



Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Manuela Pimenta Caçador

**Controlo de Biofilmes Indesejáveis
– Utilização de Biocidas em Meios
Hospitalares**



Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Manuela Pimenta Caçador

**Controlo de Biofilmes Indesejáveis
– Utilização de Biocidas em Meios
Hospitalares**

Mestrado em Biotecnologia

Trabalho efectuado sob a orientação da
Doutora Maria João Vieira
e co-orientação da
Doutora Maria Olívia Pereira

Maio de 2009

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE, APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE

Universidade do Minho, ___/___/_____

Assinatura: _____

PREÂMBULO

Durante os meses que dediquei à realização deste trabalho, conheci muitas pessoas, fiz muita pesquisa bibliográfica, visitei locais, tirei milhares de fotografias e, naturalmente... senti dificuldades que se foram dissipando ao longo do tempo e lentamente... o medo transformou-se num sorriso.

Hoje sinto-me bem pelo trabalho que realizei, por ter enriquecido os meus conhecimentos e ter provado a mim mesma que vale a pena arriscar e aceitar os desafios. Agora estou consciente que para descobrir o saber é necessário ter garra como o meu pai, pedreiro de profissão e por opção, que consegue transformar pedras em arte por artes e com artes... “partir pedra” é uma das tarefas de um investigador, descobrir as veias preciosas como minha mãe faz para descobrir as palavras de amor nos momentos difíceis...

Como uma mãe também recordo outro alguém, que me deu apoio incondicional, estímulo e paciência e que carinhosamente solidificou com os seus sábios conselhos e saberes este trabalho... sem dúvida um trabalho que tenho de partilhar com a Doutora Maria João Vieira, minha orientadora profissional e quantas vezes pessoal.

Mas esta tese é uma tarefa partilhada, como diria a Doutora Olívia Pereira, que tantas vezes me ajudou a reflectir a melhor maneira de ultrapassar alguns obstáculos que foram aparecendo. Agradeço-lhe também todos os caminhos, ruas e ruelas que segui no desenvolvimento deste trabalho.

Fernando Pessoa dizia que o Homem sonhava e a obra nascia, pois Deus quis que a minha obra nascesse no meio do Grupo de Biofilmes, homens e mulheres sonhadores que espero eternamente ter do meu lado como amigos...com eles também aprendi que há companheiros que vão mas lembranças que ficam...

E se há trabalhos que são feitos em várias terras, este foi um e não seria justo não lembrar Vila Verde e a minha terra, Ponte de Lima. Agradeço do fundo do coração a todos os meus amigos pelo trabalho, dedicação e a paciência que tiveram comigo. Sem citar mais nomes porque poderei esquecer alguns, agradeço a todos os que me ajudaram de alguma forma, e cada um deles sabe o quanto eu serei grata.

E agora... Mãos à obra, que o tempo urge...

RESUMO

Os biofilmes, comunidades de microrganismos aderidos a superfícies, usualmente envolvidos numa matriz de substâncias poliméricas extracelulares, são agora tema de grande interesse, não só na área da engenharia mas, também, na área da saúde. Por exemplo, na área da medicina a presença de células aderidas nos instrumentos médicos pode ser um grave problema uma vez que uma pequena contaminação bacteriológica requer uma desinfecção rápida e adequada de forma a evitar a contaminação cruzada. Surge, então, a necessidade de desenvolver estratégias de controlo dos microrganismos de modo a reduzir ou eliminar este problema. Para tal, recorre-se, frequentemente, à utilização de desinfectantes.

O objectivo do trabalho apresentado centrou-se numa avaliação do efeito antimicrobiano do biocida comercial OPA Cidex (Johnson&Johnson), cujo princípio activo é o orto-ftalaldeído (OPA) a 0.55 % (p/v), na viabilidade de suspensões bacterianas e células aderidas de *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus epidermidis* a superfícies de aço inoxidável. Este biocida começa a ser de uso bastante frequente a nível hospitalar para controlar infecções nosocomiais. O efeito do biocida foi estudado em função da concentração, do tempo de contacto das bactérias com o biocida e da presença e concentração de uma substância interferente (Albumina de Soro Bovino-BSA). O efeito antimicrobiano do OPA foi avaliado pela quantificação da percentagem de sobrevivência das células, obtida pela determinação da viabilidade celular *in situ*, usando o corante específico de viabilidade celular Live/Dead. Para efeitos comparativos, para cada variável estudada foram determinadas as concentrações mínimas bactericidas (MBC) de OPA.

A aplicação do OPA a suspensões bacterianas e células aderidas de *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. epidermidis* provocou uma redução na percentagem de sobrevivência celular. Esta redução foi verificada para todas as concentrações estudadas e dependente do aumento da concentração de OPA. Apesar de se verificar, em células em suspensão, valores de sobrevivência nula para valores de concentração elevados de biocida tal não é sempre verificado quando as células estavam aderidas ao aço. Saliente-se que, para algumas bactérias, a aplicação da máxima concentração de biocida disponível não é suficiente para se inviabilizar todas as bactérias aderidas. Esta constatação é mais notória na presença de BSA aquando da adesão das bactérias ao aço. Para baixas concentrações de biocida a sua acção antimicrobiana em células aderidas de *P. fluorescens* intensifica-se com o aumento do tempo de contacto das bactérias com o biocida.

Com este estudo concluiu-se que o efeito do biocida depende da bactéria sobre a qual está a exercer a sua acção antimicrobiana, não se verificando maior actividade do biocida em bactérias gram-positivas. Também se constatou que a eficiência do OPA é muito dependente do estado da bactéria - sésil ou plantónica - e da presença de matéria orgânica. Consequentemente, a acção de um biocida não pode ser só caracterizada e generalizada por um só valor de MBC.

Biofilms are a subject of great interest, not only in engineering but also in medicine. As far as medicine is concerned, the presence of adhered microorganisms on medical devices can be a severe problem because even a slight bacterial contamination requires its disinfection in order to prevent the subsequent infection of patients in contact with those devices. In this context, the need to develop suitable strategies for the cleaning and disinfection is of great importance in order to reduce or eliminate this problem. For this purpose, biocide (chemical compounds with antimicrobial properties) application is often a common practise.

The objective of this work comprised the evaluation of the efficacy of a biocide, ortho-phthalaldehyde (OPA), on the viability of bacterial suspensions and adhered cells of *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. epidermidis* to stainless steel surfaces. The OPA antimicrobial effect was studied as a function of biocide concentration, biocide contact time to bacteria and the presence of interfering substances (BSA). It must be emphasised that OPA has been used in the hospital area to disinfect medical devices but there was the need to make a systematic study of the effect of the biocide on different species adhered to surfaces. The evaluation of the antimicrobial effect of this biocide comprised the determination of survival percentage, trough the determination of the cells viability, before and after the addition of the biocidal agent. Conversely to other studies, the cellular viability was assessed *in-situ* by means of the use of fluorescent compounds, in detriment to the conventional methods of removing the cells from the surfaces and subsequent culture on solid media.

The application of OPA to the *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *E. coli* and *S. epidermidis* suspended cultures and to the adhered cells to stainless steel surfaces, caused a reduction on the viability of those bacteria. The increase on OPA concentration applied to the bacterial cells decreases the cellular survival percentage. It was even observed no survival when higher OPA concentrations were applied. The antimicrobial action of OPA increased with the contact time of the biocide with the bacteria. The efficacy of OPA is diminished in the presence of organic matter, such BSA. The inhibition of the antimicrobial action of OPA increases with the increase of BSA concentration.

For this biocide, it can be concluded that, for the same biocide contact time, the same bacterial concentration and the same biocide concentration, the adhered cells of *E. coli* are more resistant, compared with *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* and *S. epidermidis*.

ÍNDICE

1. Introdução	1
1.1 Enquadramento do trabalho.....	2
1.2 Objectivos	3
1.3 Organização do trabalho	4
2. Fundamentos teóricos	5
2.1 Formação de biofilme e adesão Microbiana.....	6
2.1.1 Etapas de formação de um biofilme.	6
2.1.2 Factores que influenciam a adesão microbiana	8
2.1.3 Influência das proteínas na adesão bacteriana.....	12
2.1.4 Problemas associados com a formação de Biofilmes.....	13
2.2 Métodos de avaliação de células aderidas.....	14
2.2.1 Técnicas de determinação do número de microrganismos aderidos	14
2.2.2 Métodos de contagem directa	15
2.3 Controlo de células aderidas e de biofilmes	18
2.3.1 Introdução	18
2.3.2 Breve resenha histórica da aplicação dos desinfectantes.....	19
2.3.3 Critérios de escolha dos biocidas.....	20
2.3.4 Classificação dos biocidas	20
2.3.5 Mecanismo de acção dos biocidas.....	24
2.3.6 Mecanismo de acção do OPA e do GTA.....	26
2.3.7 Testes de desinfectantes: testes de biocidas em células em suspensão	28
2.3.8 Parâmetros que afectam a eficiência do biocida.....	30
2.3.9 Desinfecção hospitalar.....	33
3. Materiais e Métodos	36
3.1 Microrganismos.....	37
3.1.1 Selecção de Microrganismos	37
3.1.2 Modo de preservação dos microrganismos	39
3.1.3 Meios de cultura	39
3.1.4 Preparação da cultura de células de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	40
3.1.5 Preparação das culturas de células de <i>E. coli</i> , <i>S. epidermidis</i> e <i>P. aeruginosa</i>	41
3.2 Testes de adesão estática.....	41
3.2.1 Preparação das placas de adesão	41
3.2.2 Adesão estática bacteriana às placas	42
3.2.3 Protocolos de lavagem e de coloração das células aderidas para avaliação das células totais e viáveis	43
3.3 Testes de desinfecção com células aderidas	43
3.3.1 Biocida.....	44
3.3.2 Efeito da variação da concentração de OPA	44

3.3.3	Efeito do tempo de exposição ao OPA.....	44
3.3.4	Efeito da presença de substâncias interferentes na acção do OPA.....	45
3.3.5	Avaliação da percentagem de sobrevivência de células aderidas.....	45
3.4	<i>Testes de desinfeção com células em suspensão</i>	46
3.4.1	Protocolo dos testes de desinfeção realizados com células em suspensão	46
3.4.2	Teste de desinfeção realizados com células em suspensão na presença de BSA.....	46
3.4.3	Avaliação da percentagem de sobrevivência de células em suspensão.....	47
3.4.4	Cálculo da Concentração mínima bactericida	47
3.5	<i>Quantificação do número de células por análise de imagem</i>	47
3.6	<i>Métodos estatísticos</i>	49
4.	Resultados e Discussão	50
4.1	<i>Introdução</i>	51
4.2	<i>Adesão estática de células microbianas a aço inoxidável</i>	51
4.2.1	Adesão de <i>P. fluorescens</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> e <i>S.epidermidis</i> a aço inoxidável	51
4.2.2	Efeito da BSA na adesão das bactérias a aço inoxidável	53
4.3	<i>Ensaio de desinfeção com células em suspensão</i>	56
4.4	<i>Ensaio de desinfeção com células aderidas</i>	59
4.4.1	Influência da concentração do biocida	59
4.4.2	Efeito de substâncias interferentes na eficácia do biocida	67
4.4.3	Comparação da acção do OPA na ausência e na presença de BSA	76
4.5	<i>Avaliação do efeito do tempo de contacto na eficácia do biocida</i>	81
5.	Conclusões e perspectivas de trabalho	83
5.1	<i>Conclusões</i>	84
5.2	<i>Sugestões para o trabalho futuro</i>	85
6.	Bibliografia	86

SIMBOLOGIA

ACD	Ácidos orgânicos e parabenos
ACR	Acridinas
AODC	Acridina
ATCC	American Type Culture Collections
BOP	Bronopol
BSA	Albumina de soro bovino
CHA	Clorohexidina
CNS	Coagulase-negativo <i>Staphylococci</i>
CRAs	Agentes libertadores de cloro
CTC	5-CYANO-2,3-ditytolyl tetrazolium
DAPI	4, 6-diadimino-2-fenilindole
DMSO	Dimetilsulfoxido anidro
ETO	Óxido de etileno
FMA	Formaldeído
GTA	Glutaraldeído
HCP	Hexaclorofano
HBV	Vírus da hepatite B
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HOP	Peróxido de hidrogénio
IOD	Iodo e iodoforos
INT	2-(<i>p</i> -iodofenil)-3-(<i>p</i> -nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride
IST	Isotiazolona
L/D	Live-Dead® BacLigth™ Bacterial Viability Kit
MBC	Concentração Mínima Bactericida
OPA	Orto-ftalaldeído
PBS	Tampão fosfato salino

PHE	Fenóis
POP	Propiolactona
QACs	Compostos quaternários de amónia.
Rpm	Rotações por minuto
TSB	Tryptic soy broth

1. INTRODUÇÃO

Sumário

Neste primeiro capítulo pretende-se situar o leitor no tema desta dissertação. Sucintamente, introduz-se o conceito de biofilme, o tema da formação e controlo de biofilmes e apresenta-se o contexto do trabalho realizado. Referem-se ainda os principais objectivos deste trabalho e finalmente descreve-se a estrutura da dissertação.

<i>1.1</i>	<i>Enquadramento do trabalho.....</i>	<i>2</i>
<i>1.2</i>	<i>Objectivos</i>	<i>3</i>
<i>1.3</i>	<i>Organização do trabalho</i>	<i>4</i>

1.1 ENQUADRAMENTO DO TRABALHO

A investigação científica procede-se sempre num ciclo, que começa com um estudo exploratório do desconhecido no qual se observa um comportamento e para o qual se propõe uma explicação para a observação feita.

Essa hipótese, que o desejo tenta transformar numa teoria, determina a experiência que irá decorrer. E, tal como na preparação de um banquete se procede à escolha da ementa, a primeira pergunta na investigação será: o que se vai testar?

Depois da escolha da resposta à primeira pergunta, milhares de perguntas se seguirão. E o procedimento experimental deverá determinar se a explicação se vai adequar à hipótese proposta. A validade e a aplicabilidade dessa mesma hipótese devem ainda ser confirmadas por novos testes (Cristensen *et al.*, 2000).

Ao longo deste trabalho, cada estágio da investigação científica ditou a planificação da experiência. O passo que se seguiu foi de confirmação e novamente um novo teste. Procurou-se, então, colocar milhões de perguntas, descobrir qual a pergunta a fazer e testar cada hipótese que foi surgindo.

Sendo este um trabalho na área das Ciências Biológicas, seria impensável separá-lo da colonização por microrganismos. Tal como é impossível separar os microrganismos de qualquer objecto identificado do nosso universo. Fala-se de bactérias em todas as áreas, desde a indústria química pesada à biomedicina. Essenciais numas áreas, conseguem ser terrivelmente devastadoras noutras, dando grandes dores de cabeça a alguns génios nos dias que correm (Reid, 2000).

Nada de novo, se se pensar que já as avós ferviam a água para que a saúde dos netinhos não fosse afectada. Se, a este facto, se juntar o conhecimento de todas as doenças transmitidas que têm como vector a água de redes de distribuição, facilmente se compreende que algumas pessoas se arrepiem com o desenvolvimento de biofilmes.

Biofilmes são películas gelatinosas muito hidratadas constituídas por células microbianas immobilizadas numa superfície e frequentemente embebidas numa matriz constituída por substâncias poliméricas extracelulares produzidas pelos microrganismos. Esta rede polimérica protege os microrganismos de agressões externas, nomeadamente do efeito de

agentes químicos, mas, também dificulta o acesso de nutrientes aos microrganismos imobilizados.

Os biofilmes típicos são estruturas complexas. Porém, também se consideram biofilmes estruturas menos complexas onde ocorre unicamente a adesão de células microbianas a superfícies.

Excluindo deste estudo os biofilmes formados com o intuito de desempenhar uma função benéfica como, por exemplo, tratamento de água residuais, a atenção será focada nos biofilmes em que a sua ocorrência constitui um grave problema, pois afecta a saúde humana, nomeadamente quando associada a implantes e instrumentos médicos, superfícies da indústria alimentar, superfícies em contacto com água potável, entre outras.

Daí, a necessidade do estudo do controlo dos biofilmes e de células aderidas a superfícies, incidindo este trabalho numa área que afecta directamente a saúde humana: desinfeção de instrumentos médicos. De facto, se os instrumentos médicos não forem convenientemente desinfectados pode ocorrer a contaminação cruzada de pacientes.

1.2 OBJECTIVOS

O objectivo deste trabalho foi avaliar, *in situ*, a capacidade de desinfeção de um biocida, o orto-ftalaldeído (OPA), utilizado, presentemente em ambientes hospitalares, com a finalidade de desinfectar instrumentos médicos, em substituição do tradicional glutaraldeído (GTA).

O efeito do biocida foi estudado com quatro estirpes bacterianas, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli* em suspensão e aderidas a superfícies de aço inoxidável 316.

O trabalho desenvolvido incluiu:

- Optimização do tempo de adesão da bactéria à superfície;
- Testes de fluorocromos para visualização das células totais, células vivas e células mortas aderidas à superfície;
- Avaliação do efeito da concentração de biocida no número de células presentes na superfície e na percentagem de morte celular;
- Avaliação do tempo de contacto de biocida no número de células presentes na superfície e de percentagem de morte celular;

- Influência da presença de substâncias interferentes, nomeadamente proteínas, na eficácia do biocida.

1.3 ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO

A tese encontra-se dividida em cinco Capítulos principais.

Neste **1º Capítulo** pretende-se orientar o leitor para o tema do trabalho, descrever os objectivos gerais da dissertação, bem como, o modo como este foi organizado.

No **Capítulo 2** são apresentados os fundamentos teóricos. Apresenta-se uma pequena revisão bibliográfica sobre a adesão microbiana e a sua relevância na formação de biofilmes e seu controlo. Descreve-se, sucintamente, os métodos de contagem de microrganismos aderidos a superfícies, apresentando-se vantagens e desvantagens de cada um. Também se revela a ponderação efectuada, bem como, a reflexão que levou à escolha do método de enumeração de bactérias adoptado neste trabalho. Efectua-se, ainda, um resumo sobre a desinfecção, a classificação dos biocidas, bem como as suas características. Dá-se um enfoque especial ao orto-ftalaldeído, OPA, o desinfectante testado no decurso do trabalho e faz-se a sua comparação com o glutaraldeído.

No **3º Capítulo** faz-se uma descrição do trabalho experimental efectuado, nomeadamente das metodologias utilizadas para o crescimento, adesão, aplicação do biocida e enumeração dos microrganismos, para cada bactéria testada.

Depois de todo o procedimento experimental chega-se à apresentação dos resultados obtidos no **Capítulo 4**. Neste Capítulo faz-se ainda a discussão desses resultados obtidos.

No **Capítulo 5** faz-se uma síntese das principais conclusões resultantes do trabalho experimental realizado no domínio desta dissertação e apresentam-se algumas sugestões para trabalho futuro.

2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Sumário

O início deste Capítulo constitui uma breve revisão bibliográfica sobre a adesão de bactérias a superfícies. A enumeração e a avaliação da viabilidade de microrganismos são assuntos de primordial importância no estudo da avaliação da eficácia de desinfetantes. Assim, também se abordam os métodos directos de avaliação de células e da sua viabilidade uma vez que estes oferecem maior grau de confiança. Introduce-se um estudo de comparação de reagentes fluorescentes para o fim referido, recorrendo-se à microscopia de epifluorescência para a observação da superfície colonizada com os microrganismos.

Na última secção apontam-se os principais métodos de controlo de células aderidas e de biofilmes. Destes, os métodos químicos são os mais realçados, nomeadamente o uso de desinfetantes. Os aspectos relacionados com a utilização dos biocidas são também referidos. O orto-ftalaldeído, por ter sido utilizado no âmbito deste trabalho, é descrito com maior detalhe.

2.1	<i>Formação de biofilme e adesão Microbiana.....</i>	<i>6</i>
2.2	<i>Métodos de avaliação de células aderidas.....</i>	<i>14</i>
2.3	<i>Controlo de células aderidas e de biofilmes</i>	<i>18</i>

2.1 FORMAÇÃO DE BIOFILME E ADESÃO MICROBIANA

Um **biofilme** pode ser definido como uma matriz polimérica de aspecto gelatinoso, aderida a uma superfície sólida, quase sempre imersa em meio líquido, constituída essencialmente por microrganismos, pelas substâncias poliméricas extracelulares que estes excretam e por água.

2.1.1 Etapas de formação de um biofilme.

As bactérias crescem, preferencialmente, em superfícies do que em suspensão numa fase aquosa (An *et al.*, 2000). A formação de um biofilme numa superfície envolve as etapas seguintes: formação do filme condicionador, adesão reversível à superfície, adesão irreversível, crescimento na superfície, libertação de microrganismos ou bocados de biofilme, como se representa na Figura 2.1.

