários microrganismos e a longo prazo é necessária para resultados mais conclusivos.

Adicionalmente, uma vez que já foi demonstrado que apenas a presença da lâmpada UV pode exercer impacto na morte celular (Muranyi *et al.*, 2010), é relevante estudar como o efeito da lâmpada UV pode de alguma forma influenciar o crescimento microbiano.

## **5. Trabalho Futuro**

Em continuidade à pesquisa da eficácia da fotocatalise seria pertinente a realização de estudos com mais microrganismos com a aplicação de um único protocolo ou norma predefinida que garantisse a utilização dos mesmos meios (tipos de meios e concentração de soluções), assim como o tipo e as características do revestimento, de maneira a ser mais fácil de analisar e equiparar um conjunto de resultados.

A realização do estudo em mais locais com zonas críticas de desinfecção como outras indústrias, como a indústria alimentar, locais de produção de alimentos, salas de espera de urgências de hospitais, podem ser aprofundadas recorrendo a mais tempo de estudo.

## 6. Bibliografia

- AMEZAGA-MADRID, P., NEVÁREZ-MOORILLÓN, G., ORRANTIA-BORUNDA, E. & MIKI-YOSHIDA, M. 2002. Photoinduced bactericidal activity against *Pseudomonas aeruginosa* by TiO<sub>2</sub> based thin films. *FEMS Microbiology Letters*, 211, 183-188.
- AMEZAGA-MADRID, P., SILVEYRA-MORALES, R., CORDOBA-FIERRO, L., NEVAREZ-MOORILLON, G., MIKI-YOSHIDA, M., ORRANTIA-BORUNDA, E. & SOLIS, F. 2003. TEM evidence of ultrastructural alteration on *Pseudomonas aeruginosa* by photocatalytic TiO<sub>2</sub> thin films. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 70, 45-50.
- AMMENDOLIA, M. G., IOSI, F., DE BERARDIS, B., GUCCIONE, G., SUPERTI, F., CONTE, M. P. & LONGHI, C. 2014. *Listeria monocytogenes* behaviour in presence of non-UV-irradiated titanium dioxide nanoparticles. *PLoS One*, 9, e84986.
- ARCIOLA, C. R., CAMPOCCIA, D., GAMBERINI, S., DONATI, M. E., PIRINI, V., VISAI, L., SPEZIALE, P. & MONTANARO, L. 2005. Antibiotic resistance in exopolysaccharide-forming *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates from orthopaedic implant infections. *Biomaterials*, 26, 6530-6535.
- BALCAZAR, J. L., SUBIRATS, J. & BORREGO, C. M. 2015. The role of biofilms as environmental reservoirs of antibiotic resistance. *Front Microbiol*, 6, 1216-1224.
- BHALLA, A., PULTZ, N. J., GRIES, D. M., RAY, A. J., ECKSTEIN, E. C., ARON, D. C. & DONSKEY, C. J. 2004. Acquisition of nosocomial pathogens on hands after contact with environmental surfaces near hospitalized patients. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 25, 164-167.
- BJARNSHOLT, T. & GIVSKOV, M. 2007. Quorum-sensing blockade as a strategy for enhancing host defences against bacterial pathogens. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 362, 1213-22.
- BOYCE, J. M., POTTER-BYNOE, G., CHENEVERT, C. & KING, T. 1997. Environmental contamination due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* possible infection control implications. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 18, 622-627.
- BUTTNER, M. P. & STETZENBACH, L. D. 1993. Monitoring airborne fungal spores in an experimental indoor environment to evaluate sampling methods and the effects of human activity on air sampling. *Applied and environmental microbiology*, 59, 219-226.