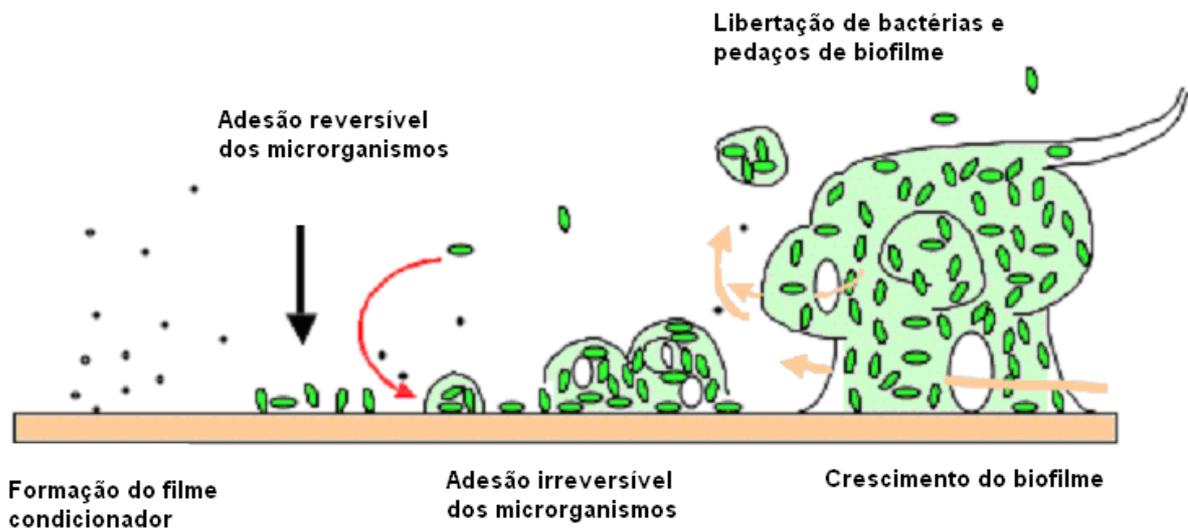


Figura 2.1 – Esquema das etapas de formação do biofilme: formação do filme condicionador, adesão reversível, adesão irreversível e crescimento do biofilme.

Durante a primeira etapa, a etapa de formação do filme condicionador, a superfície é coberta com uma camada de pequenas moléculas orgânicas, como proteínas, que estão presentes no meio aquoso circundante (Sisson *et al.*, 2000).

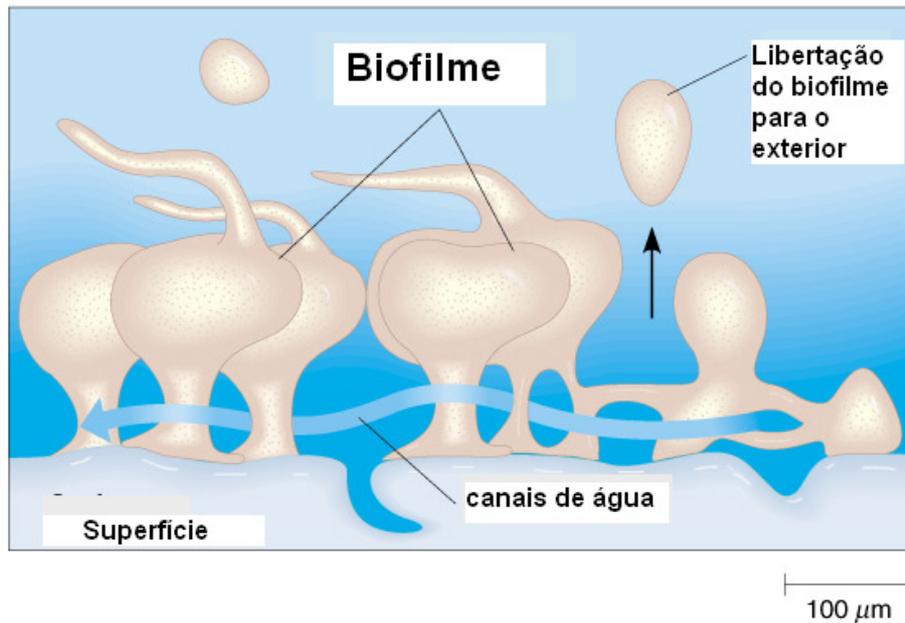
A segunda etapa é caracterizada pela adesão reversível de microrganismos à superfície. Os microrganismos chegam por motilidade, sedimentação e dispersão. Também podem agregar-se uns aos outros formando agregados microbianos antes de aderirem à superfície do filme condicionador. Como os microrganismos aderem ao filme condicionador e não à superfície em si, a formação do biofilme inicial depende da estrutura do filme condicionador (Dalton *et al.*, 2000; Sissons *et al.*, 2000).

A adesão inicial reversível torna-se irreversível, sobretudo pela excreção pelos microrganismos de substâncias poliméricas (terceira etapa). A adesão de bactérias a superfícies sólidas pode, assim, ser descrita como um processo de duas fases: a inicial e instantânea (fase reversível) e uma fase dependente do tempo (fase irreversível) (An *et al.*, 2000; Boland *et al.*, 2000).

Uma vez aderidas à superfície, espécies como *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, reproduzem-se e excretam substâncias poliméricas extracelulares formando um biofilme – quarta etapa (Boland *et al.*, 2000; Sisson *et al.*, 2000; Das *et al.*, 1998). Muitas outras espécies bacterianas são referenciadas como produtoras de biofilmes incluindo *Salmonella* spp. (Joseph *et al.*, 2001), *Escherihia coli* (Das *et al.*, 1998), *Pseudomonas aeruginosa* (Tattawasart *et al.*, 1999; Diehl e Chapman, 1999), *Klesiella pneumoniae* (Srinivasan *et al.*, 1995; Diehl e Chapman, 1999), *Pseudomonas fluorescens* (Vieira *et al.*, 1993, Hsueh *et al.*, 1998) e *Pseudomonas stutzeri* (Tattawasart *et al.*, 1999).

Finalmente, considera-se como última etapa quando ocorre a libertação de microrganismos ou pedaços de biofilme para o meio circundante.

A estrutura final e a composição do biofilme (Figura 2.2) são determinadas pelas características do sistema onde foi desenvolvido. Propriedades como o tipo de microrganismos, o ambiente hidrodinâmico, a rugosidade da superfície, os nutrientes disponíveis, a adesão e atracção a outros microrganismos do meio circundante, são consideradas importantes na formação do biofilme (Boland *et al.*, 2000; Dalton *et al.*, 2000; Sissons *et al.*, 2000; Vieira *et al.*, 1993; Merritt e An, 2000; Flemming, 1991). Por exemplo, na ausência de nutrientes, a reprodução microbiana e a excreção de substâncias poliméricas extracelulares é muito pequena.



Copyright © 2001 Benjamin Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, Inc.

Figura 2.2 – Esquema de um biofilme. (adaptado de homepage.smc.edu/environmentalMicro.htm)

É enorme a diversidade de espécies microbianas que podem estar presentes nos biofilmes, quer nos *habitats* naturais, quer nos criados pelo homem. Microalgas, fungos protozoários, bactérias e vírus são microrganismos frequentemente encontrados, ainda que sejam as células bacterianas a predominar. A sua maior versatilidade e resistência, os seus tamanhos reduzidos, as elevadas taxas de reprodução, a grande capacidade de adaptação e de produção de substâncias e estruturas extracelulares que as protegem do meio circundante, são as principais características que fazem das bactérias excelentes organismos produtores de biofilme (Pereira, 2001). *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* e *Staphylococcus*, são os géneros mais comuns de bactérias produtoras de biofilme (Mattila-Sandholm e Wirtanen, 1992; Wirtanen, 1995).

2.1.2 Factores que influenciam a adesão microbiana

Superfícies materiais

Os factores que influenciam a adesão bacteriana às superfícies incluem a composição química dos materiais de adesão, a carga superficial, a hidrofobicidade, a rugosidade e a configuração física. Além disso, a energia da superfície influencia os sítios de adesão vazios, que se podem alterar mudando as características hidrofílicas e hidrofóbicas com a adesão ou a aderência de soros proteícos.

É crucial na avaliação de efeitos de modificação das superfícies materiais conhecer-se a natureza da superfície das bactérias encontradas. Sabe-se que o pré-tratamento da superfície, especialmente com soluções proteicas, vai decrescer a adesão de bactérias (Merritt e An, 2000).

Composição química da superfície

Segundo alguns estudos, existe uma relação directa entre a adesão da estirpe bacteriana e a composição química da superfície de adesão. De acordo com Merritt e An (2000), *Staphylococcus epidermidis* aderem preferencialmente a polímeros, contrariamente a *S.aureus* que aderem predominantemente a metais. Isto pode explicar o facto das infecções por *S.epidermidis* estarem associadas com implantes poliméricos enquanto que o *S. aureus* é, normalmente, o patogénico associado a infecções em implantes metálicos (Merritt and An, 2000). Mais recentemente, é referido que o *Staphylococcus epidermidis* adere melhor à hidroxiapatite do que a outros materiais (Merritt e An, 2000; Reid, 2000; An *et al.*, 2000).

Rugosidade superficial

A rugosidade superficial é um parâmetro bidimensional de uma superfície que representa a distância medida entre os picos e os vales na superfície e não a configuração morfológica da superfície.

Vários estudos mostraram que superfícies com maior rugosidade apresentam maior adesão de microrganismos (Meritt e An, 2000). As causas deste fenómeno podem dever-se à maior área superficial da superfície rugosa ou às depressões nas mesmas que proporcionam mais sítios favoráveis para a colonização (Figura 2.3) (Branes *et al.*, 1999). No entanto, curiosamente, um estudo recente de Merritt e An (2000) mostra que uma modificação na rugosidade de titânio comercial não altera o número de células aderidas de *Staphylococcus epidermidis*.



Figura 2.3 – Fotografia ilustrativa da adesão preferencial de *Listeria monocytogenes* às rugosidades de uma superfície de aço inoxidável (adaptado de ASM MicrobeLibrary)

Como as diferentes próteses clínicas, instrumentos médicos e materiais de implante têm diferentes rugosidades superficiais, que podem influenciar a adesão bacteriana e, conseqüentemente as infecções hospitalares, são necessários mais estudos para testar os efeitos de um intervalo de superfície rugosa. De salientar, ainda, que este facto começa também a preocupar a indústria alimentar (Branes *et al.*, 1999), uma vez que, tal como se pode observar na Figura 2.3, há bactérias que consideram estes locais preferenciais.

Morfologia da superfície ou configuração

A configuração física de uma superfície material (descrição morfológica do padrão ao material da superfície) é diferente da rugosidade superficial, sendo essa descrição mais complicada. Rotinamente, as condições físicas são avaliadas por microscopia de varrimento electrónico.

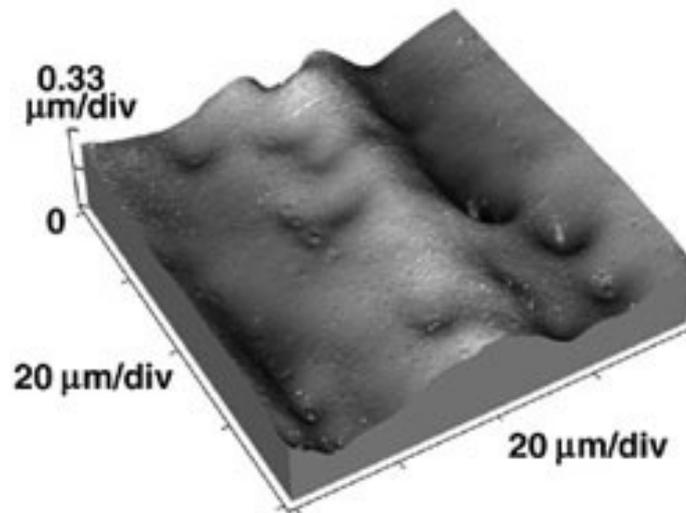


Figura 2.4 – Imagem de aço inoxidável electropolido que mostra cavidades onde os microrganismos facilmente se podem depositar (adaptado de Teflon[®] Home Page, 2003)

As irregularidades da superfície material (Figura 2.4) promovem a adesão bacteriana, a deposição do biofilme e a acumulação de lamas, enquanto que superfícies ultralisas dificultam a adesão bacteriana (Merritt *et al.*, 2000).

Merritt *et al.* (2000) mostraram que uma infecção num implante tem uma velocidade muito mais elevada em materiais porosos, pois as bactérias aderem e colonizam preferencialmente superfícies porosas. No mesmo estudo, também, é referido que em cateteres intravenosos que foram inoculados com estafilococos coagulase – negativos, a adesão inicial ocorre nas irregularidades da superfície interior dos cateteres (Merritt e An, 2000).

Hidrofobicidade de superfícies

Geralmente, os materiais podem ser divididos em duas classes: materiais com altas energias de superfície, que são, também, hidrofílicos, frequentemente carregados negativamente, usualmente materiais inorgânicos como metais, ou minerais; materiais com superfícies de baixas energias, normalmente hidrofóbicos, com baixas energias electrostáticas sendo, geralmente, polímeros orgânicos como plásticos e o teflon (An e Skowronski, 2000; Merritt e An, 2000; Reid, 2000). A hidrofobicidade de uma superfície tem vindo a ser

determinada, fundamentalmente, por medida de ângulos de contacto (Dickson e Koohwaraie, 1989).

Dependendo da hidrofobicidade, quer das bactérias quer das superfícies materiais, as bactérias aderem diferentemente ao material com diferentes hidrofobicidades. Muitos estudos revelam que os materiais hidrofílicos são mais resistentes à adesão bacteriana que os materiais hidrófobos (An e Skowronski, 2000; Reid, 2000).

2.1.3 Influência das proteínas na adesão bacteriana

Muitas proteínas, incluindo albumina, fibronectina, fibrinogénio, laminina e colagénio desnaturado, entre outras, têm sido estudadas pelos efeitos que provocam na adesão bacteriana a superfícies de materiais. Estas proteínas promovem ou inibem a adesão bacteriana às superfícies por alteração das ligações nas superfícies, por ligação à superfície bacteriana ou pela sua presença no meio líquido durante o período de adesão. Para esta última situação, a maioria das proteínas inibe a adesão de bactérias (Merritt e An, 2000), possivelmente, pela sua associação com a superfície celular da bactéria, com a superfície material ou até com ambas. As proteínas podem, também, mudar o comportamento de adesão das bactérias pela alteração das características superficiais bacterianas (An *et al.*, 2000; Branes *et al.*, 1999).

A albumina é adsorvida em superfícies materiais e tem mostrado efeitos inibidores na adesão bacteriana a polímeros, materiais cerâmicos e metais. Num estudo recente, a albumina de soro humano inibiu a adesão em mais de 95 % de *Staphylococcus epidermidis* a superfícies de uma liga de Cu-Ti, após estas terem sido tratadas com 200 mg/ml de albumina de soro humano, a 37 °C, durante duas horas. Enquanto que a maioria das proteínas reduz a adesão bacteriana através da sua adsorção à superfície, a albumina de soro, também, inibe a adesão ligando-se às células bacterianas. Porém, o mecanismo do efeito de inibição de albumina não é ainda muito claro (Merritt *et al.*, 2000).

A albumina também pode reduzir a adesão bacteriana mudando a hidrofobicidade superficial, porque na presença de soro bovino dissolvido e adsorvido, a superfície torna – se menos hidrofóbica (Merritt e An, 2000; An *et al.*, 2000).

Num estudo recente, um material prótico revestido com albumina foi utilizado num coelho e verificou-se que a velocidade de infecção diminuiu o que parece revelar um novo método para prevenir infecções próticas e infecções nosocomiais (An *et al.*, 2000).

Também na indústria alimentar se começa a pensar em retardar e até prevenir, se possível, a adesão microbianas usando proteínas (Cunliffe *et al.*, 1999).

2.1.4 Problemas associados com a formação de Biofilmes

A investigação da adesão bacteriana e o seu conhecimento é um campo que cobre diferentes aspectos da natureza e da vida humana, como a ciência marinha, a ecologia, a indústria alimentar, e mais importante, a área biomédica (An *et al.*, 2000).

Nas ciências médicas, a adesão de bactérias apresenta-se, geralmente, com um carácter nocivo uma vez que está associada a um grande número de problemas de saúde, tais como infecções em tecidos (osteomielite e endocardite), infecções do tracto urinário, rejeição de próteses e implantes, bem como, infecções da placa dentária, entre outras (Azeredo, 1998). Pode, então, afirmar-se que o conhecimento dos fenómenos envolvidos na adesão de bactérias a tecidos humanos e a superfície de materiais é um passo importante no estudo da patogenidade (Martin e An, 2000).

É sabido que certas espécies, como o *Staphylococcus epidermidis*, depois de aderirem à superfície implantada, excretam uma camada de moléculas orgânicas que torna as células menos acessíveis à defesa dos tecidos e menos susceptíveis a antibióticos. Estas bactérias podem manter-se imóveis na superfície do material por um longo período de tempo até se proporcionar o seu desenvolvimento, como por exemplo, quando ocorre o decréscimo de função imunológica do paciente ou um fraco crescimento de tecido em torno da prótese, ocorrendo a infecção clínica (An *et al.*, 2000; Boland *et al.*, 2000).

Os instrumentos médicos representam um elo significativo na contaminação cruzada de agentes infecciosos a pacientes. Raramente são referidos nas discussões sobre infecções hospitalares mas o número de instrumentos utilizados em cada uma das áreas clínicas revela a sua importância. A adesão de microrganismos patogénicos nestes equipamentos origina um risco para a vida, quer dos doentes, quer dos técnicos que os utilizam.

Outra grande preocupação é a adesão de microrganismos à superfície de equipamentos de processamento alimentar e conseqüente formação de um biofilme. Neste caso, os biofilmes representam, também, um risco potencial de contaminação microbiana, que pode comprometer a qualidade dos alimentos e representar um risco para a saúde pública (Branes *et al.*, 1999; Cunliffe *et al.*, 1999; Das *et al.*, 1998). A acumulação de biofilmes em equipamentos pode, ainda, causar efeitos nefastos como perdas de eficiência em permutadores de calor, perdas de carga nas tubagens e aceleração da corrosão de materiais (Azeredo, 1998).

No entanto, nem sempre esta adesão microbiana é indesejada. Por exemplo, em muitos processos de tratamento de águas residuais requer-se a imobilização de microrganismos (Vieira *et al.*, 1993). De facto, nestes tratamentos existem vários processos biológicos, nos quais, se utilizam suportes para acelerar a formação de biofilmes, tais como os sistemas de biodiscos e os leitos percoladores, que têm vindo a ser usados com grande sucesso devido à sua capacidade de remoção de contaminantes orgânicos e inorgânicos de efluentes.

Assim, a previsão da adesão microbiana é de maior importância na prevenção da formação indesejável de biofilmes e na escolha de suportes materiais para a adesão de biofilmes benéficos (Vieira *et al.*, 1993).

2.2 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DE CÉLULAS ADERIDAS

2.2.1 Técnicas de determinação do número de microrganismos aderidos

Para se poder compreender o fenómeno da adesão é necessário relacionar os parâmetros que estão envolvidos na adesão com o número de células aderidas à superfície de um material.

Os métodos de quantificação de células podem ser classificados em dois tipos: métodos directos e métodos indirectos. Os primeiros baseiam-se em contagens por observação directa em microscópio ou na contagem de colónias em placa (CFU). Os métodos indirectos relacionam a densidade óptica ou turbidimetria das suspensões celulares com a concentração de células ou substâncias intracelulares.

Dos vários métodos apresentados, o que apresenta o maior grau de confiança é a contagem directa por observação ao microscópio. Esta técnica é, no entanto, laboriosa e morosa pois é necessário adquirir um vasto número de observações para que não se torne estatisticamente questionável (Azeredo, 1998).

As desvantagens do método de enumeração de células microbianas por observação ao microscópio óptico podem ser ultrapassadas através do recurso a análise de imagem. A partir de observações microscópicas digitalizadas, é possível, por técnicas de enumeração e dimensionamento automático, determinar o número e tamanho dos objectos captados na imagem. Esta técnica além de evitar a morosidade da contagem manual, permite ainda reduzir o trabalho do investigador e, conseqüentemente, os erros de subjectividade inerentes (Lopes, 2002).

Os métodos microscópicos assumem especial vantagem nos estudos que envolvem a determinação da actividade de células viáveis não cultiváveis. De facto, para células com estas características, os métodos de contagem em placa seriam falíveis uma vez que subestimam o número de células viáveis. Para além disso, os métodos microscópicos evitam a remoção de células da superfície de adesão.

2.2.2 Métodos de contagem directa

Uma ferramenta importante na investigação e contagem *in situ* de células aderidas é a microscopia de fluorescência. Os maiores atributos do uso de fluorescência como uma ferramenta na microscopia são especificidade, sensibilidade, resolução temporal e resolução espacial. A fluorescência é um tipo de luminescência na qual uma luz é emitida a partir das moléculas por um curto período de tempo seguido pela absorção da luz, e ocorre quando um electrão excitado retorna para uma orbital de mais baixa energia e emite um fóton de luz. A auto-fluorescência é a fluorescência que ocorre naturalmente nas moléculas das células (McFeters *et al.*, 1995; Maukonen *et al.*, 2000).

Estes métodos de contagem *in situ* foram preferidos desde o reconhecimento das limitações da tradicional contagem de colónias em placa bem como dos métodos de membranas. A contagem de colónias microbianas em placa apenas inclui bactérias cultiváveis que estão capazes de iniciar divisão celular a uma velocidade suficiente para formar colónias. As bactérias são muito sensíveis às condições de cultura: temperatura, meio, tempo de incubação entre outras, e a resposta pode requerer tempos de 24 horas a uma semana (Boulos *et al.*, 1999; Schaule *et al.*, 1993; McFeters *et al.*, 1995).

Mais recentemente, têm sido propostos vários métodos de enumeração de células totais e células viáveis usando microscopia directa de epifluorescência como alternativa a contagem em placa. Nestes métodos utilizam-se corantes que incluem o CTC (5-cyano-2,3-ditytolyl tetrazolium), redução de INT (2-(*p*-iodofenil)-3-(*p*-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride), o ENT-formazano, inibição por ácido nalidixico, contagem directa com laranja de acridina (AODC), contagem directa com DAPI (4,6-diadimino-2-fenilindole), acumulação de rodamina 123 pela *E. coli* e pelo uso de provas de anticorpos específicos (Boulos *et al.*, 1999; Schaule *et al.*, 1993; McFeters *et al.*, 1995).

A Figura 2.5 mostra imagens de células coradas com DAPI que permite avaliar o número total de células apesar de não ser possível distinguir o estado metabólico das células.

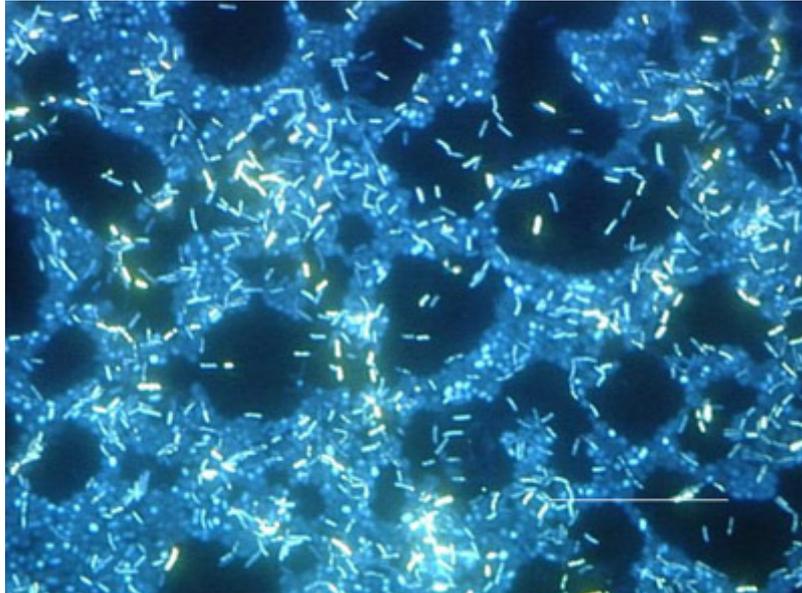


Figura 2.5 – Imagem digitalizada de uma fotografia de microscopia de epifluorescência de um biofilme de 14 dias de um reactor de aço inoxidável corado com DAPI (adaptado de Rodney, 2002).

A Molecular Probes *Inc.* disponibiliza um teste de viabilidade bacteriana de 2 cores fluorescentes, o LIVE/DEAD[®] BacLigh[™] Bacterial Viability Kit (L/D) que tem sido testado em muitas espécies bacterianas gram - negativas (Figura 2.6) e gram - positivas.

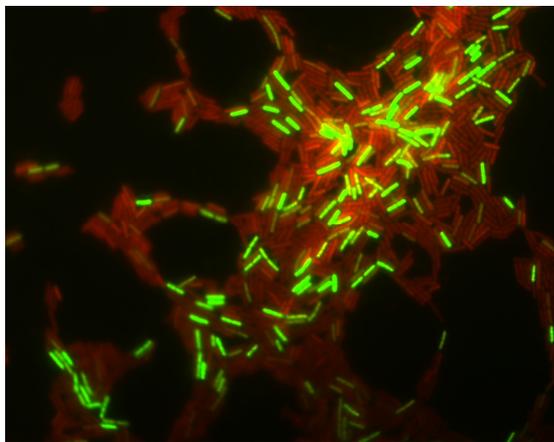


Figura 2.6 – Imagem digitalizada de uma observação de células aderidas de água potável coradas com L/D (Foto cedida por Manuel Simões – Simões *et al.*, 2004).

Maukunen *et al.* (2000) descrevem a aplicação desse novo marcador fluorescente, LIVE/DEAD[®] BacLigh[™] Bacterial Viability Kit (L/D). Este é composto por dois corantes que se ligam aos ácidos nucleicos: SYTO 9 e iodo de propídio. Estes corantes diferem nas características espectrais e na sua capacidade de penetrar nas células bacterianas viáveis.

O SYTO 9 marca as células de verde, enquanto que o iodo de propídio penetra nas células cuja membrana celular foi danificada, marcando-as de vermelho. Os dois reagentes estão contidos numa solução de dimetilsulfoxido anidro (DMSO). Com este método, o número de células totais pode ser obtido num só passo como a soma das células viáveis e as células não viáveis (Boulos *et al.*, 1999).

A intensidade de fluorescência é elevada, com um forte contraste entre as células verdes e vermelhas em fundo com fluorescência mínima, como está exemplificado na Figura 2.6. A fluorescência do SYTO 9 é sensível ao pH, com intensidade mais elevada para pH inferior a 5.5. Como este corante penetra em todas as membranas celulares, a sua eficiência pode ser limitada quer pelo decréscimo da permeabilidade da célula a este marcador, quer pela insuficiente acumulação de marcador para ser detectado. A mesma limitação impõe-se ao iodo de propídio que apenas marca ácidos nucleicos em células com membranas danificadas

Nalguns casos, podem observar-se, para além das células verdes e vermelhas, células amarelas e laranjas. Esta variação de cores, que pode ser observada na Figura 2.6., pode ser explicada pelas quantidades variáveis de iodo de propídio que entraram na célula, reflectindo níveis diferentes de danos na membrana. Estas cores intermediárias, também, podem ser produzidas pela reacção do OPA com ácidos nucleicos alterando os sítios de ligação. As células que podem reproduzir-se fluorescem amarelas ou verdes. Nalguns casos raros, células verdes aparecem amarelas e células vermelhas aparecem cor-de-laranja. Estas são consideradas danificadas e podem representar 5 % da população bacteriana (Boulos *et al.*, 1999; Maukonen *et al.*, 2000).

Boulos *et al.* (1999) compararam o uso de L/D com outras metodologias de contagem directa de bactérias utilizando corantes fluorescentes, nomeadamente, com a contagem das células utilizando a laranja de acridina AOCD (acridine orange direct count), CTC e enumeração por métodos de cultura e filtração por membrana. Nesse mesmo estudo mostra-se que o número total de células enumerado por L/D é ligeiramente superior ao obtido por contagem directa por redução do CTC. O número de células viáveis obtido com L/D é o mesmo que o número obtido utilizando AOCD e CTC-DAPI.

Uma das grandes limitações desta técnica é a exigência de equipamento e técnicos qualificados. A outra é a perda de fluorescência ao longo do tempo e por exposição à luz, o que obriga à análise imediata da amostra para obter resultados reprodutíveis (Maukonen *et al.*, 2000).

2.3 CONTROLO DE CÉLULAS ADERIDAS E DE BIOFILMES

2.3.1 Introdução

Os processos de **esterilização** e **desinfecção** permitem o controlo do desenvolvimento dos microrganismos. São métodos essenciais no tratamento e prevenção de infecções, na prevenção da contaminação de culturas microbianas e na indústria farmacêutica e alimentar (Russell, 1996).

Embora a esterilização e desinfecção sejam termos utilizados para traduzir destruição ou remoção de microrganismos, é importante distinguir o respectivo significado. Por esterilização entende-se a completa destruição ou remoção de todas as formas de vida, quer patogénicas quer não patogénicas, enquanto que a desinfecção consiste na remoção da totalidade ou parte dos microrganismos de determinado objecto ou superfície (Peixe, 1998).

Os agentes utilizados para destruir ou impedir o crescimento de microrganismos, designam-se por agentes antimicrobianos e podem ser físicos ou químicos. Vários factores, tais como concentração da população microbiana, temperatura, duração do contacto com os microrganismos, natureza do material a descontaminar (particularmente a presença de material orgânico) e características dos microrganismos presentes, condicionam a eficácia dos agentes utilizados na esterilização ou desinfecção.

Entre os agentes físicos de esterilização utilizam-se especialmente o calor (*calor húmido e calor seco*), a filtração e as radiações. Podem utilizar-se, com acção esterilizante, *radiações não ionizantes* como os raios ultravioleta (UV) e *radiações ionizantes* como os raios X e os raios γ (gama). Radiações por electrões são outro tipo de radiações ionizantes, com algumas aplicações no campo da Microbiologia, se bem que mais limitadas.

Os agentes químicos utilizados para destruir microrganismos possuem diversas composições. Alguns dos inconvenientes da sua utilização passam pelo facto de poderem ser demasiado tóxicos e irritantes para o homem, atacando, também, alguns deles, os materiais a esterilizar (Power, 1995).

Há agentes químicos que podem ser utilizados como esterilizantes, dada a sua enérgica acção sobre os microrganismos, e muitos têm de ser utilizados diluídos, com o objectivo de diminuir a sua toxicidade e poder irritante. Mesmo que, nalguns casos, a acção desses produtos possa ser bastante enérgica – como sucede com o hipoclorito de sódio ou o fenol – não se pode, em todos os casos, esperar que funcionem como agentes esterilizantes, dado que podem ser neutralizados, quando em contacto com determinada matéria orgânica ou quando

incorrectamente diluídos (Merritt e An, 2000). Destes agentes, aqueles que permitem remover de objectos inanimados ou do meio ambiente a totalidade ou parte dos microrganismos patogénicos, susceptíveis de ocasionarem infecções, designam-se por **desinfectantes**. Embora destruam rapidamente as formas vegetativas dos microrganismos não destroem necessariamente os seus esporos (Peixe, 1998).

Germicidas e sanitizantes são outros termos usados para classificar substâncias químicas com actividade antimicrobiana. O termo germicida refere-se aos agentes químicos que possuem uma actividade microbicida nos microrganismos em geral, pelo que podem ser considerados desinfectantes com um espectro de acção mais amplo. Sanitizantes são produtos utilizados, frequentemente, em objectos inanimados que permitem eliminar 99,9 % dos microrganismos que os contaminam (Russell, 1998).

Biocida é um termo geral que descreve um agente químico, usualmente de largo espectro, que inactiva os microrganismos. Por vezes, o conceito de biocida e desinfectante usam-se como sinónimos. Devido à vasta gama de actuação dos biocidas na actividade microbiana, outros termos podem ser mais específicos, incluindo biostático, referido a produtos que inibem o crescimento (eg., bacteriostáticos, fungistáticos e esporostáticos) e biocida, referindo a agentes que matam o microrganismo alvo.

2.3.2 Breve resenha histórica da aplicação dos desinfectantes

Rutala e Weber (1997) no seu artigo “*Uses of inorganic hypochlorite (bleach) in health-care facilities*” fazem uma resenha histórica sobre o aparecimento dos desinfectantes que se resume a seguir:

“Apesar da aplicação científica de desinfectantes e esterilizantes ter começado aproximadamente 150 anos atrás, o uso empírico de desinfectantes data de muito antes. Aproximadamente nos anos 800 D.C., o famoso poeta grego Homero descreve o uso de enxofre, sobre a forma de dióxido, como desinfectante nas aventuras de Ulisses na “Odisseia”.

A descoberta do cloro em 1774 pelo cientista sueco Scheele ajudou o desenvolvimento na idade da química. Em 1825, Labarraque descreveu o uso de hipoclorito de cálcio para a limpeza de morgues, hospitais, prisões. Ele também denotou que cirurgiões parisienses obtiveram grande sucesso no combate aos casos de carbúnculo, gangrena hospitalar, úlceras e queimaduras quando as feridas eram cobertas com pensos contendo soluções aquosas de hipoclorito.

No século XIX, aceita-se a “teoria dos germes” de infecção e implementa-se as práticas para o controle de infecções nas instituições. Oliver Wendel Holmes em Boston em 1943 e Iqnez Semmelweis em Viena em 1861 descobrem a causa do sarampo e a sua prevenção. Os dois homens concluíram, independentemente, que a doença era transportada de paciente para paciente por doutores e enfermeiras através das suas mãos ou roupas. Sabe-se também que Dakin, durante a 1ª Guerra

Mundial introduziu a irrigação de feridas abertas ou infectadas com uma solução de hipoclorito de sódio (0,5 % aproximadamente).

Por outro lado, o tratamento de efluentes e a provisão de água potável representa um papel fundamental na saúde pública. Produtos clorados já eram usados em Londres em 1854 para tratamento de águas poluídas. Em 1902, já se conhecia uma pequena cidade belga Middekerke que utilizava um sistema contínuo de desinfecção de água.“

Assim, a introdução de muitas classes de desinfectantes tem tido um papel fundamental diminuindo o risco de afectar a saúde pública pela contaminação cruzada de agentes infecciosos por superfícies contaminadas.

2.3.3 Critérios de escolha dos biocidas

Quando se procede à selecção de um biocida, existem certos requisitos a considerar (Bott, 1992), como se apresenta a seguir:

- Actividade contra uma grande gama de microrganismos;
- Relativamente pouco tóxico para outras formas de vida;
- Biodegradáveis (qualquer biocida residual deve ser inofensivo para a actividade biológica após um dado tempo);
- Não corrosivo;
- Eficácia não comprometida pela presença de materiais orgânicos e inorgânicos para além dos microrganismos presentes no sistema;
- A não desactivação de outros aditivos presentes no sistema (por exemplo, produto anti - corrosão);
- Segurança do ponto de vista da saúde, do manuseamento e armazenamento;
- Estabilidade perante variações de pH e temperatura;

Será difícil que o mesmo biocida cumpra todas as exigências acima descritas, pelo que a escolha final do produto a usar será sempre uma ponderação de todos estes factores.

2.3.4 Classificação dos biocidas

De acordo com Bott (1992), os biocidas podem ser classificados de acordo com o seu carácter químico, isto é, biocidas oxidantes e biocidas não oxidantes, como apresentado na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Classificação de biocidas de acordo com o carácter químico (adaptado de Bott (1992)).

Biocidas oxidantes	Biocidas não –oxidantes
Compostos de cloro Compostos de bromo Compostos não halogenados	Fenóis clorados Sais de cobre Compostos contendo mercúrio Aminas e compostos amoniacaís Compostos organo-sulfurados Isotiozolona Acroleína Compostos organo – brómicos Aldeídos

O mecanismo de acção dos biocidas oxidantes passa por oxidar compostos constituintes dos microrganismos. São efectivos em relação a bactérias, fungos, algas e leveduras. Estes biocidas reagem com a matéria orgânica presente no meio, diminuindo a concentração efectiva disponível para controlar os microrganismos. Não há referências que demonstrem que os organismos desenvolvam resistências a este tipo de biocidas.

Os biocidas não oxidantes exercem a sua actividade antimicrobiana por interferência com o metabolismo dos microrganismos e/ou desintegração da parede celular. Estes biocidas são mais efectivos a concentrações mais elevadas, uma vez que os organismos desenvolvem tolerância a este tipo de biocidas, quando o tempo de contacto é relativamente longo e as concentrações aplicadas são baixas, podendo mesmo utilizá-los como fonte de carbono. Comparativamente, aplicam-se concentrações mais baixas de biocidas oxidantes do que de biocidas não oxidantes, para se obter o mesmo grau de morte de microrganismos.

Como o biocida testado no âmbito deste trabalho é um aldeído vai descrever-se com maior detalhe os biocidas desta família, nomeadamente, o glutaraldeído (GTA), o formaldeído (FA) e o orto-ftalaldeído (OPA).

Aldeídos

Os aldeídos têm sido usados na desinfecção de endoscópios em condições clínicas. (Morita *et al.*, 2000). Os aldeídos mais utilizados são o formaldeído e o glutaraldeído e presentemente começa a ser utilizado o orto-ftalaldeído.

Formaldeído

O formaldeído, um gás altamente tóxico cujos vapores são muito irritantes para as mucosas, é altamente letal para todos os tipos de micróbios e esporos. Este gás é estável apenas em grandes concentrações e a elevadas temperaturas, polimerizando à temperatura ambiente sob a forma de uma substância sólida designada paraformaldeído. Por aquecimento do paraformaldeído forma-se novamente formaldeído. Além de ser utilizado na forma gasosa para a desinfecção e esterilização de salas, móveis, roupas e outros artigos alteráveis pelo calor, utiliza-se também em solução aquosa na esterilização de alguns instrumentos. A *formalina* comercial é uma solução de 37 a 40% (p/v) de formaldeído em água com 10% de metanol, para inibir a polimerização. A diluição rápida com 1% de formol permite uma actuação rápida e de elevada eficácia para aplicação directa numa superfície contaminada (Peixe, 1998).

A actividade antimicrobiana do formaldeído é atribuída à sua capacidade de inactivar constituintes celulares como as proteínas e ácidos nucleicos (Fraenkel -Conrat *et al.*, 1946).

No entanto, o formaldeído apresenta alguns riscos carcinogéneos para o Homem, quando aplicado na forma gasosa (Power, 1995).

Glutaraldeído

O glutaraldeído, GTA, em solução aquosa a 2%, é utilizado na esterilização de vários instrumentos médicos que não podem submeter-se ao tratamento pelo calor, como sejam citoscópios, equipamento de anestesia e termómetros. Com a vantagem de ser menos irritante e mais eficaz que a formalina, esta solução é activa contra vírus, células vegetativas e esporos de bactérias e fungos (Peixe, 1980).

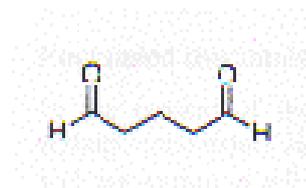


Figura 2.7 – Estrutura química do GTA (adaptado de Simons *et al.*, 2000).

O glutaraldeído é um dialdeído estável em solução ácida e apresenta um carácter activo na gama de valores de pH de 7,5 a 8,5, necessitando por isso de ser alcalinizado antes de ser aplicado (Wallhäußer, 1995).

Embora o glutaraldeído tenha vindo a ser avaliado como um químico adequado para a desinfecção de vírus como o vírus da hepatite B (HBV) e o vírus da imunodeficiência humana (HIV), a lavagem insuficiente de resíduos de GTA pode causar diarreia e cólicas abdominais. Este químico, também, demonstra potenciais citotóxicos e genotóxicos em células humanas cultivadas (Morita *et al.*, 2000).

Orto-ftalaldeído

O orto-ftalaldeído, OPA, é um novo desinfectante que se pensa ter uma potente actividade bactericida e esporicida e tem sido sugerido como substituto para o GTA na desinfecção de endoscópios. O OPA é um composto aromático com 2 grupos aldeído (McDonnell e Russell, 1999; Gregory *et al.*, 1999, Walsh *et al.*, 1997).

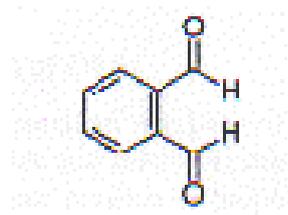


Figura 2.8 – Estrutura química do OPA (adaptado de Simons *et al.*, 2000).

O OPA é fácil de usar, uma vez que não tem vapores irritantes e pode ser usado directamente, sem requerer diluição. Alfa *et al.* (1994) demonstraram que o OPA é estável durante 14 dias. O correcto procedimento de limpeza/desinfecção com OPA permite obter uma redução logarítmica da concentração bacteriana maior do que 5. Esta avaliação em meio hospitalar levou à conclusão que o OPA é uma escolha efectiva como desinfectante de alto nível para endoscópios flexíveis.

Estudos realizados por Gregory *et al.* (1999) demonstram ainda que o tempo de acção do OPA é mais rápido do que o GTA. Para além disso, a solução após três semanas de uso ainda possui uma actividade antimicrobiana mais rápida quando comparada com solução de fresca de GTA livre de resíduos, juntando assim mais uma vantagem sobre os outros dialdeídos.

2.3.5 Mecanismo de acção dos biocidas

Tem vindo a ser feito um progresso considerável na compreensão dos mecanismos de acção dos biocidas em bactérias. Contrariamente, estudos semelhantes com vírus e protozoários têm sido feitos raramente. Também pouco se sabe sobre a actuação dos biocidas sobre priões (Medonhas e Russell, 1999).

Os biocidas têm que reagir e interactuar com os locais activos dos microrganismos para serem efectivos. A reacção do biocida com a célula microbiana envolve uma ligação inicial com a superfície da célula, embora os locais activos microbianos possam ser encontrados no interior da célula. A parede celular, os componentes da membrana citoplasmática e o citoplasma são os locais de acção preferenciais dos biocidas (Cloete *et al.*, 1998; Deneyer e Stewart, 1998; Shepherd *et al.*, 1998; Al-Adham *et al.*, 1998). A Figura 2.9. representa esquematicamente os potenciais locais activos dos biocidas nas bactérias gram-positivas e gram-negativas.