- CARP, O. 2004. Photoinduced reactivity of titanium dioxide. *Progress in Solid State Chemistry*, 32, 33-177.
- CHEN, L. & WEN, Y. M. 2011. The role of bacterial biofilm in persistent infections and control strategies. *Int J Oral Sci*, 3, 66-73.
- CZACZYK, K. & MYSZKA, K. 2007. Biosynthesis of extracellular polymeric substances (EPS) and its role in microbial biofilm formation. *Polish Journal of Environmental Studies*, 16, 799-806.
- DAVIES, D. 2003. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov*, 2, 114-22.
- DUNLOP, P., SHEERAN, C., BYRNE, J., MCMAHON, M., BOYLE, M. & MCGUIGAN, K. 2010. Inactivation of clinically relevant pathogens by photocatalytic coatings. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 216, 303-310.
- FARINA, N., SAMUDIO, M., CARPINELLI, L., NENTWICH, M. M. & DE KASPAR, H. M. 2017. Methicillin resistance and biofilm production of *Staphylococcus epidermidis* isolates from infectious and normal flora conjunctiva. *Int Ophthalmol*, 37, 819-825.
- FERNANDES, A. T., FERNANDES, M. O. V., RIBEIRO FILHO, N., GRAZIANO, K. U., CAVALCANTE, N. J. F. & LACERDA, R. A. 2000. Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde. *Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde*.
- FISHER, L., OSTOVAPOUR, S., KELLY, P., WHITEHEAD, K. A., COOKE, K., STORGARDS, E. & VERRAN, J. 2014. Molybdenum doped titanium dioxide photocatalytic coatings for use as hygienic surfaces: the effect of soiling on antimicrobial activity. *Biofouling*, 30, 911-919.
- FLEMMING, H. C. & WINGENDER, J. 2010. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*, 8, 623-633.
- FLEMMING, H. C., WINGENDER, J., SZEWZYK, U., STEINBERG, P., RICE, S. A. & KJELLEBERG, S. 2016. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol*, 14, 563-75.
- FOSTER, H. A., DITTA, I. B., VARGHESE, S. & STEELE, A. 2011. Photocatalytic disinfection using titanium dioxide: spectrum and mechanism of antimicrobial activity. *Applied microbiology and biotechnology*, 90, 1847-1868.
- FUJISHIMA, A., ZHANG, X. & TRYK, D. A. 2008. TiO<sub>2</sub> photocatalysis and related surface phenomena. *Surface Science Reports*, 63, 515-582.

- GAGE, J., ROBERTS, T. & DUFFY, J. E. 2005. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm to UV-A illumination over photocatalytic and non-photocatalytic surfaces. *Biofilms*, 2, 155-163.
- GAMAGE, J. & ZHANG, Z. 2010. Applications of Photocatalytic Disinfection. *International Journal of Photoenergy*, 2010, 1-11.
- GEFFERS, C. & GASTMEIER, P. 2011. Nosocomial infections and multidrug-resistant organisms in Germany: epidemiological data from KISS (the Hospital Infection Surveillance System). *Dtsch Arztebl Int*, 108, 87-93.
- GILBERT, P., MAIRA-LITRAN, T., MCBAIN, A. J., RICKARD, A. H. & WHYTE, F. W. 2002. The physiology and collective recalcitrance of microbial biofilm communities.
- HANAOR, D. A. H. & SORRELL, C. C. 2010. Review of the anatase to rutile phase transformation. *Journal of Materials Science*, 46, 855-874.
- HENRIQUES, A., VASCONCELOS, C. & CERCA, N. 2013. A importância dos biofilmes nas infecções nosocomiais: O estado da arte. *Arquivos de Medicina*, 27, 27-36.
- HOIBY, N., BJARNSHOLT, T., GIVSKOV, M., MOLIN, S. & CIOFU, O. 2010. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents*, 35, 322-32.
- HUANG, Z., MANESS, P.-C., BLAKE, D. M., WOLFRUM, E. J., SMOLINSKI, S. L. & JACOBY, W. A. 2000. Bactericidal mode of titanium dioxide photocatalysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 130, 163-170.
- HUBER, B., EBERL, L., FEUCHT, W. & POLSTER, J. 2003. Influence of polyphenols on bacterial biofilm formation and quorum-sensing. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 58, 879-884.
- JACOBY, W. A., MANESS, P. C., WOLFRUM, E. J., BLAKE, D. M. & FENNELL, J. A. 1998. Mineralization of bacterial cell mass on a photocatalytic surface in air. *Environmental Science & Technology*, 32, 2650-2653.
- JARDIM, D., DIEGUES, P., SANTIAGO, A., MATIAS, P., REIS, V., MATOS, J., ANACLETO, T., CANO, M., NOGUEIRA, A. & CAPUCHO, M. 2015. Metodologia de avaliação da qualidade do ar interior em edifícios de comércio e serviços no âmbito da Portaria 353-A/2013 (versão QAI\_1. 0).
- KIM, B., KIM, D., CHO, D. & CHO, S. 2003. Bactericidal effect of TiO<sub>2</sub> photocatalyst on selected food-borne pathogenic bacteria. *Chemosphere*, 52, 277-281.
- KRAMER, A., SCHWEBKE, I. & KAMPF, G. 2006. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis*, 6, 130-137.