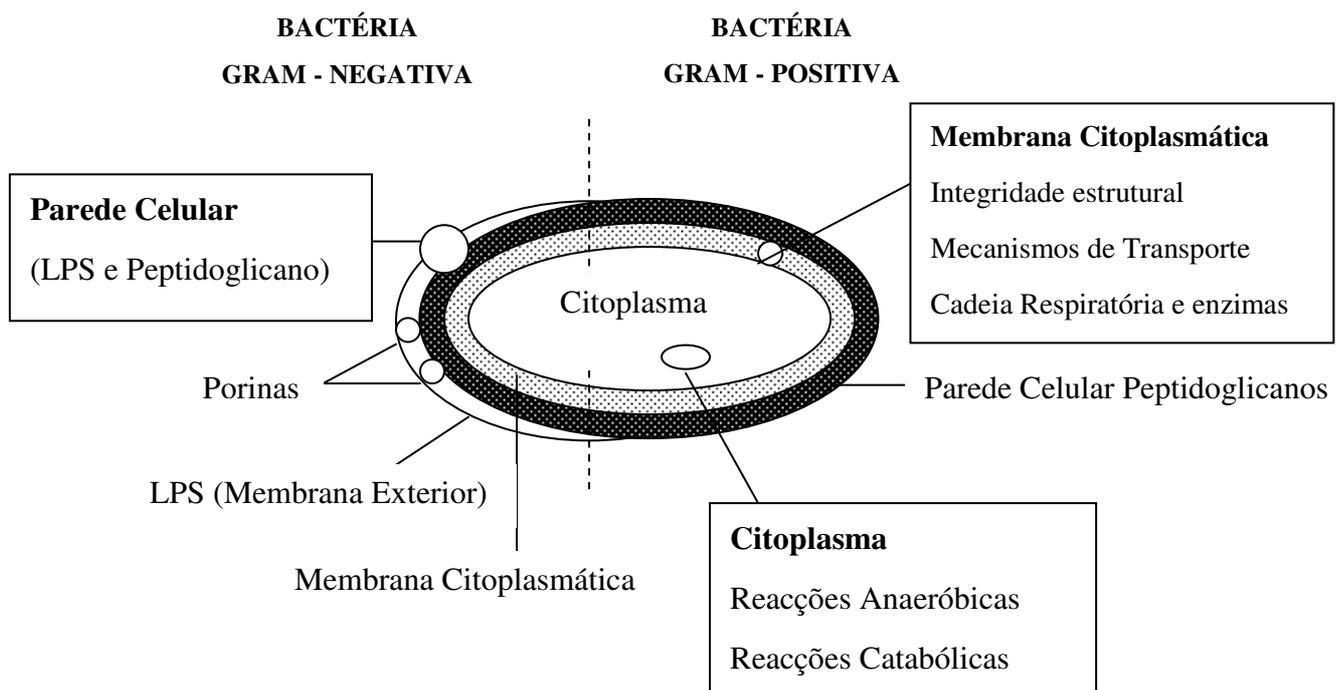


Figura 2.9. Potenciais locais activos nas bactérias para acção dos biocidas (adaptado de Denyer, 1995).

Os potenciais alvos dos biocidas são o citoplasma e a membrana citoplasmática, sendo difícil a distinção entre ambos (Cloete *et al.*, 1998; Denyer e Stwert, 1998). A parede celular, estruturada sob controlo genético, também é responsável pela morfologia bacteriana e pela diferente resposta das bactérias face à coloração de Gram, como mostra a Tabela 2.2.

Tabela 2.2. – Diferenciação da composição química da parede celular bacteriana de bactérias gram – positivas e gram – negativas (adaptado de Parente, 1998)

Componentes	Bactéria Gram positiva	Bactéria Gram negativa
Peptidoglicano	+	+
Ácidos Teicóicos	+	-
Polissacarídeos	+	-
Proteínas	+ ou -	+
Lipopolissacarídeos	-	+
Lipídeos	- ou +	+

As bactérias gram-negativas são de um modo geral menos sensíveis aos biocidas do que as bactérias gram-positivas devido à sua membrana exterior. Assim, os biocidas têm de desenvolver mecanismos que lhes permitam atravessar esta membrana (Paulus, 1993; Russell, 1994).

A Tabela 2.3. indica diversos mecanismos de acção dos biocidas, consoante o local activo onde interactivam.

Tabela 2.3. – Mecanismos de acção dos biocidas consoante os locais alvos (adaptado de Maillard, 2002)

Local activo	Mecanismos	Biocidas
Parede celular	Ligação cruzada	GTA, OPA, FMA
Membrana exterior ⁽¹⁾	Aumento da permeabilidade	CHA, QACs, CRAs, sais de mercúrio (II), PHE
Membrana citoplasmática	Aumento da permeabilidade	ACD, alcoóis, anilidas, CHA, QACs, PHE, HCP
	Alteração do potencial membranar e cadeia transportadora de electrões	ACD, anilidas, QACs, PHE, HCP
	Síntese de ATP	CHA, sais de cobre (II), ETO
	Inibição da actividade enzimática	CHA, QACs, PHE
Constituintes citoplasmáticos	Coagulação geral	CHA, QACs, GTA, HPC, sais metálicos ⁽²⁾ , PHE
	Ácidos nucleicos	ACD, ACR, ETO, FMA, GTA, CRAs, POP
	Ribossomas	HOP, sais de mercúrio (II),
Interacção com grupos específicos	Grupos tióis	BOP, ETO, GTA, HOP, CRAs, IOD, POP, sais metálicos ⁽²⁾ , IST
	Grupos amino	ETO, FMA, GTA, OPA
	Grupos sulfídricos	BOP, ETO, GTA, HOP, CRAs, sais metálicos ⁽²⁾ , IST

(1) – Bactérias gram- negativas

(2) – Sais de cobre (II), sais de mercúrio (II) e organomercuriais, sais de prata (I)

ACD, ácidos orgânicos e parabens; ACR, acridinas; BOP, Bronopol; CHA, clorohexidina; CRAs- agentes libertadores de cloro; ETO, óxido de etileno; FMA, formaldeído; GTA, glutaraldeído; HCP, hexaclorofano; HOP, peróxido de hidrogénio; IOD, iodo e iodoforos; IST, isotiazolona; OPA, orto – ftalaldeído, PHE, fenóis; POP, propriolactona; QACs- compostos quaternários de amónia.

Como o biocida utilizado é um aldeído vai descrever-se com maior detalhe, para além do mecanismo de acção do orto-ftalaldeído (OPA) o do glutaraldeído (GTA).

2.3.6 Mecanismo de acção do OPA e do GTA

A maior parte dos aldeídos (GTA, succinaldeído e OPA) que têm actividade esporicida são dialdeídos. A distância entre os dois grupos hidróxido é óptima para a interacção dos dialdeídos com ácidos nucleicos e, especialmente, com enzimas e proteínas (McDonnell e Russell, 1999). Na Figura 2.10 apresenta-se o mecanismo de acção do glutaraldeído.

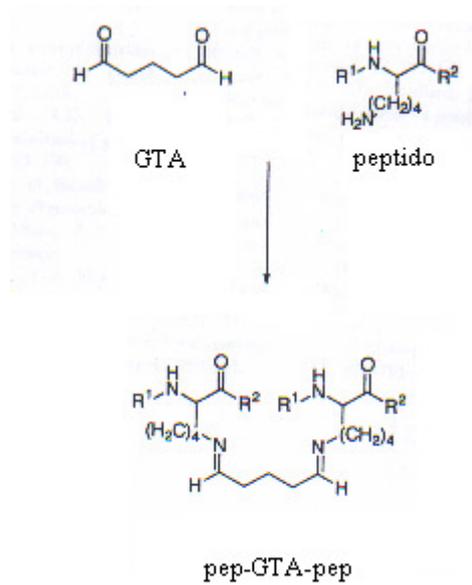


Figura 2.10. – Mecanismos de acção do GTA (adaptado de Simons *et al.*, 2000)

É sabido que o OPA reage fortemente com as células bacterianas por reacção com as aminas primárias presentes na cadeia peptídica. (Walsh *et al.*, 1997; Simons *et al.*, 2000). Simons *et al.* (2000) propuseram um mecanismo para a actividade bactericida ao OPA, que se encontra esquematizado na Figura seguinte:

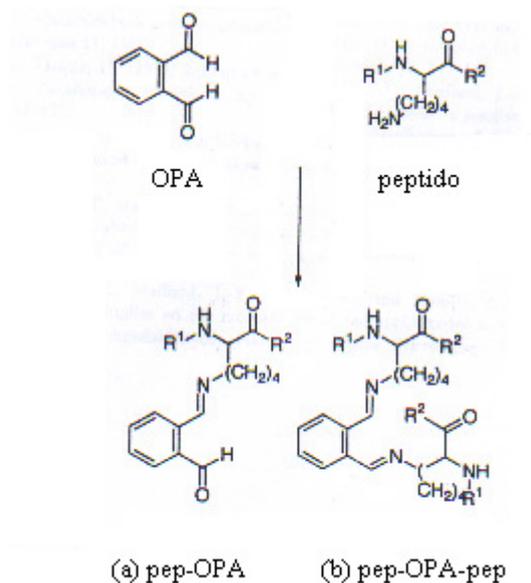


Figura 2.11. – Mecanismos de acção do OPA (adaptado de Simons *et al.*, 2000)

A capacidade de reacção do OPA pode ser afectada pela estrutura do aldeído, uma vez que os aldeídos aromáticos (OPA) são menos reactivos que os alifáticos (GTA), sendo menos provável que a ligação simultânea dos dois grupos dialdeídos ocorra. Assim, observando a Figura 2.11, pode concluir-se que o complexo peptídeo-OPA é o produto de reacção com maior incidência.

2.3.7 Testes de desinfectantes: testes de biocidas em células em suspensão

A actividade antimicrobiana de um novo anti-séptico ou desinfectante pode ser avaliada, *in vitro*, através da utilização de técnicas tradicionais microbiológicas, como a técnica de diluição em tubo, espalhamento em agar e determinação do coeficiente de fenol. Nesta última técnica, compara-se através de ensaios paralelos, os períodos letais observados com suspensões de *Salmonella typhi* ou *Staphylococcus aureus* expostas a concentrações conhecidas da substância em ensaio, com os correspondentes períodos letais correspondentes a concentrações conhecidas de fenol. A maior diluição da substância em ensaio que mata o microrganismo em estudo em 10 min, mas não em 5 min, dividida pela maior diluição de fenol que apresenta o mesmo resultado, corresponde ao coeficiente de fenol do agente químico testado (Holah *et al.*, 1998).

Em condições práticas, nomeadamente na presença de grande quantidade de matéria orgânica, o agente químico a testar deverá ser ensaiado em condições idênticas ou próximas daquelas em que irá ser utilizado.

De acordo com a legislação em vigor (EN 1276:1997) um biocida deve ser avaliado por testes em suspensão, utilizando determinados microrganismos, quer bactérias gram-positivas, quer gram-negativas, em condições limpas e sujas. As **condições limpas**, de acordo com a norma europeia, obtêm-se pela adição de uma solução de albumina de soro bovino (BSA) à suspensão celular, de modo a obter uma concentração de BSA de 0.3 g/L. As **condições sujas** obtêm-se pela adição de uma solução de albumina de soro bovino à suspensão celular a ser utilizada nos testes de forma a obter uma concentração de BSA de 3 g/L.

Os testes em suspensão são relativamente simples comparados com testes de superfícies e não requerem equipamento de laboratório especializado ou dispendioso sendo fáceis de realizar. São também bem definidos e são, dentro dos limites normais microbiológicos, repetitivos e reprodutíveis. Usando uma metodologia adequada é também possível testar uma gama de variáveis incluindo o tempo de contacto, a temperatura, o tipo de microrganismo e substâncias interferentes (p.e. resíduos de produtos alimentares).

O maior problema destes testes é não reflectirem as verdadeiras condições de uso, nas quais, para além de estarem em suspensão, os microrganismos também se encontram frequentemente aderidos às superfícies (Holah *et al.*, 1998). Consequentemente, é necessário efectuar ensaios testando os microrganismos aderidos a superfícies – testes em superfície.

Os testes em suspensão devem, então, ser usados como testes preliminares para avaliar a eficácia de desinfectantes sob as mesmas condições ambientais que podem ser esperadas nos processos de processamento alimentar (Holah *et al.*, 1998). Estes testes incluem a preparação de bactérias, exposição ao biocida, neutralização e remoção dos componentes do biocida e a estimação de bactérias sobreviventes. A variação dos resultados pode então derivar das condições do inóculo, neutralização insuficiente e o método da contagem das colónias (Langsrud *et al.*, 1998).

Os testes com microrganismos aderidos em superfície são usados para mimetar alguns dos aspectos encontrados em condições reais. Têm algumas vantagens sobre os testes em suspensão e são, também, relativamente simples, reprodutíveis não requerendo equipamento de custo elevado. Estes testes, também possibilitam a manipulação de uma série de variáveis incluindo o tempo de contacto, o tipo de microrganismos, o tipo de superfície e as substâncias que interferem com a acção de biocidas. A temperatura é, também, uma variável a considerar mas requer um grande número de câmaras ou um laboratório sob condições climáticas controladas.

Tradicionalmente, um dos problemas encontrados é o facto dos microrganismos terem de ser removidos da superfície para serem enumerados o que pode impor-lhes um stresse letal (Holah *et al.*, 1998). Assim, a enumeração da viabilidade *in situ* é preferida.

Têm surgido tentativas de desenvolver testes normalizados que permitem avaliar a resistência microbiana de células aderidas aos biocidas. A normalização e a avaliação de factores que influenciam estes testes são importantes para obter uma boa reprodutibilidade e permitir a comparação entre ensaios (Lansgrud *et al.*, 1998).

Na Tabela 2.4 resume-se a classificação dos testes de avaliação da eficiência de biocidas.

Tabela 2.4 – Classificação dos testes de desinfectantes (adaptado de Russell *et al.*, 1982)

Tipo de classificação	Parâmetro de classificação		Fundamento teórico
Tipo de organismo testado	Antibacteriano		Inactivação da actividade das bactérias
	Antifúngico		Inactivação da actividade dos fungos
	Antivírico		Inactivação da actividade dos vírus
Tipo de acção	Biocida		Exercem efeito adverso na viabilidade
	Bioestático		Exercem efeito adverso no crescimento e reprodução
Tipo de estrutura do teste	Testes “ <i>in vitro</i> ”	Suspensão	Testes de células em suspensão
		Capacidade	Adição de células em suspensão
		Suporte	Testes de organismos em superfícies
	Testes práticos		Determinação de eficácia em superfícies
	Testes in use		
Tipo de objectivo do teste	1ª fase		Determinação de propriedades bacterianas
			Determinação de relação entre tempo de exposição e a concentração
			Determinação da influência da concentração
	2ª fase		Determinação da concentração limiar
	3ª fase		Determinação da eficácia em condições reais.

De acordo com esta Tabela, os trabalhos desenvolvidos para elaboração da presente dissertação podem ser classificados como antibacterianos, *in vitro*, estudando-se um produto de acção biocida e tendo-se atingido o objectivo da 1ª e 2ª fase dos testes.

2.3.8 Parâmetros que afectam a eficiência do biocida

A actividade antimicrobiana de um biocida pode ser influenciada por muitos factores tais como efeitos de formulação, tipo de microrganismo, presença de matéria orgânica, sinergia com outras substâncias, temperatura e diluição.

Tipo de microrganismos

Embora alguns microrganismos se tornem gradualmente resistentes a vários agentes químicos, em resultado da larga utilização dos biocidas, outros microrganismos são intrinsecamente ou naturalmente resistentes a uma ou mais classes de biocidas. Assim, a resistência de um microrganismo, como a *Pseudomonas aeruginosa*, pode ser atribuída à impermeabilidade da parede celular a um agente específico, assim como, a resistência de micobactérias à maioria dos agentes biocidas poderá advir do elevado conteúdo lipídico da parede celular. De um modo semelhante, os esporos bacterianos apresentam uma estrutura naturalmente resistente a vários agentes anti-sépticos e desinfectantes.

A eficiência de um biocida varia conforme o tipo de microrganismo testado, e por vezes, entre estirpes da mesma espécie microbiana. Russell *et al.* (1997) classificaram os microrganismos de acordo com a sua sensibilidade aos Biocidas, como se apresenta na Figura 2.12.

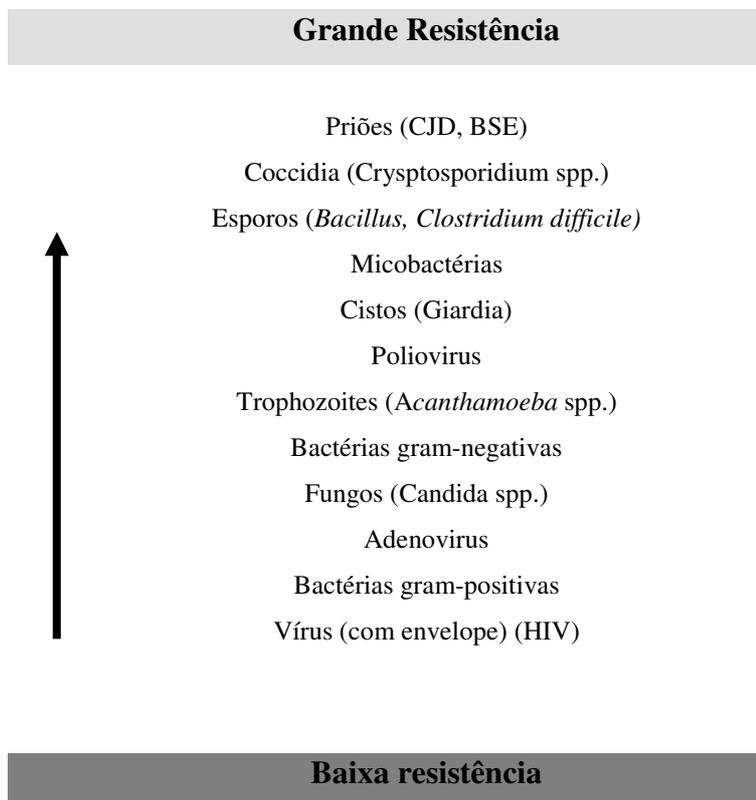


Figura 2.12 – Classificação dos microrganismos de acordo com a sua sensibilidade aos biocidas

Numa escala crescente de resistência a biocidas (Figura 2.12), as formas vegetativas bacterianas constituem os microrganismos menos resistentes, seguindo-se as formas vegetativas dos fungos e os esporos fúngicos, vírus, formas quísticas de *Giardia* spp e *Cryptosporidium* spp, micobactérias, esporos bacterianos e por último, alguns priões. Relativamente à resistência a biocidas, os vírus são divididos em dois grupos: o grupo dos menos resistentes inclui os vírus com invólucro, e o grupo dos mais resistentes associados a vírus sem invólucro. À excepção dos vírus sem invólucro, que podem apresentar resistência a formulações tuberculocidas, a utilização desta escala de resistência traduz o comportamento dos diferentes microrganismos sendo de grande utilidade na selecção de biocidas para aplicações específicas.

Concentração do biocida e Tempo de contacto

A concentração é o factor mais importante na eficiência de um biocida (McDonnell e Russell, 1999). Quando se usam concentrações baixas de biocidas, estas podem conduzir a desenvolvimento de mecanismos de resistência dos microrganismos a esses biocidas ou a outro agente químico (Walsh *et al.*, 1999).

Conjuntamente com a variação da concentração, também a variação do tempo de contacto, fixando uma determinada concentração, deve ser estudada de forma a determinar as condições de melhor eficácia de biocida.

Substâncias Interferentes

A matéria orgânica pode interferir com a actividade antimicrobiana dos biocidas e de outros compostos antimicrobianos, como por exemplo os surfactantes. Esta interacção pode ser descrita como uma reacção entre os biocida e a matéria orgânica presente no meio resultando numa diminuição da concentração livre do agente antimicrobiano para reagir com os microrganismos. A diminuição da eficácia do agente antibacteriano pode também, ser devido à barreira protectora desenvolvida pela matéria orgânica em torno dos microrganismos, protegendo-os contra o ataque dos biocidas.

Neutralizantes

O Conselho da Europa recomenda alguns neutralizantes dos biocidas e as concentrações a que devem ser usados. Um dos neutrilizantes recomendados é o tiosulfato de sódio, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (5 mg/ml) sendo este o que foi utilizado no presente trabalho. Este neutralizante também foi altamente recomendado num estudo de Langsrud *et al.*, (1998) no qual se compara a influência de vários factores nos testes de suspensão.

2.3.9 Desinfecção hospitalar

Os instrumentos médicos para uso em pacientes podem ser divididos em três classes, de acordo com a sua utilização e o risco de infecção pela possível contaminação (Rutala e Weber, 1997):

1. A primeira classe inclui os instrumentos críticos que são aqueles em contacto com tecidos ou sistema vascular, como instrumentos cirúrgicos ou implantes (eg. válvulas do coração). Estes devem ser cuidadosamente esterilizados devido ao alto risco de infecção que representam, especialmente se estão contaminados com alguns microrganismos.
2. Os instrumentos semi-críticos, pertencentes à segunda classe, são objectos que estão em contacto com membranas mucosas ou pele não intacta, como equipamento de anestesia, endoscópios, e anéis de diafragma. Como as membranas mucosas intactas são geralmente resistentes a infecções com endosporos bacterianos, mas não necessariamente a bactérias vegetativas ou viroses, estes instrumentos devem ser livres de microrganismos com a excepção de um largo número de endosporos bacterianos.
3. Finalmente, os instrumentos não – críticos que são os objectos que estão em contacto com pele intacta. Embora exista um risco mínimo de transmitir agentes infecciosos a pacientes via instrumentos não – críticos, este tipo de equipamento pode representar um elo importante na contaminação cruzada.

Endoscopia

A Endoscopia tem-se tornado um procedimento muito comum no campo médico. Neste momento, o maior número de exames de endoscopia é efectuado no tracto respiratório (broncoscópico) ou no trato gastrointestinal (gastroscópico ou colonoscópico).

Os endoscópios que são usados em humanos são expostos a duas categorias de microrganismos (incluindo bactérias, fungos e viroses e parasitas): os que fazem parte da flora normal e aqueles que não fazem parte da flora normal (patogénios primários). Tem vindo a ser sugerido que a presença da flora normal no trato respiratório superior e no trato gastrointestinal instiga a necessidade de endoscópios estéreis. No entanto, outros trabalhos subsequentes têm indicado, claramente, que algumas infecções sérias e graves (algumas com risco para a vida) podem ser causadas por ambos os grupos de organismos.

Têm sido documentadas transmissões paciente-paciente de *Salmonella spp*, *Helicobacter pylori*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus spp*, *Serratia spp*, e do vírus da Hepatite B (HBV). Até ao momento, o maior risco de infecção ocorre quando os endoscópios são usados para aceder a órgãos como o pâncreas que é, normalmente, estéril. O duodenoscópio usado para a endoscopia ERCP pode ser causa de infecções nosocomiais devido à desinfecção inadequada dos endoscópios usados, ou a traumas causados no tecido que resultam na disseminação de bactérias da flora colonizante (Alfa e Sitter, 1994).

De facto, Allen *et al.* (1985) demonstraram que quando se utilizaram duodenoscópios, advertidamente contaminados com *P. aeruginosa*, aproximadamente um terço dos pacientes desenvolveu infecções biliares de *P. aeruginosa*.

Como o endoscópio passa através das membranas mucosas, uma desinfecção de alto nível em vez da esterilização é aceitável. A escolha do desinfectante é uma preocupação primária e informações detalhadas têm sido organizadas para facilitar este processo de decisão.

A Working Party da British Society of Gastroenterology (Alfa e Sitter, 1994) recomendou o glutaraldeído alcalino (2 %) e Gigasept (10 %) (Butano 1-4 dial/2,5 dimetoxi tetra-hidrofuranos e formaldeído) como, respectivamente, os anti-bactericida e anti-vírico efectivos que podem adequadamente irradiar o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e HBV, bem como, bactérias vegetativas.

A necessidade da activação do glutaraldeído 2 % torna o trabalho de desinfecção laborioso. Para além disso, a ocorrência de fumos irritantes associados com o formaldeído e o glutaraldeído aumenta a dificuldade do seu manuseamento (Alfa e Sitter, 1994).

Estudos realizados por Alfa e Sitter (1994) demonstraram que o OPA é um biocida efectivo de elevado nível para eliminar bactérias vegetativas, fungos e parasitas de material clínico, não sendo necessário activar a solução de OPA ao contrário de muitos outros desinfectantes, como o GTA.

Os estudos realizados por Gregory *et al.* (1999) demonstraram que a acção do OPA é mais rápida do que a do GTA. A solução de OPA, após ter sido usada e contaminada com matéria orgânica durante três semanas, mostrou possuir uma actividade antimicrobiana mais rápida do que a solução limpa de GTA (sem matéria orgânica), tendo o OPA sido preferido pela maior parte dos utilizadores, realçando que este é menos corrosivo e mais inodoro que o glutaraldeído.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Sumário

Neste Capítulo apresenta-se uma descrição dos materiais e métodos utilizados durante a execução do trabalho. Cada experiência foi desenhada de modo a controlar de todas as condições experimentais para que se testassem as variáveis desejadas.

3.1	<i>Microrganismos</i>	37
3.2	<i>Testes de adesão estática</i>	41
3.3	<i>Testes de desinfecção com células aderidas</i>	43
3.4	<i>Testes de desinfecção com células em suspensão</i>	46
3.5	<i>Quantificação do número de células por análise de imagem</i>	47
3.6	<i>Métodos estatísticos</i>	49

3.1 MICRORGANISMOS

3.1.1 Selecção de Microrganismos

Equacionando os objectivos, a selecção dos microrganismos, para os estudos de desinfectação desenvolvidos nesta área, recaiu sobre quatro tipos de bactérias: *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas fluorescens*. Segue-se uma pequena descrição de cada estirpe escolhida.

No âmbito deste trabalho estudou-se a desinfectação de células aderidas a superfícies metálicas representativas de Instrumentos Médicos, pelo que a escolha dos microrganismos utilizados no trabalho experimental foi no sentido de representar as condições clínicas. Os microrganismos patogénicos, usualmente, associados a infecções humanas e que, portanto, devem ser usados como modelo são *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp. e alguns microrganismos anaeróbios. Para estudos laboratoriais, estes microrganismos podem ser obtidos directamente por isolamento clínico ou obtidos de colecções de microrganismos (por exemplo, ATCC -American Type Culture Collection, Rockille, MD). Nos anos mais recentes, as estirpes normalmente usadas para estudos de infecções *in vitro*, *in vivo* ou de adesão bacteriana relacionada, incluem *Staphylococcus epidermidis* (ATCC – 35984 ou ATCC – 35983 ou RP662NA), *Escherichia coli* (ATCC – 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (Skowmonski, 2000; Reid, 2000).

Apesar da *Pseudomonas fluorescens*, ao contrário da *Pseudomonas aeruginosa*, ser geralmente considerada de baixa virulência tendo, portanto, um pequeno significado clínico, Alfa *et al.* (1993) encontraram *Pseudomonas* spp. em grandes concentrações em endoscópios após utilização. Também noutros estudos, são mencionadas infecções clínicas originadas pela *P. fluorescens*, nomeadamente nos pacientes em tratamento nas áreas da oncologia e quimioterapia ou, ainda, naqueles que receberam transfusões de sangue (Hsueh *et al.*, 1998). Esta bactéria é ubíqua pelo que se torna pertinente o seu estudo.

Pseudomonas fluorescens

O microrganismo utilizado foi uma estirpe da bactéria gram-negativa *Pseudomonas fluorescens*, proveniente da colecção americana (ATCC 13525). Foi utilizada esta estirpe devido à disponibilidade de informação relativa às condições de cultura (Oliveira *et al.*, 1994; Vieira, 1995), bem como, ao conhecimento das potencialidades de formação de biofilme apresentadas por este microrganismo (Pinheiro, 1987; Vieira, 1995).

O facto desta bactéria pertencer ao género *Pseudomonas*, que é um dos mais frequentemente encontrados em endoscópios após utilização em doentes das áreas de oncologia, quimioterapia e em instrumentos médicos utilizados em transfusões de sangue (Alfa *et al.*, 1993; Hsueh *et al.*, 1998), também contribuiu para esta opção.

Pseudomonas aeruginosa

O microrganismo utilizado foi uma estirpe da bactéria gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa*, isolada clinicamente. Para além da *P. aeruginosa* ser um microrganismo presente, frequentemente, em instrumentos médicos (Hsueh *et al.*, 1998), a Norma Europeia EN 1276:1997 refere este microrganismo como um dos a testar para avaliar a actividade bactericida de um produto.

Escherichia coli

A *Escherichia coli* utilizada foi uma estirpe da bactéria gram-negativa, do género Enterobacteria, proveniente da colecção americana (ATCC 25922). É uma estirpe de referência em várias aplicações e aconselhada, pelo Conselho Europeu na Norma Europeia EN 1276:1997, como microrganismo a testar para avaliar a eficiência de biocidas.

A *Escherichia coli* causa infecções no tracto urinário que afectam 7 milhões de pessoas anualmente sendo estas infecções as mais comuns adquiridas por humanos (Boland *et al.*, 2000). A *Escherichia coli* enteropatogénica e a *Escherichia coli* OH 157 são microrganismos patogénicos que causam sérios problemas de saúde, quer em países industrializados, quer em países em vias de desenvolvimento (Boland *et al.*, 2000).

Staphylococcus epidermidis

Utilizou-se uma estirpe da bactéria gram-positiva *Staphylococcus epidermidis*, proveniente da colecção americana (ATCC 35984).

Os *Staphylococci* coagulase-negativo (CNS) são componentes normais da flora da pele, sendo o *Staphylococcus epidermidis* a mais comum e predominante dessas estirpes. Os CNS são largamente associados a infecções relacionadas com endoscópios, implantes ou próteses ortopédicas, válvulas prostéticas do coração, próteses vasculares e outros instrumentos médicos (Alfa *et al.*, 1993; An *et al.*, 2000; Boland *et al.*, 2000; Dalton *et al.*, 2000). Com a utilização do *S. epidermidis* pretendeu-se, também, avaliar o comportamento de uma bactéria gram-positiva quando face ao mesmo tratamento com o biocida e fazer a comparação com as bactérias gram-negativas.

3.1.2 Modo de preservação dos microrganismos

As bactérias foram conservadas em meio sólido de nutriente agar (Merck) inclinado em tubos de ensaio rolhados com algodão cardado e mantido à temperatura de 4 °C. Periodicamente, as culturas foram repicadas para novos tubos inclinados de nutriente agar.

A reactivação das células foi feita por espalhamento de cada uma das bactérias em meio sólido de nutriente agar esterilizado (20 g L⁻¹) em caixa de Petri e incubação a 27 °C ± 1 °C, durante cerca de 24 h. As colónias assim obtidas constituíam o “stock” de bactérias das várias estirpes para pronta utilização.

3.1.3 Meios de cultura

Meio de cultura da *Pseudomonas fluorescens*

Esta bactéria foi capaz de crescer num meio sintético aquoso, cuja composição se descreve na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 Composição do meio de cultura para a bactéria *P. fluorescens*.

Componente	Concentração (g/L)
Glicose anidra	5.00
Peptona	2.50
Extracto de levedura	1.25

O meio foi preparado dissolvendo todos os componentes em água destilada, mantendo-se o pH a 7.0 ± 0.2 pela adição de sais constituintes do tampão fosfato pH 7, cuja composição se descreve na Tabela 3.2. A solução foi então esterilizada em autoclave a 121 °C durante 20 min (Pereira, 2001).

Tabela 3.2 Composição da solução de tampão fosfato pH 7 (0.2 mol/L) utilizada para a manutenção do pH do meio de cultura da bactéria *P. fluorescens*.

Componente	Concentração (g/L)
KH ₂ PO ₄	1.88
Na ₂ HPO ₄	2.15
HCl ou NaCl ⁽¹⁾	-

(1) quando necessário para acerto do pH

Meio de cultura da *E. coli*, *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*

Estas estirpes foram capazes de crescer num meio sintético aquoso (TSB), cuja composição se descreve na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 Composição do meio de cultura TSB para as bactérias *E. coli*, *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*.

Componente	Concentração (g/L)
Peptona caseína	17
Peptona de farinha de soja	3
D – glucose	2,5
NaCl	5
Na ₂ HPO ₄	2,5

O meio foi preparado dissolvendo-se todos os componentes em água destilada, sendo o pH mantido a 7.0 ± 0.2 , pela adição dos sais constituintes do tampão fosfato salino (PBS) pH 7. A solução obtida era então esterilizada em autoclave a 121 °C durante 20 min.

3.1.4 Preparação da cultura de células de *Pseudomonas fluorescens*

A bactéria *P. fluorescens* foi crescida num reactor contínuo dotado de agitação e arejamento. Para tal, preparou-se, em condições assépticas, um inóculo num matraz de 250 ml, inoculando 100 ml de meio de cultura tamponado (Tabela 3.1) com células obtidas a partir do espalhamento da bactéria em caixa de Petri e incubando a 27 °C com agitação orbital (120 rpm), durante aproximadamente 12 h (tempo necessário para que a cultura se encontre em plena fase exponencial). Decorrido esse tempo, o inóculo estava pronto a ser transferido para o reactor contínuo comercial num volume correspondente a cerca de 10 % do volume do reactor (Pereira, 2001).

O reactor de vidro tinha 1 L de capacidade máxima e a sua agitação foi promovida pela colocação do reactor sobre uma placa de agitação magnética de velocidade regulável e introdução de uma barra magnética adequada no seu interior. O arejamento do reactor foi conseguido pela entrada de ar atmosférico fornecido por um arejador de aquário de caudal regulável. O ar, antes de entrar no reactor, era esterilizado por filtração membrana (Acrodisco).

O reactor foi, previamente, esterilizado em autoclave a 121 °C, durante 30 min, já contendo meio de cultura tamponado, bem como a barra magnética para posterior agitação, e tendo já instalado e devidamente acondicionado o tubo dispersor de oxigénio para promoção do arejamento e os tubos em silicone necessários para a alimentação e arejamento do reactor.

Após inoculação, o reactor operou em modo descontínuo durante cerca de 12 h, de forma a obter-se uma concentração celular elevada. Findo este tempo, o reactor passou a operar em modo contínuo pela alimentação de meio de cultura fresco ao reactor através de uma bomba peristáltica. Sempre que necessário, foram adicionadas à cultura 1 a 3 gotas de agente anti-espuma de silicone (Merck 7743). O nível do reactor foi mantido constante pela saída do excesso de cultura microbiana para um reservatório fechado contendo hipoclorito de sódio comercial.

3.1.5 Preparação das culturas de células de *E. coli*, *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*

Para cada bactéria preparou-se, em condições assépticas, 100 mL de uma suspensão celular num matraz de 250 ml contendo meio de cultura tamponado (Tabela 3.3), inoculado com 25 ml de um pré-inóculo, obtido a partir da cultura da bactéria em caixa de Petri e incubando a 27 °C com agitação orbital (120 rpm), durante aproximadamente 15 h. A suspensão celular obtida encontrava-se em fase exponencial e pronta a ser utilizada nos ensaios posteriores.

Todo o material de vidro e restante material experimental em contacto com o meio de cultura e reagentes ou com amostras, excepto aqueles que foram adquiridos esterilizados, foram esterilizados em auto-clave a 121 °C, por um tempo mínimo de 15 min.

3.2 TESTES DE ADESÃO ESTÁTICA

3.2.1 Preparação das placas de adesão

Nos testes de adesão de células bacterianas, utilizaram-se placas de aço inoxidável (ASI 316) de dimensões 8 mm x 8 mm como superfície de teste. A opção pelo aço inoxidável baseou-se, essencialmente, no facto de grande parte dos equipamentos médicos serem fabricados com este material, para além desta liga metálica ser compatível com o biocida seleccionado para este estudo.

Previamente à sua utilização, as várias placas de aço inoxidável foram desengorduradas utilizando detergente comercial para remoção de gorduras e resíduos de matéria orgânica (An e Skowronski, 2000), lavadas abundantemente com água da torneira e reservadas em etanol (Pereira, 2001).

3.2.2 Adesão estática bacteriana às placas

A adesão estática foi promovida colocando em contacto, nos poços (10 mm de diâmetro) de uma placa de cultura celular (Greiner Labortechnik), a suspensão celular de cada estirpe bacteriana com a placa de aço inoxidável, durante um determinado período de tempo.

Para tal, numa primeira fase, retirou-se, em condições de assepsia, uma amostra de uma suspensão celular do reactor em contínuo, no caso da *P. fluorescens*, ou dos matrizes, no caso das restantes estirpes, e centrifugou-se, durante 5 min, a 5000 rpm, e a 10 °C. Rejeitou-se o sobrenadante e lavaram-se as células com tampão fosfato salino a pH=7 (PBS). O procedimento de lavagem, executado por centrifugação, foi repetido três vezes, sempre em condições de assepsia.

Para cada estirpe de bactérias, após o procedimento de lavagem, as células foram ressuspendidas em PBS para obter suspensões com concentrações celulares de $0,5 \times 10^8$ células/ml de *P. fluorescens*, 1×10^8 células/ml de *P. aeruginosa* e de *E. coli* e 2×10^8 células/ml de *S. epidermidis*, respectivamente. Destas suspensões, eram retiradas amostras de 2 ml e introduzidas em cada um dos 24 poços de uma placa de cultura de células estéril onde, previamente, foi colocada uma placa de aço inoxidável. As placas de cultura foram incubadas durante tempos variáveis ($1h \pm 5 \text{ min}$ a $5h \pm 5 \text{ min}$), a $27 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$, a 120 rpm, numa incubadora orbital. Os ensaios de adesão foram executados em triplicado para cada estirpe.

O objectivo destes ensaios foi determinar, para cada estirpe utilizada, o tempo de adesão das bactérias às placas de aço inoxidável necessário para obter uma cobertura de superfície de cerca de 10^6 células/cm². Este valor correspondia a menos de 500 células por imagem adquirida, número necessário para conseguir uma monocamada de células aderidas.

3.2.3 Protocolos de lavagem e de coloração das células aderidas para avaliação das células totais e viáveis

Lavagem

Após o tempo de adesão, retirou-se com uma micropipeta a suspensão bacteriana sobrenadante de cada poço da placa de cultura. Posteriormente, as placas de aço inoxidável com as células aderidas de cada poço foram lavadas cuidadosa e gentilmente com 5 mL de PBS, utilizando uma micropipeta e direccionando o jacto para as paredes de cada poço. O procedimento de lavagem das placas repetiu-se três vezes, tendo-se o cuidado de manter a superfície imersa em líquido durante a lavagem, de modo a evitar o movimento ar-líquido na interface que podia afectar as células aderidas.

Células totais

Para a contagem das células totais aderidas às placas de aço inoxidável, colocou-se, em cada poço da placa de cultura de células, 300 µl de DAPI e incubou-se, à temperatura ambiente, durante 30 min (escolhido após vários testes). Imediatamente a seguir, observou-se cada placa de aço por microscopia de epifluorescência usando o filtro de excitação a 470 nm. De cada placa de aço adquiriram-se 20 campos diferentes e registou-se cada imagem em suporte digital.

Células viáveis

Para a contagem de células viáveis usou-se o marcador L/D, anteriormente descrito no Capítulo 2. Em cada poço colocou-se 250 µl de SYTO 9 e 250 µl de iodeto de propídio (PI) e deixou-se a incubar no escuro, durante 15 min. Imediatamente a seguir, observou-se a placa por microscopia de epifluorescência usando o filtro de excitação 320-390 nm. De cada placa de aço analisaram-se 20 campos diferentes e guardou-se cada imagem em suporte digital. Saliente-se que este marcador perde rapidamente a fluorescência pelo que a observação foi efectuada imediatamente a seguir à coloração com L/D.

3.3 TESTES DE DESINFECÇÃO COM CÉLULAS ADERIDAS

Nestes testes de desinfecção as células foram expostas a um biocida, o orto-ftalaldeído (OPA), testando-se diferentes concentrações e diferentes tempos de exposição, na presença e na ausência de substâncias interferentes (BSA).

3.3.1 Biocida

O biocida utilizado foi o Cidex[®] OPA (Advanced Sterilization Products, Johnson & Johnson), uma solução cujo princípio activo é o orto-ftalaldeído. Esta solução biocida é comercializada para utilização em instalações de saúde que necessitam de um desinfectante de alto nível, alternativo aos outros aldeídos. Pode ser utilizado em laboratórios de endoscopia, unidades de tratamento ambulatorio, terapia respiratória e unidades de cirurgia dentária/geral.

3.3.2 Efeito da variação da concentração de OPA

Nos testes de desinfeção, as concentrações de OPA testadas foram de 0.05 % (p/v), 0.075 % (p/v), 0.1 % (p/v), 0.125 % (p/v), 0.25 % (p/v), 0.55 % (p/v), pertencendo as duas primeiras, segundo o fabricante, a um intervalo não activo e as duas últimas a um intervalo activo, para um tempo de contacto de 5 min. A concentração da solução do produto a testar deve ser 1,25 vezes a concentração requerida no teste (EN 1276, 1997).

As soluções foram preparadas em balões volumétricos de 100 ml por diluição com água destilada esterilizada, da solução – mãe de OPA comercial, cuja concentração de produto activo é 0,55 % (p/v).

Os testes de desinfeção com células aderidas iniciaram-se com a realização da adesão de células bacterianas às placas de aço inoxidável, como descrito no ponto 3.2.2. A placa de aço inoxidável com células aderidas presente em cada poço da placa de cultura de celular foi lavada como descrito no ponto 3.2.3. Após a lavagem, adicionou-se a cada poço 2,0 ml do desinfectante OPA com a concentração a testar, e deixou-se actuar durante 5 min, como aconselhado pela Norma Europeia EN 1276 e pelo fabricante do OPA. Uma das placas de aço inoxidável com células aderidas não foi sujeita ao ensaio de desinfeção funcionando como controlo do ensaio, tendo ao poço contendo esta placa sido adicionados 2 ml de água destilada esterilizada. Após o tempo de exposição ao biocida, procedeu-se novamente à lavagem da placa de aço inoxidável, à qual se seguiu a coloração como descrito no ponto 3.2.3.

3.3.3 Efeito do tempo de exposição ao OPA

Para o estudo do efeito de diferentes tempos de exposição na acção antimicrobiana do OPA seguiram-se os procedimentos descritos no ponto 3.3.2. Para diferentes concentrações de OPA (0.05, 0.075 e 0.1 % p/v) variou-se o tempo de exposição das células aderidas ao biocida (5, 7 e 10 min).

De salientar que este estudo só foi efectuado com células aderidas de *P. fluorescens*.

3.3.4 Efeito da presença de substâncias interferentes na acção do OPA

As condições escolhidas para avaliar a eficácia do biocida reflectem parâmetros que são encontradas em situações práticas reais e que podem influenciar a acção de anti-sépticos e desinfectantes.