- LAPPIN-SCOTT, H., BURTON, S. & STOODLEY, P. 2014. Revealing a world of biofilms-- the pioneering research of Bill Costerton. *Nat Rev Microbiol*, 12, 781-7.
- LIU, J. W. & CHANG, H. H. 2012. Bactericidal effects and mechanisms of visible light-responsive titanium dioxide photocatalysts on pathogenic bacteria. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 60, 267-75.
- LIU, H.-L. & YANG, T. C. K. 2003. Photocatalytic inactivation of Escherichia coli and Lactobacillus helveticus by ZnO and TiO<sub>2</sub> activated with ultraviolet light. *Process Biochemistry*, 39, 475-481.
- MAGALHÃES, P., ANDRADE, L., NUNES, O. C. & MENDES, A. 2017. Titanium dioxide photocatalysis: fundamentals and application on photoinactivation. *Reviews on Advanced Materials Science*, 51, 91-129.
- MULLER, M. P., MACDOUGALL, C., LIM, M. 2016. Antimicrobial surfaces to prevent healthcare-associated infections: a systematic review. *J Hosp Infect*, 92, 7-13.
- MURANYI, P., SCHRAML, C. & WUNDERLICH, J. 2010. Antimicrobial efficiency of titanium dioxide-coated surfaces. *J Appl Microbiol*, 108, 1966-73.
- OLIVEIRA, N. M., MARTINEZ-GARCIA, E., XAVIER, J., DURHAM, W. M., KOLTER, R., KIM, W. & FOSTER, K. R. 2015. Biofilm Formation As a Response to Ecological Competition. *PLoS Biol*, 13, e1002191.
- PAGE, K., WILSON, M. & PARKIN, I. P. 2009. Antimicrobial surfaces and their potential in reducing the role of the inanimate environment in the incidence of hospital-acquired infections. *Journal of Materials Chemistry*, 19, 3819-3831.
- PEREIRA, R., REIS, D., AMBROSIO JUNIOR, G., RADDI, M. S. G., PEDIGONE, M. & MARTINS, C. 2009. Bioaerossóis bacterianos em um hospital. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 26, 77-81.
- PEREIRA, S. G., MARQUES, M., PEREIRA, J. & CARDOSO, O. 2015. Multidrug and extensive drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a Portuguese central hospital: 10-year survey. *Microb Drug Resist*, 21, 194-200.
- PETROVA, O. E. & SAUER, K. 2016. Escaping the biofilm in more than one way: desorption, detachment or dispersion. *Curr Opin Microbiol*, 30, 67-78.
- PINA, E., FERREIRA, E., MARQUES, A. & MATOS, B. 2010. Infecções associadas aos cuidados de saúde e segurança do doente. *Rev Port Saúde Pública*, 10, 27-39.
- ROHDE, H., BURANDT, E. C., SIEMSEN, N., FROMMELT, L., BURDELSKI, C., WURSTER, S., SCHERPE, S., DAVIES, A. P., HARRIS, L. G. & HORSTKOTTE, M. A. 2007. Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm

- accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials*, 28, 1711-1720.
- RUTHERFORD, S. T. & BASSLER, B. L. 2012. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2.
- SANCHEZ-VIZUETE, P., ORGAZ, B., AYMERICH, S., LE COQ, D. & BRIANDET, R. 2015. Pathogens protection against the action of disinfectants in multispecies biofilms. *Front Microbiol*, 6, 705-706.
- SARASWATHI, P. & BEUERMAN, R. W. 2015. Corneal biofilms: from planktonic to microcolony formation in an experimental keratitis infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *The ocular surface*, 13, 331-345.
- SHEEL, D. W., BROOK, L. A., DITTA, I. B., EVANS, P., FOSTER, H. A., STEELE, A. & YATES, H. M. 2008. Biocidal Silver and Silver/Titania Composite Films Grown by Chemical Vapour Deposition. *International Journal of Photoenergy*, 2008, 1-11.
- SKORB, E. V., ANTONOUSKAYA, L. I., BELYASOVA, N. A., SHCHUKIN, D. G., MÖHWALD, H. & SVIRIDOV, D. V. 2008. Antibacterial activity of thin-film photocatalysts based on metal-modified TiO<sup>2</sup> and TiO<sup>2</sup>:In<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanocomposite. *Applied Catalysis B: Environmental*, 84, 94-99.
- STEWART, E. J., GANESAN, M., YOUNGER, J. G. & SOLOMON, M. J. 2015. Artificial biofilms establish the role of matrix interactions in staphylococcal biofilm assembly and disassembly. *Sci Rep*, 5, 13081-13094.
- SUTHERLAND, I. W. 2001. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, 147, 3-9.
- TUTAR, U., ÇELİK, C., ATAŞ, M., TUNÇ, T. & GÖZEL, M. G. 2015. Evaluation of biofilm formation activity of standard microorganism strains. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 6-11.
- UPPULURI, P. & LOPEZ-RIBOT, J. L. 2016. Go Forth and Colonize: Dispersal from Clinically Important Microbial Biofilms. *PLoS Pathog*, 12, e1005397.
- VUONG, C., GERKE, C., SOMERVILLE, G. A., FISCHER, E. R. & OTTO, M. 2003. Quorum-sensing control of biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis*. *The Journal of infectious diseases*, 188, 706-718.
- XIA, J., GAO, J. & TANG, W. 2016. Nosocomial infection and its molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Biosci Trends*, 10, 14-21.