Simularam-se *condições limpas* (condições representativas das superfícies que receberam um programa de limpeza satisfatório e/ou sabe-se que contêm níveis mínimos de materiais quer orgânicos quer inorgânicos) o que, de acordo com a norma europeia EN 1276:1997, se obtém pela adição de uma solução de albumina de soro bovino (BSA) à suspensão celular aquando dos testes de adesão, de modo a obter uma concentração de BSA de 0.3 g/L. Simularam-se, ainda, *condições sujas* que, de acordo com a mesma Norma Europeia, se obtém pela adição de uma solução de albumina de soro bovino à suspensão celular a ser utilizada nos testes de adesão, de forma a obter uma concentração de BSA de 3 g/L.

Preparação das soluções de BSA

Para a simulação das condições limpas, dissolveram-se 0,3 g de albumina de soro bovino (Merk) em 1000 ml de água destilada. De seguida a solução foi esterilizada por filtração em membrana. Para a simulação de condições sujas procedeu-se do mesmo modo mas utilizando 3 g de albumina bovina. Estas soluções foram utilizadas para preparar suspensões celulares com 0.3 g/L e 3 g/L de albumina de soro bovino, respectivamente.

Protocolo de teste de desinfecção com substâncias interferentes

Para o estudo do efeito de BSA na acção do OPA, o procedimento experimental efectuado foi similar ao descrito no ponto 3.3.2. O procedimento de adesão foi semelhante ao descrito no ponto 3.2.2, com excepção de que a cada poço da placa de cultura foram adicionados 2 ml de suspensão celular contendo 0.3 g/L e 3 g/L de albumina de soro bovino, de forma a promover a adesão em condições limpas e em condições sujas, respectivamente.

3.3.5 Avaliação da percentagem de sobrevivência de células aderidas

O efeito do OPA na viabilidade das células aderidas das quatro estirpes bacterianas foi avaliado quantitativamente em termos de percentagem de sobrevivência das células aderidas, para cada concentração de biocida e para cada intervalo de tempo estudado, tendo como

controlo o ensaio realizado na ausência de OPA. A percentagem de sobrevivência celular foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$\%Sobrevivência = \frac{NT - NM}{NT} \times 100$$

em que NT representa o número total de células aderidas por cm² (soma das células vivas e das células mortas) e NM o número de células mortas aderidas por cm², determinados após coloração com L/D.

3.4 TESTES DE DESINFECÇÃO COM CÉLULAS EM SUSPENSÃO

Para a avaliação do efeito antimicrobiano do biocida em células em suspensão, utilizaram-se os métodos descritos na Norma Europeia EN 1276:1997, com a finalidade de testar a actividade antimicrobiana do produto.

3.4.1 Protocolo dos testes de desinfecção realizados com células em suspensão

Num tubo de ensaio esterilizado, adicionaram-se 2,0 ml da suspensão celular (obtida de acordo com o procedimento descrito em 3.2.2 para preparação das células para os ensaios de adesão), contendo $1,5 \times 10^8$ cfu/ml, a 8,0 ml da solução de OPA com a concentração a testar. Agitou-se vigorosamente durante 10 s num vórtex e deixou-se em repouso durante 5 min. Após este tempo de contacto, pipetou-se 2,0 ml da mistura de teste para novos tubos de ensaio esterilizados e adicionou-se 8,0 ml de solução neutralizante. O neutralizante utilizado foi uma solução aquosa de tiosulfato de sódio com uma concentração de 5 g/L. Agitou-se a mistura num vórtex durante 10 s e deixou-se em repouso durante 5 min, para neutralizar a acção do biocida.

Após a neutralização do OPA, a suspensão celular foi filtrada utilizando uma membrana negra (Nucleopore). Seguidamente, as células foram coradas com L/D e observadas por microscopia de epifluorescência.

3.4.2 Teste de desinfecção realizados com células em suspensão na presença de BSA

Pipetou-se 1,0 ml de solução de BSA, para um tubo de ensaio esterilizado. Adicionou-se 1,0 ml da suspensão celular contendo $1,5 \times 10^8$ cfu/ml. A mistura foi agitada durante 2 min. Após este tempo, adicionaram-se 8,0 ml da solução de OPA com uma determinada concentração. Agitou-se novamente e deixou-se em repouso durante 5 min.

Após este tempo de contacto, pipetou-se 2,0 ml da suspensão de teste e adicionou-se 8,0 ml de neutralizante. O neutralizante utilizado foi uma solução aquosa de tiosulfato de sódio a 5 g/L. Agitou-se tendo-se deixado a neutralização a decorrer durante 5 min.

Após a neutralização do OPA, a suspensão celular foi filtrada por uma membrana negra (Nucleopore). No final, as células foram coradas com L/D e observadas por epifluorescência.

3.4.3 Avaliação da percentagem de sobrevivência de células em suspensão

O efeito do OPA na viabilidade das células em suspensão das quatro estirpes bacterianas foi avaliado quantitativamente em termos de percentagem de sobrevivência das células em suspensão, para cada concentração de biocida e para cada intervalo de tempo, tendo como controlo o ensaio realizado com células em suspensão na ausência de OPA. Os resultados, expressos em percentagem, foram determinados utilizando a seguinte equação:

$$\%Sobrevivência = \frac{NT - NM}{NT} \times 100$$

em que NT representa o número total de células em suspensão por cm² de membrana negra e NM o número de células mortas por cm² de membrana negra.

3.4.4 Cálculo da Concentração mínima bactericida

Para cada estirpe bacteriana e para cada condição testada calculou-se a concentração mínima bactericida (MBC – *minimum bactericidal concentration*), isto é, a concentração necessária para obter uma redução de 99 % no número de células viáveis.

3.5 QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS POR ANÁLISE DE IMAGEM

Neste trabalho optou-se pela contagem das células *in situ*, minimizando-se as alterações das células que ocorrem com outros métodos de quantificação e que, geralmente, requerem a remoção das células da superfície de adesão.

As amostras para quantificação celular foram obtidas dos ensaios de adesão, de desinfecção e dos testes com células em suspensão. Essas amostras foram coradas e observadas ao microscópio imediatamente depois.

Para a observação ao microscópio, as várias amostras coradas foram colocadas numa lâmina de vidro, cobertas com uma lamela (18x18 mm) e observadas num microscópio de epifluorescência Leitz (*Leitz, Stuttgart*). A ampliação utilizada foi de 630x, para todas as estirpes bacterianas e a fonte de luz foi mantida no valor mínimo.

A aquisição foi efectuada recorrendo a uma câmara de Cores *Sony (Hitachi, Tokyo)* com escala de 256 valores, equipada com uma placa de aquisição de imagens *Meteor (Matrox, Monreal)* e utilizando o *software Image-Pro 5 (Media Cybernetics, Analysis Software)*. O valor do contraste de aquisição foi de 200 % e da luminosidade de 150 %, definidos no *software* de aquisição *Image-Pro*.

Para cada amostra adquiriram-se 20 imagens que foram, posteriormente, tratadas pelo programa *Sigma Scan Pro (SPSS Inc.)* instalado num computador pessoal (*PC*). Um dos maiores potenciais do analisador de imagem “*Sigma Scan Pro*” é a sua capacidade de permitir realizar medições especiais sobre a imagem. Através do comando “*Measurement*” os objectos podem ser identificados, contados e medidos.

Quando o objectivo é contagem de objectos, estes são identificados pela sua intensidade. O ideal será que os objectos a identificar sejam perfeitamente distinguíveis do fundo e tenham uma gama de intensidade diferente da de outros elementos da imagem. Na Figura 3.1 apresenta-se um esquema da instalação para observação das amostras e aquisição das imagens.

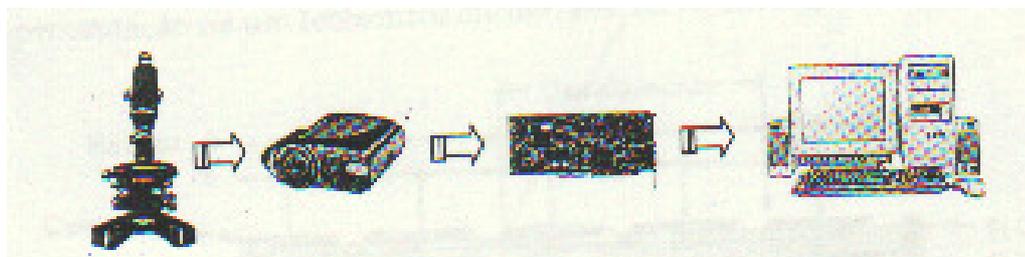


Figura 3.1 – Representação do sistema de aquisição de imagem.

Neste trabalho, os objectos foram células de *P. fluorescens*, *E.coli*, *P. aeruginosa* e *S. epidermidis*, quer aderidas nas placas de aço inoxidável nos ensaios de adesão e nos testes de desinfecção com células aderidas, quer nas membranas negras (Nucleopore) nos ensaios de desinfecção com células suspensas. Recorreu-se ao comando “*Área*”, que calcula a área em pixels ocupada por cada objecto. Entenda-se objecto como uma célula ou conjunto de células. A partir da *Área* global obtida para cada imagem, foi possível calcular o número de células aderidas no instante da aquisição da imagem.

As imagens digitalizadas no âmbito deste trabalho experimental, foram adquiridas com fundos escuros cuja intensidade variava de forma a obter uma melhor distinção entre objectos e fundo.

3.6 MÉTODOS ESTATÍSTICOS

Testes de significância baseados na distribuição de t de student

Com o intuito de testar os resultados obtidos durante a execução do trabalho prático, estes foram testados estatisticamente no sentido de verificar se as diferenças resultantes da variação dos parâmetros estudados, em relação aos verificados nos ensaios de controlo, poderiam ser consideradas estatisticamente significativas. Para tal, recorreu-se à distribuição *t* de *student* para comparação das médias obtidas em dois conjuntos de determinações em que os resultados de um conjunto podem ser emparelhados com os resultados de outro conjunto. Utilizou-se o método das diferenças testando-se a hipótese nula das diferenças entre as médias. Os resultados experimentais que apresentaram as diferenças entre os pares de valores, com níveis de confiança superiores a 95 %, foram considerados estatisticamente significativos.

Rejeição de dados experimentais baseados na Distribuição de t de student

Sempre que a análise dos resultados experimentais considerou que certos valores eram significativamente diferentes ou iguais entre si ou entre um valor de referência, recorreu-se à análise estatística de rejeição de dados experimentais. Esta análise estatística foi baseada na distribuição de *t* de *student*, em que para *n* resultados experimentais um dos resultados difere apreciavelmente dos restantes. Esse valor discrepante (*x*) pode ser rejeitado com níveis de confiança de 95 % e para *n*-2 graus de liberdade, se:

$$\left| \frac{x - \mu}{S_x} \right| > t_{0,95}$$

considerando que S_x é o desvio padrão e μ a média dos resultados não discrepantes.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sumário

Neste Capítulo apresentam-se os resultados experimentais correspondentes à aplicação do orto-ftalaldeído (OPA) às bactérias *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. epidermidi* em suspensão e aderidas a superfícies de aço inoxidável.

Os objectivos do trabalho foram a averiguação da eficácia de diferentes concentrações de biocida nas células aderidas ao aço e em suspensão e a avaliação do efeito da presença de albumina de soro bovino na eficiência antimicrobiana do OPA. Por fim estuda-se o efeito do tempo na eficácia antimicrobiana do biocida sobre células de *P. fluorescens* aderidas a aço inoxidável.

4.1	<i>Introdução</i>	51
4.2	<i>Adesão estática de células microbianas a aço inoxidável</i>	51
4.3	<i>Ensaio de desinfeção com células em suspensão</i>	56
4.4	<i>Ensaio de desinfeção com células aderidas</i>	59
4.5	<i>Avaliação do efeito do tempo de contacto na eficácia do biocida</i>	81

4.1 INTRODUÇÃO

A eficácia de substâncias antimicrobianas no controlo de microrganismos depende de vários parâmetros, nomeadamente, do tipo de microrganismo presente, do modo de crescimento do microrganismo -em suspensão ou aderido a superfícies-, da concentração do biocida, do tempo de exposição, do pH, da presença de substâncias interferentes, entre outros.

Com este trabalho pretendeu-se avaliar a eficácia de um biocida, utilizado em meio hospitalar, na inactivação de três espécies de bactérias gram-negativas e uma gram-positiva, aderidas a superfícies, na ausência e na presença de substâncias interferentes, em função da concentração de biocida. Para comparação, efectuaram-se também testes com bactérias em suspensão.

Para assegurar a reprodutibilidade dos ensaios foi optimizado, numa fase prévia, o tempo de adesão das bactérias à superfície, na ausência e na presença de BSA.

4.2 ADESÃO ESTÁTICA DE CÉLULAS MICROBIANAS A AÇO INOXIDÁVEL

4.2.1 Adesão de *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. epidermidis* a aço inoxidável

O objectivo destes ensaios foi determinar, para cada estirpe utilizada, o tempo de adesão das bactérias às placas de aço inoxidável necessário para obter uma cobertura de superfície de cerca de 10^6 células/cm². Este valor correspondia a menos de 500 células por imagem adquirida, número necessário para conseguir uma monocamada de células aderidas. Efectuaram-se ensaios de adesão com suspensões celulares de cada estirpe estudada, para diferentes tempos de contacto, de modo a determinar-se o tempo óptimo de adesão (concentração de bactérias aderidas da ordem de 10^6 células/cm²). As concentrações das suspensões celulares das várias estirpes utilizadas, ao longo de todo o trabalho, foram de 1×10^8 células/ml (DO_{640 nm} = 0.02) para a *P. fluorescens*, 1×10^8 células/ml (DO_{640 nm} = 0.01) para a *P. aeruginosa*, 1×10^8 células/ml (DO_{640 nm} = 0.01) para a *E. coli* e 1×10^8 células/ml (DO_{640 nm} = 0.01) para o *S. epidermidis* (Bruisma *et al.*, 2001; Lansgrud e Sundheim, 1998). Os resultados destes testes preliminares não são apresentados no âmbito deste trabalho, mas, a título de exemplo, apresentam-se na Figura 4.1 imagens digitalizadas de fotografias da superfície de aço colonizado com *P. fluorescens*, para diferentes tempos de contacto com a suspensão celular.

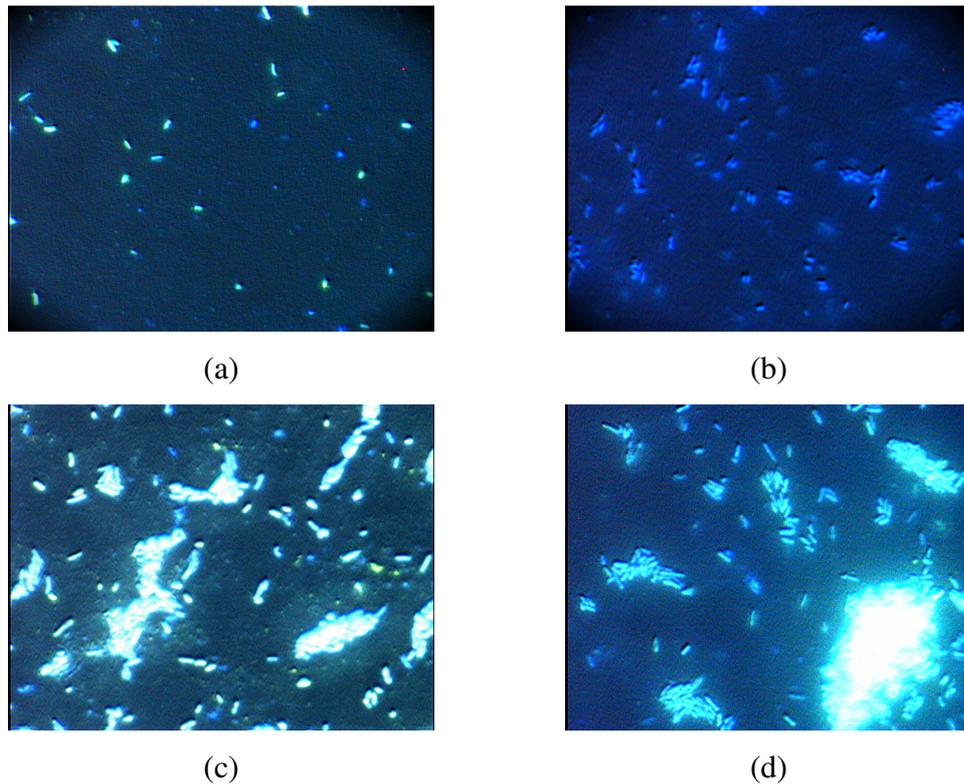


Figura 4.1 – Imagens digitalizadas de fotografias de microscopia obtidas por epifluorescência de células de *P. fluorescens* aderidas a placas de aço inoxidável, ao fim de diferentes tempos de contacto à suspensão celular. As células foram coradas com DAPI após um tempo de adesão de: 1 h (a), 2 h (b), 3 h (c), 5 h (d).

Pela análise da Figura 4.1 verifica-se que o número de células aderidas à superfície aumenta em função do tempo e que o tempo de adesão considerado óptimo para a *P. fluorescens* foi de 2 h, uma vez que a este período de tempo correspondeu uma cobertura de superfície adequada para os posteriores testes de desinfecção com células aderidas. Tal como se pode constatar pelas imagens, para tempos superiores a 2 h, deixa de se observar células em monocamada, passando a predominar aglomerados bacterianos que dificultam a observação e posterior contagem.

Para as restantes estirpes bacterianas, e com base em observações idênticas, o tempo de adesão considerado para obter a cobertura de superfície óptima foi de 1 hora.

Para averiguar a reprodutibilidade dos ensaios de adesão considerados óptimos, fizeram-se ensaios de adesão com as várias estirpes para o tempo óptimo de adesão. A Figura 4.2 apresenta, para cada uma das estirpes bacterianas, o número de células aderidas por cm^2 , para vários ensaios independentes.

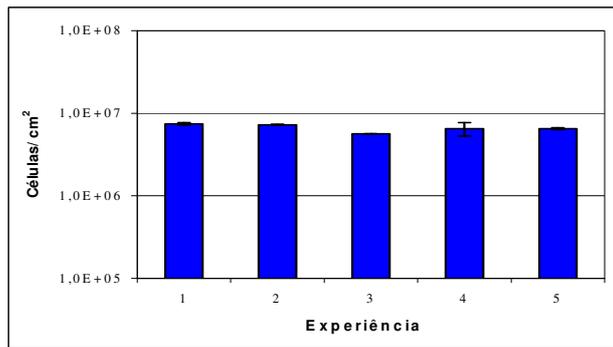
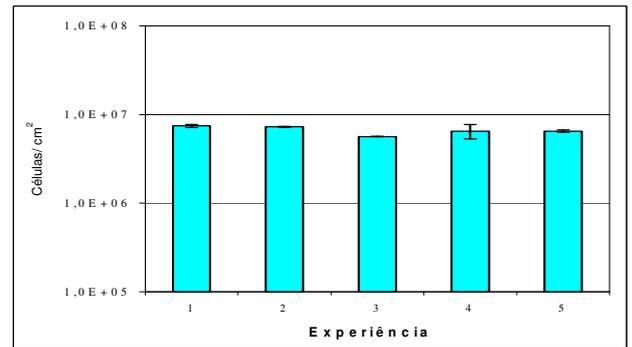
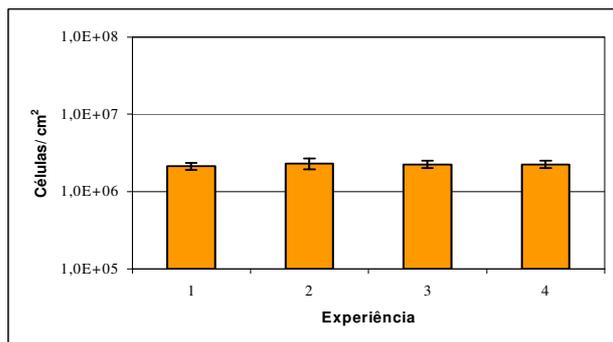
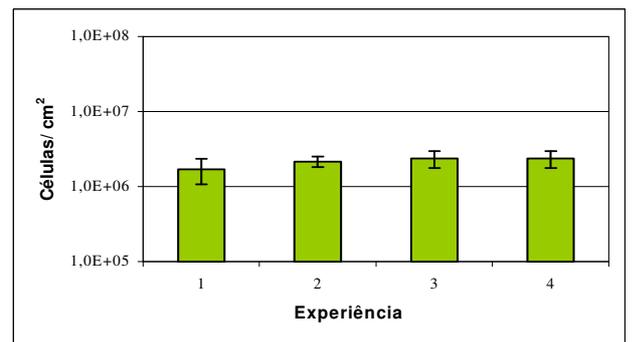
(a) *P. fluorescens*(b) *P. aeruginosa*(c) *E. coli*(d) *S. epidermidis*

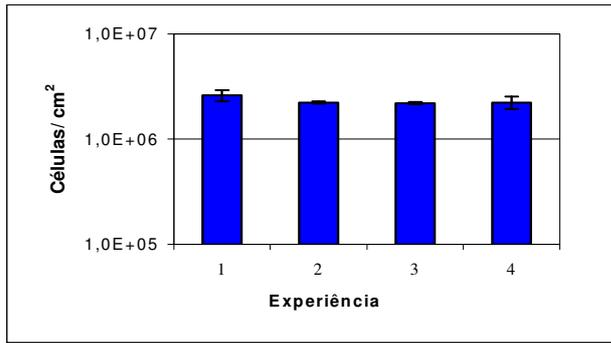
Figura 4.2 – Número médio de células de (a) *P. fluorescens*, (b) *P. aeruginosa*, (c) *E. coli*, (d) *S. epidermidis*, aderidas à superfície de aço inoxidável, por cm², após, respectivamente, 2 h e 1 h de adesão.

Pela observação da Figura 4.2, verifica-se que o número de células aderidas de cada estirpe por cm² não varia significativamente de ensaio para ensaio ($p > 0.05$) o que torna possível a comparação entre as várias situações práticas simuladas. Concluiu-se que o número de células aderidas não varia significativamente de estirpe para estirpe.

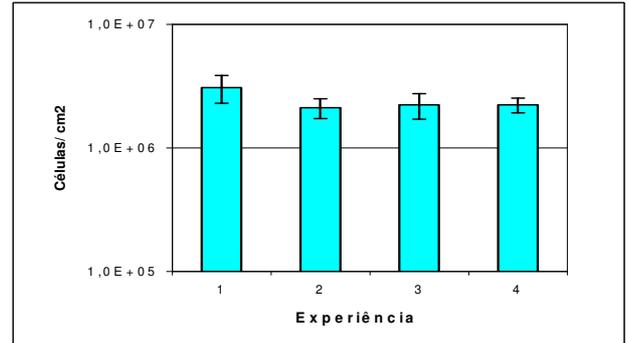
4.2.2 Efeito da BSA na adesão das bactérias a aço inoxidável

O potencial de interferência da presença de BSA na adesão de células bacterianas a superfícies metálicas foi avaliado através da quantificação do número de células aderidas ao aço inoxidável ao fim do mesmo tempo de adesão utilizado na ausência de BSA.

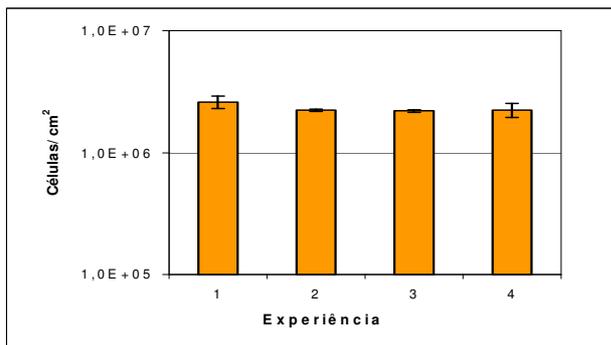
As Figuras seguintes apresentam o número médio de células aderidas por cm² para 4 experiências independentes, para as diferentes estirpes testadas, utilizando suspensões bacterianas com respectivamente 0,3 g/L de BSA (Figura 4.3) e 3 g/L de BSA (Figura 4.4).



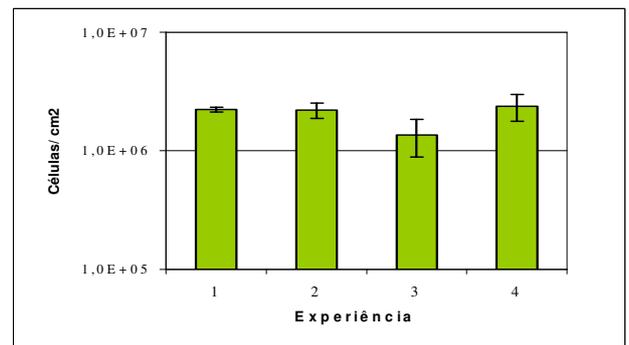
(a) *P. fluorescens*



P. aeruginosa

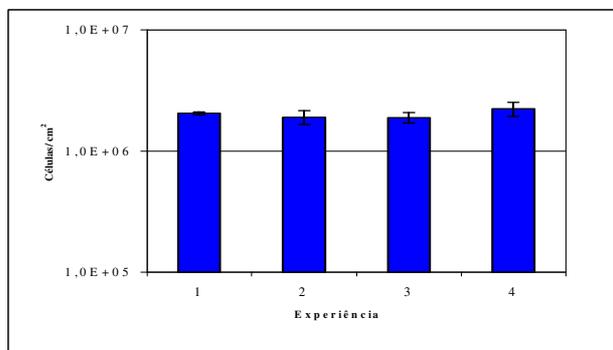


(c) *E. coli*

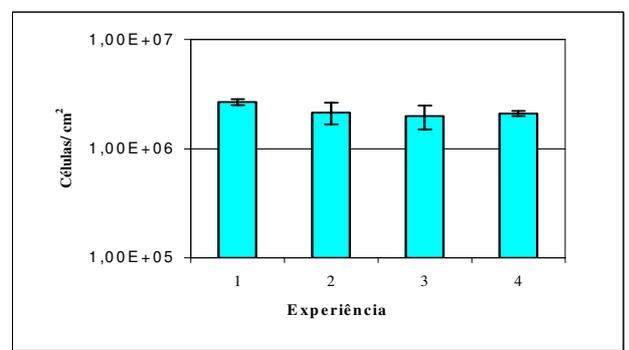


(d) *S. epidermidis*

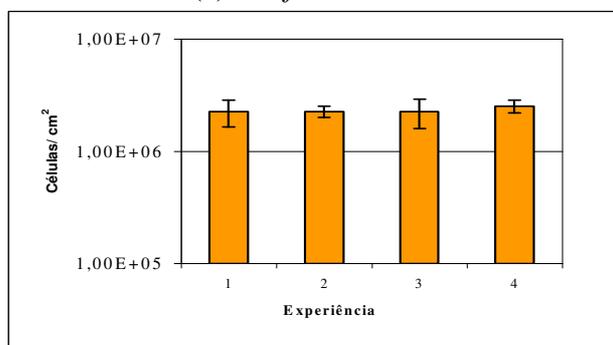
Figura 4.3 – Número médio de células de (a) *P. fluorescens*, (b) *P. aeruginosa*, (c) *E. coli*, (d) *S. epidermidis*, aderidas à superfície metálica por cm², na presença de 0,3 g/L de BSA



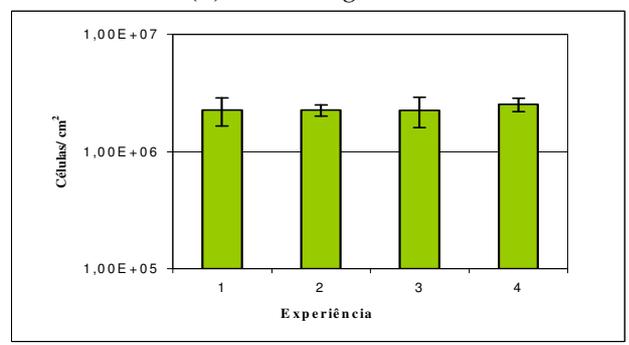
(a) *P. fluorescens*



(b) *P. aeruginosa*



(c) *E. coli*



(d) *S. epidermidis*

Figura 4.4 – Número médio de células de (a) *P. fluorescens*, (b) *P. aeruginosa*, (c) *E. coli*, (d) *S. epidermidis*, aderidas à superfície por cm², na presença de 3 g/L de BSA.

Pela análise das Figuras, verifica-se que o número de células de cada uma das estirpes aderidas à superfície não varia significativamente para o mesmo tipo de ensaio ($p > 0.05$), indicador da reprodutibilidade das experiências. Esta constatação foi reforçada pela Tabela 4.2 que sumaria o número médio de células aderidas à superfície de aço inoxidável, para cada uma das estirpes, na ausência e na presença de 0.3 e 3 g/L de BSA, respectivamente.

Tabela 4.2 – Número médio de bactérias aderidas ao aço, para cada estirpe, na ausência e na presença de 0.3 e 3 g/L de BSA, respectivamente.

Estirpe	Tempo adesão (h)	Nº médio de células aderidas/cm ² ausência de BSA	Nº médio de células aderidas/cm ² 0,3 g/L de BSA	Nº médio de células aderidas/cm ² 3 g/L de BSA
<i>P. fluorescens</i>	2	6.7×10^6	2.0×10^6	2.0×10^6
<i>P. aeruginosa</i>	1	2.5×10^6	2.4×10^6	2.2×10^6
<i>E. coli</i>	1	2.3×10^6	2.2×10^6	2.2×10^6
<i>S. epidermidis</i>	1	2.3×10^6	2.0×10^6	2.2×10^6

Comparando os resultados obtidos na presença de BSA com os resultados obtidos na ausência de BSA, verifica-se que a presença desta proteína, nas condições iniciais, parece não afectar significativamente a adesão das bactérias à superfície, diminuindo o número total de células aderidas por cm² em cerca de 29 %, 13 %, 4 % e 13 %, respectivamente, para *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. epidermidis*. O número médio de células de cada estirpe aderidas à superfície para as duas concentrações de proteína não apresenta diferenças significativas entre si ($p > 0.05$).

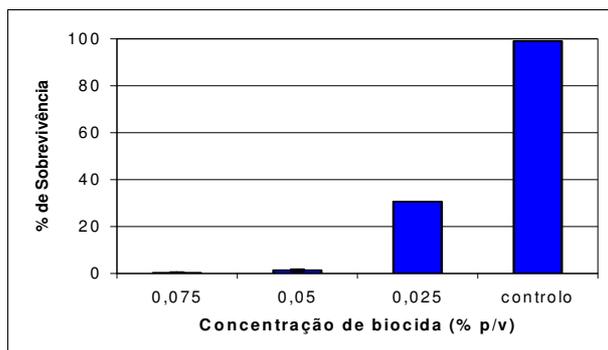
A BSA pode diminuir a adesão das bactérias devido à sua adsorção às superfícies, tal como referido por Cunliffe *et al.* (1999) quando avaliaram o efeito da adesão de *L. monocytogenes* a superfícies pré-incubadas com BSA e por Rubio *et al.* (2002) na adesão de *P. fragi* a aço inox condicionado por BSA. No presente trabalho, as bactérias e a BSA estiveram simultaneamente em contacto com a superfície, mas como o processo de adsorção das proteínas às superfícies é um processo muito mais rápido que a adesão dos microrganismos, pode considerar-se semelhante à pré-incubação da superfície com as proteínas. A monocamada de proteínas adsorvidas à superfície vai assim condicionar o processo de adesão, pois o material torna-se menos hidrofóbico.

Porém, as proteínas, também, podem influenciar a adesão de bactérias à superfície de aço após a ligação com a parede celular, pelo que os resultados obtidos podem não ser comparáveis com os dos autores referidos anteriormente.

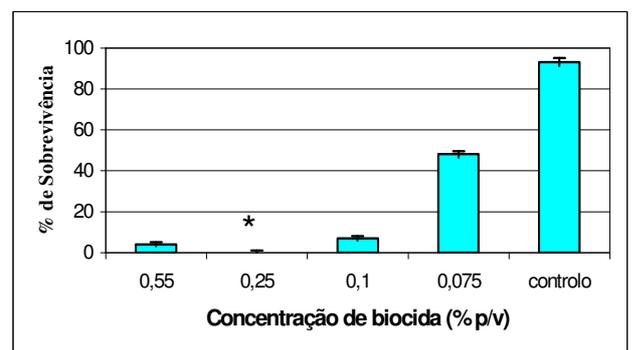
A redução de adesão é somente mais evidente no caso da *P. fluorescens* o que pode ser atribuído ao maior tempo de contacto das células bacterianas e das proteínas com a superfície. Para além do menor tempo de contacto que se observou nas restantes estirpes e que pode ter influenciado o processo de adesão, podem ainda estar envolvidos outros mecanismos de adesão que superam a influência das proteínas.

4.3 ENSAIOS DE DESINFECÇÃO COM CÉLULAS EM SUSPENSÃO

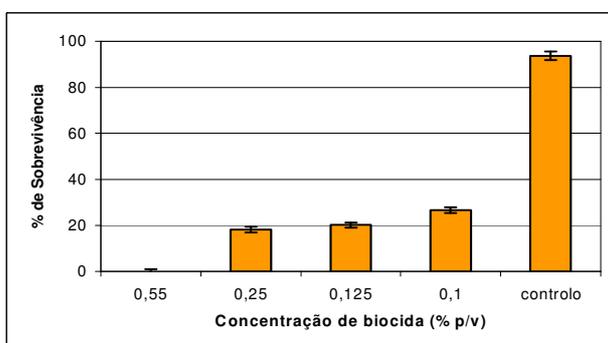
Os testes de eficácia do biocida com células em suspensão incluíram o estudo do comportamento das diferentes estirpes bacterianas para diferentes concentrações de OPA após contacto de 5 min. A percentagem de sobrevivência das bactérias, calculada como descrito no ponto 3.4.3, apresenta-se na Figura 4.6.



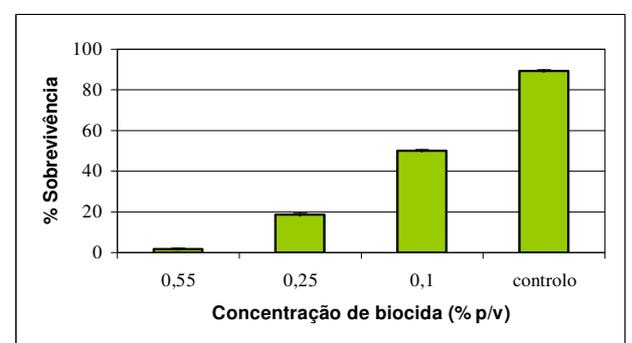
(a) *P. fluorescens*



(b) *P. aeruginosa*



(c) *E. coli*



(d) *S. epidermidis*

Figura 4.6 – Sobrevivência de células de (a) *P. fluorescens*, (b) *P. aeruginosa*, (c) *E. coli* e (d) *S. epidermidis* em suspensão após 5 min de contacto com diferentes concentrações de OPA (0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.25 e 0.55 (% p/v)). O asterisco indica que as células não sobreviveram.

A análise da Figura 4.6 permite verificar que, em qualquer uma das situações, à medida que a concentração de OPA utilizado aumenta a percentagem de sobrevivência celular diminui.

No caso da *P. fluorescens* (Figura 4.6 (a)), verifica-se que para uma concentração de OPA de 0.025 % (p/v) e para um tempo de exposição ao biocida de 5 min, ainda existe uma sobrevivência aproximada de 31% das células em suspensão. Contrariamente, para valores acima desta concentração a sobrevivência bacteriana baixa drasticamente. Conclui-se, então, que para células de *P. fluorescens* em suspensão, e na gama de concentrações testada, 0.075 % (p/v) de OPA é a concentração mínima bactericida (MBC), isto é, a concentração necessária para obter uma redução de 99 % no número de células vivas. Para um grau de confiança de 95 %, concluiu-se que a percentagem de sobrevivência resultante da aplicação de 0.025 % (p/v) é significativamente diferente das percentagens obtidas para as concentrações de 0.05 % (p/v) e 0.075 % (p/v) ($p < 0.05$). Adicionalmente, verificou-se ainda que as diferenças observadas entre os valores das percentagens de sobrevivência obtidas com as outras concentrações (0.05 % (p/v) e 0.075 % (p/v)) não são significativas entre si.

A análise da Figura 4.6 (b) mostra que para as células de *P. aeruginosa*, e na gama de concentração testada, 0.25 % (p/v) de OPA é a concentração mínima bactericida (MBC). Contrariamente ao esperado, para uma concentração de 0.55 % de OPA uma percentagem de células em suspensão ainda continua viável (cerca de 4 %). Porém, constatou-se que as diferenças observadas entre os valores das percentagens de sobrevivência obtidas entre as concentrações 0.25 % (p/v) e 0.55 % (p/v) de OPA não são estatisticamente significativas entre si. Verificou-se ainda que para um grau de confiança de 95 %, a percentagem de sobrevivência resultante da aplicação de 0.25 % (p/v) é significativamente diferente das percentagens obtidas para as concentrações de 0.1 % (p/v) e 0.075 % (p/v) ($p < 0.05$).

A Figura 4.6 (c) mostra que no caso de células de *E. coli* e para as concentrações de OPA testadas, a concentração mínima bactericida (MBC) é de 0.55 % (p/v). As percentagens de sobrevivência foram comparadas estatisticamente e concluiu-se que o valor de sobrevivência para a concentração de 0.55% é significativamente diferente ($p < 0.05$) quando comparado com a percentagem de sobrevivência dos restantes ensaios, enquanto que os valores obtidos para as concentrações 0.25 % (p/v), 0.125 % (p/v) e 0.1 % (p/v) não apresentam diferenças significativas entre si apesar de serem muito inferiores ao valor obtido para o controlo.

Pela análise da Figura 4.6 (d) observa-se que para uma concentração 0.25 % (p/v) de OPA, e para um tempo de contacto de 5 min, ainda existe uma sobrevivência significativa (cerca de 19 %) de células de *S. epidermidis*. Verifica-se, também, que para uma concentração de OPA de 0.55 % (p/v) e para um tempo de exposição de 5 min a percentagem de sobrevivência é ainda de 2 %, não sendo suficiente para inviabilizar a totalidade das células.

Conclui-se, tal como foi referido por vários autores (McDonell e Russel, 1999) que a concentração de biocida é um parâmetro importante na inviabilização de células bacterianas.

Apresenta-se, a seguir, uma tabela resumo com as MBC de OPA para as diferentes estirpes bacterianas estudadas.

Tabela 4.5 - Concentrações mínimas bactericidas (MBC) do OPA para cada uma das estirpes em suspensão

Bactéria	MBC (% p/v)
<i>P.fluorescens</i>	0.075
<i>P.aeruginosa</i>	0.25
<i>E.coli</i>	0.55
<i>S.epidermidis</i>	> 0.55

Os resultados obtidos mostram que a *P.fluorescens* tem um valor de MBC bastante menor que os valores de MBC das outras estirpes bacterianas.

Esta Tabela permite concluir que no presente estudo não se encontrou maior resistência ao biocida no caso das bactérias gram-negativas quando comparadas com as gram-positivas, como pode sugerir a Tabela 2.11 da hierarquia da susceptibilidade à acção dos biocidas que indica as bactérias gram-positivas como menos resistentes à acção dos biocidas, devido à constituição da sua parede celular. Estes resultados vão de encontro aos de Walsh *et al.* (1998) que mostraram que, contrariamente ao GTA, o OPA actua indiferenciadamente nas bactérias gram-negativas e gram-positivas.

Os resultados obtidos mostram que para as mesmas condições de trabalho, o tipo de bactéria influencia a eficácia do biocida, pelo que se encontram diferentes valores de MBC para as diferentes estirpes.

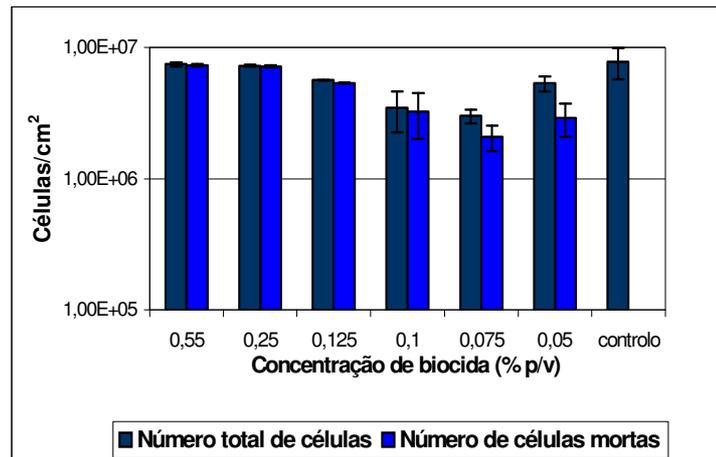
Os testes em suspensão podem não reflectir as verdadeiras condições de uso, pois as bactérias, para além de existirem livres no meio líquido, aderem frequentemente às superfícies (Holah *et al.*, 1998), podendo adoptar, nesta situação, um comportamento diferente face a um factor agressivo externo, que lhes pode conferir maior resistência aos biocidas. Torna-se, então, importante conhecer a eficácia dos biocidas em células aderidas.

4.4 ENSAIOS DE DESINFECÇÃO COM CÉLULAS ADERIDAS

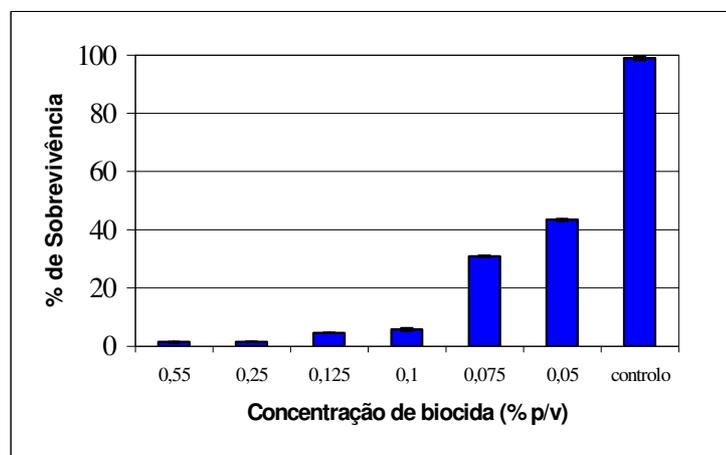
4.4.1 Influência da concentração do biocida

Para avaliar a eficácia do OPA na inviabilização de bacterias aderidas a aço inoxidável, realizaram-se ensaios de desinfecção com células aderidas (concentração média de células aderidas à superfície de aço inoxidável de 6.7×10^6 de células/cm²), utilizando diferentes concentrações de OPA (entre 0.05 % (p/v) e 0.55 % (p/v)) para um tempo de exposição das células ao biocida de 5 min. Os resultados obtidos para as várias estirpes estudadas apresentam-se em termos do número total de células aderidas e do número de células aderidas mortas e em percentagem de sobrevivência.

Na Figura 4.7, apresentam-se os resultados dos testes de inactivação de células de *P. fluorescens* aderidas ao aço inoxidável, quando expostas a concentrações de OPA que variaram entre 0 (controlo) e 0.55 % (p/v).



(a)



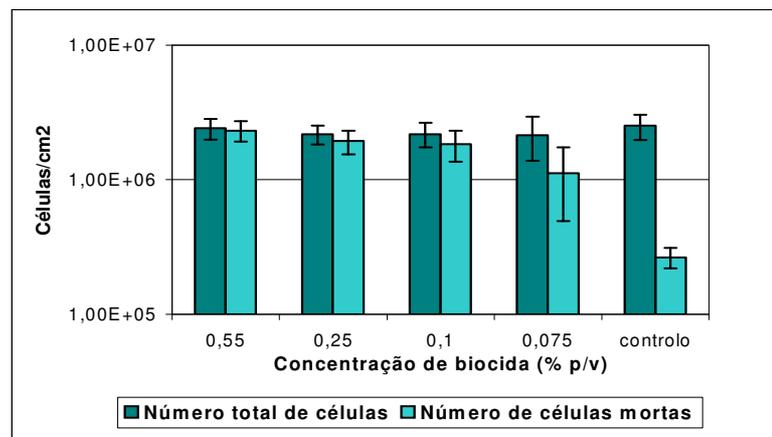
(b)

Figura 4.7 – Efeito do OPA sobre células de *P. fluorescens* aderidas ao aço inoxidável durante 2 h: (a) número total de células aderidas e número de células aderidas mortas, (b) percentagem de sobrevivência.

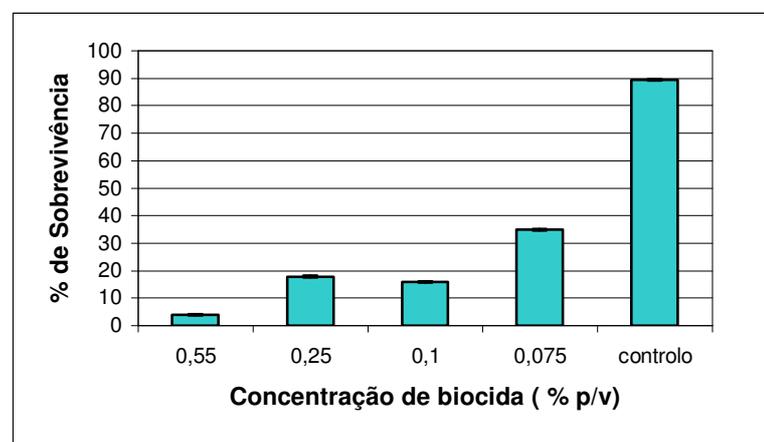
A análise da Figura 4.7 permite constatar que a aplicação do biocida reduz a viabilidade das células *P. fluorescens* e que a percentagem de sobrevivência das células aderidas diminui quando aumenta a concentração de OPA. As percentagens de sobrevivência diferem ($p < 0.05$) para cada uma das concentrações de OPA, quando comparadas com a percentagem de sobrevivência na ausência de OPA (controle), embora não haja diferenças significativas entre as percentagens de sobrevivência obtidas com as concentrações de OPA de 0.125 % (p/v) e 0.1 % (p/v) e entre as percentagens de sobrevivência para as concentrações 0.25 % (p/v) e 0.55 % (p/v), respectivamente. A concentração mínima bactericida (MBC) do OPA para *P. fluorescens* aderidas é 0.25 % (p/v).

Verifica-se, também, que para concentrações baixas de OPA (< 0.1 % (p/v), a percentagem de sobrevivência das células de *P. fluorescens* depende fortemente da concentração de OPA utilizado. Refira-se, então, que a concentração do biocida é um factor importante na sua acção antimicrobiana, tal como já referido por outros autores (McDonell e Russel, 1999).

Na Figura 4.8, apresentam-se os resultados dos testes de inactivação de células de *P. aeruginosa* aderidas ao aço inoxidável, quando expostas a concentrações de OPA que variaram entre 0 (controlo) e 0.55 % (p/v).



(a)



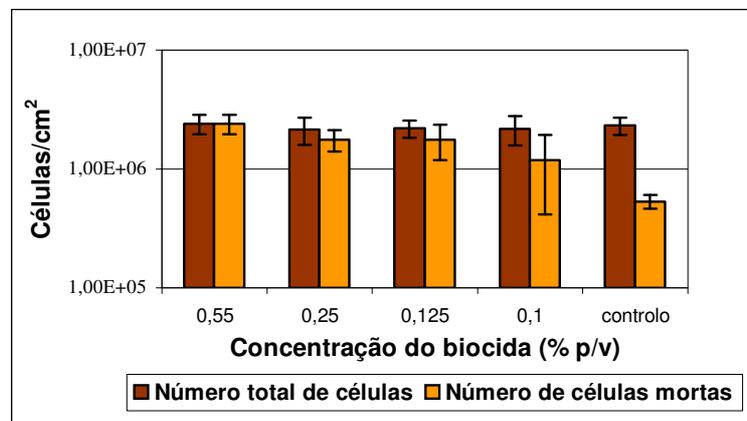
(b)

Figura 4.8 – Efeito do OPA em células de *P. aeruginosa* aderidas ao aço inoxidável durante 1 h, (a) número total de células aderidas e número de células aderidas mortas, (b) percentagem de sobrevivência.

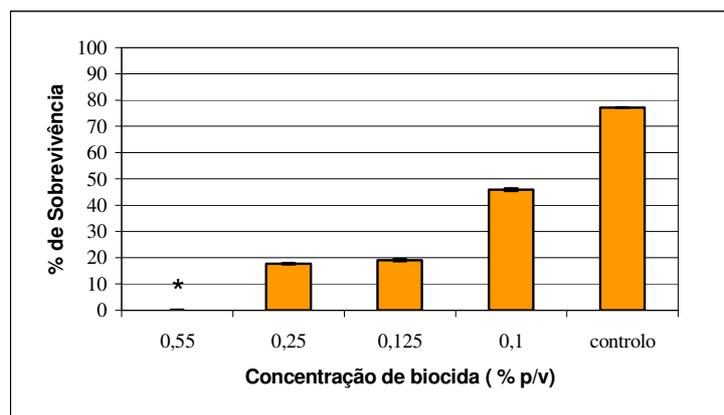
Pela análise da Figura 4.8 observa-se, tal como no caso anterior, que o número de células aderidas mortas aumenta em função da concentração de OPA. Observando a Figura 4.8 (b) verifica-se que a percentagem de sobrevivência parece aumentar ligeiramente quando a concentração de OPA aumenta de 0.1 % (p/v) para 0.25 % (p/v), contrariamente ao que era esperado.

No entanto, estatisticamente não há diferenças significativas entre os resultados da aplicação das duas concentrações ($p > 0.05$). A concentração mínima bactericida (MBC) das *P. aeruginosa* aderida é superior a 0.55 % (p/v).

Na Figura 4.9, apresentam-se os resultados dos testes de desinfecção com células de *E. coli* aderidas ao aço inoxidável, quando expostas a uma gama de concentrações de OPA entre 0 (controlo) e 0.55 % (p/v).



(a)

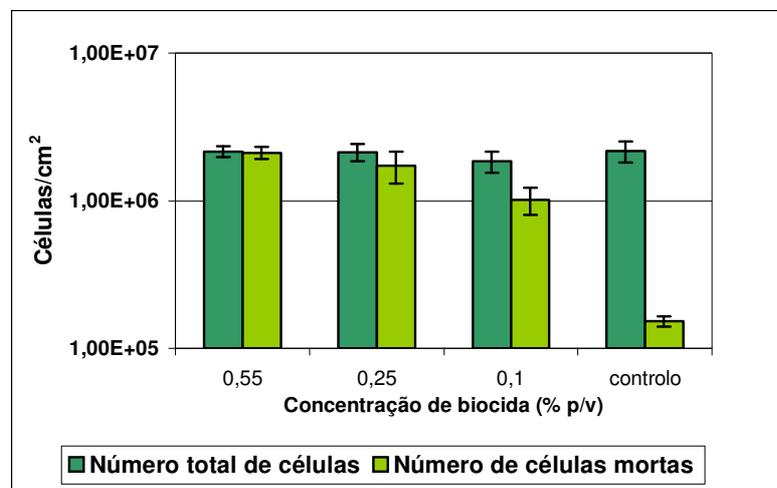


(b)

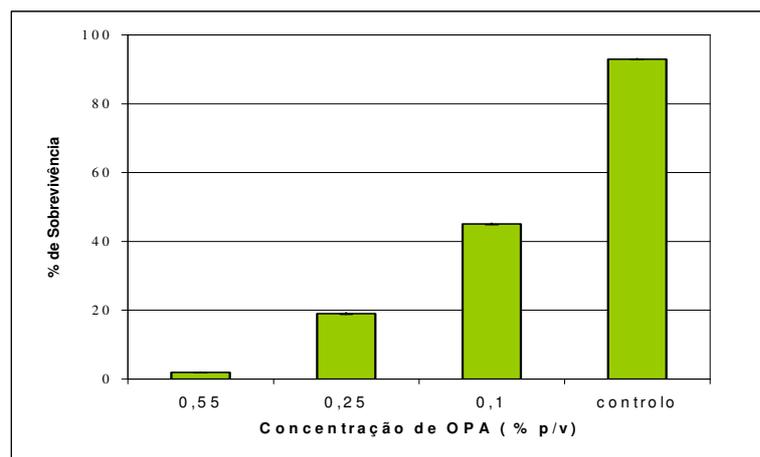
Figura 4.9 – Efeito do OPA em células de *E. coli* aderidas ao aço inoxidável durante 1 h, (a) número total de células aderidas e número de células aderidas mortas, (b) percentagem de sobrevivência.

Esta Figura indica, mais uma vez que a viabilidade das células aderidas de *E. coli* depende da concentração de OPA, pois a percentagem de sobrevivência das células diminui com o aumento da concentração de OPA. Verifica-se que a percentagem de sobrevivência difere para cada uma das concentrações quando comparada com o controlo, embora não haja diferenças significativas entre as concentrações de 0.125 % (p/v) e 0.25 % (p/v) ($p < 0.05$). A concentração mínima bactericida (MBC) do OPA para a *E.coli* aderida é, então, 0.55% (p/v)

Na Figura 4.10, apresentam-se os resultados dos testes de eficácia do biocida em células aderidas de *S. epidermidis* durante 1 hora à superfície do aço inoxidável e posteriormente expostas durante 5 min a 3 concentrações diferentes de OPA (0.55 % (p/v), 0.25 % (p/v) e 0,1 % (p/v)).



(a)



(b)

Figura 4.10 – Efeito do OPA em células de *S. epidermidis* aderidas ao aço inoxidável durante 1 h, (a) número total de células aderidas e número de células aderidas mortas, (b) percentagem de sobrevivência.

A análise desta Figura permite constatar, tal como nos casos anteriores, que a aplicação do biocida reduz a viabilidade das células de *S. epidermidis* e que a percentagem de sobrevivência das células aderidas de *S. epidermidis* diminui com o aumento da concentração de OPA. As percentagens de sobrevivência diferem para cada uma das concentrações quando comparadas com a percentagem de sobrevivência na ausência de OPA (o controlo), com um grau de confiança de 95 %. A concentração mínima bactericida (MBC) do OPA para células de *S. epidermidis* aderidas é maior do que 0.55% (p/v).

Os resultados apresentados nas Figuras 4.7, 4.8, 4.9 e 4.10 mostram, também, que a utilização do OPA não diminuiu o número de células aderidas à superfície, mesmo quando se observa a sua morte. Pode, então, concluir-se que o OPA não tem capacidade de remoção celular das superfícies. Este resultado pode ter implicações sérias num enquadramento real pois as superfícies, mesmo após tratamento, podem ser reservatórios preferenciais para a acumulação de microrganismos, fontes adicionais de carbono, fomentar o aparecimento de microrganismos patogénicos e, pelo aumento que provocam na carga orgânica na superfície, interferir nos processos de desinfecção.

Na Tabela 4.6 apresentam-se as Concentrações Mínimas Bactericidas de OPA para cada uma das bactérias estudadas, quando as células estão aderidas e em suspensão.

Tabela 4.6 - Concentrações mínimas bactericidas (MBC) para cada uma das estirpes em suspensão e aderidas

Estirpe	MBC (% p/v) aderidas	MBC (% p/v) suspensão
<i>P. fluorescens</i>	0.25	0.075
<i>P. aeruginosa</i>	> 0.55	0.25
<i>E. coli</i>	> 0.55	0.55
<i>S. epidermidis</i>	> 0.55	> 0.55

Esta Tabela permite concluir que é mais difícil inactivar células aderidas do que células em suspensão. Para além disso, verifica-se que só para as concentrações mais elevadas de biocida é que é possível obter a inactivação total das bactérias aderidas.

Estes resultados vêm confirmar que o valor da MBC relativamente a um biocida, determinada por um método padrão, não é um valor fixo, pois depende do microrganismo e do ambiente onde este se encontra. A resposta do microrganismo ao biocida depende do ambiente físico-químico onde está inserido, nomeadamente da depleção de nutrientes, da taxa de crescimento e do crescimento em biofilme (ou aderido) numa superfície (Gilbert and Macbain, 2003).

A redução de susceptibilidade ao biocida das bactérias presente aderidas a superfícies pode estar associada com diversos factores incluindo a falta de nutrientes, a maior dificuldade do biocida atingir as células bacterianas, a interacção química entre o biocida e o biofilme e ainda com a presença de enzimas degradativas e químicos neutralizadores. No presente caso, as bactérias estão presentes há menos de 2 h na superfície o que torna pouco provável a presença de substâncias que podem reagir com o biocida. É possível, então, que a entrada das bactérias numa fase de crescimento diferente devido à falta de nutrientes possa ter aumentado a sua resistência ao biocida, para além da redução da área microbiana disponível para interacção com o biocida.

Com o objectivo de comparar o comportamento das quatro estirpes bacterianas após contacto com as diferentes concentrações de biocida, agruparam-se os resultados da sobrevivência dos diferentes tipos de células aderidas ao aço inoxidável após tratamento com várias concentrações de OPA, como se apresenta na Figura 4.11.

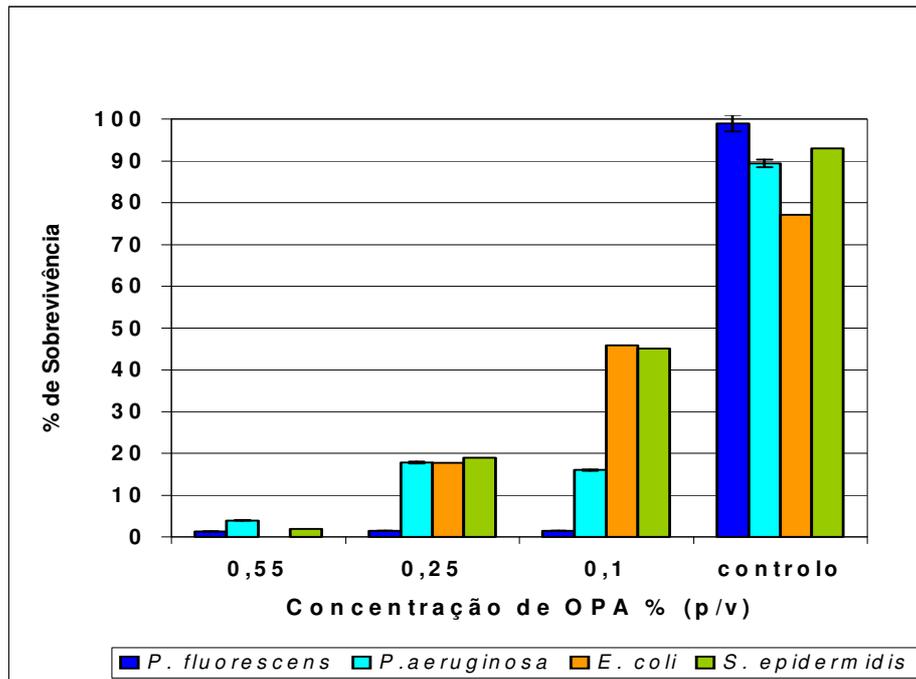


Figura 4.11 – Percentagem de sobrevivência de *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. epidermidis* aderidas, para diferentes concentrações de OPA

A análise da Figura 4.11 mostra que para as concentrações baixas de OPA, as estirpes de *S. epidermidis* e de *E. coli* são mais resistentes à acção antimicrobiana do biocida. Verifica-se, também, que o OPA é mais eficaz para todas as estirpes na concentração 0.55 % (p/v), apesar de, geralmente, não se verificar morte celular total (sobrevivência na gama de 1 % a 4 %). No entanto, à medida que se aumenta a concentração de OPA de 0.1 % (p/v) a 0.55% (p/v) reduz-se, significativamente, a viabilidade das células bacterianas, tal como constatado anteriormente.

Os valores da sobrevivência para cada estirpe em função da concentração OPA foram estatisticamente avaliados e verifica-se que apresentam diferenças significativas entre si. ($p < 0.05$). Comparando os valores da percentagem de sobrevivência da *P. fluorescens* com as outras estirpes, verificou-se que cada estirpe tem um comportamento próprio na presença de OPA, pelo que se conclui que a eficácia do OPA depende do tipo de microrganismo que se pretende inviabilizar e não se verifica a hierarquia de susceptibilidade (microrganismos gram-negativos mais resistentes do que os gram-positivos) mais comum, como foi referido anteriormente.

4.4.2 Efeito de substâncias interferentes na eficácia do biocida

Para averiguar se a presença de BSA nas suspensões celulares na fase de adesão alterava o desempenho antimicrobiano do biocida nas células aderidas, efectuaram-se ensaios de desinfecção com células aderidas em *condições limpas* (concentração de BSA de 0,3 g/L nas suspensões celulares) e em *condições sujas* (concentração de BSA de 3 g/L nas suspensões celulares).

4.4.2.1 Condições limpas

Para o estudo do efeito da substância interferente, em condições limpas, procedeu-se à adesão de células de *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. epidermidis* em aço inoxidável, na presença de 0,3 g/L de proteína, após o que se procedeu a testes de desinfecção com várias concentrações de OPA (0.55 % (p/v), 0.25 % (p/v) e 0.1 % (p/v)).

Os resultados obtidos, para as diferentes concentrações deste biocida e para as várias estirpes estudadas, apresentam-se em termos do número total de células aderidas e aderidas mortas e da percentagem de sobrevivência.

Nas Figuras 4.12, 4.13, 4.14 e 4.15, respectivamente, para *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. epidermidis*, são apresentados os resultados dos testes de desinfecção simulando condições limpas.

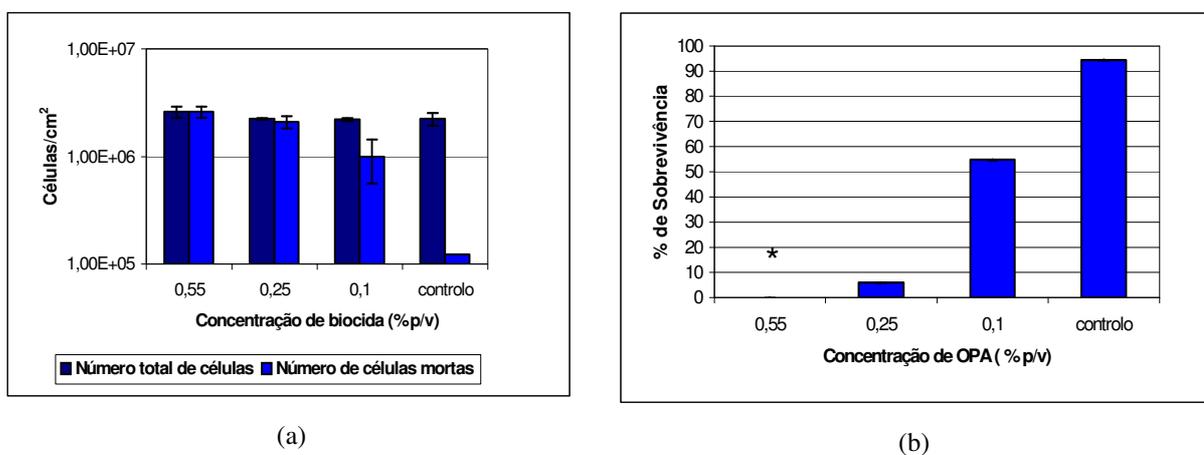


Figura 4.12 – Efeito do OPA em células de *P. fluorescens* aderidas durante 2 h ao aço inoxidável na presença de 0,3 g/L de BSA, (a) número total de células aderidas e número de células mortas aderidas, (b) percentagem de sobrevivência.

Conclui-se então, que para células *P. fluorescens* aderidas e na gama de concentrações de biocida testada, 0,55 % (p/v) de OPA é a concentração mínima bactericida, isto é, a concentração necessária para obter uma redução de 99% no número de células vivas. Esta constatação foi reforçada estatisticamente para um grau de confiança de 95 %. De salientar que no caso de ausência de BSA a MBC do OPA em células de *P. fluorescens* aderidas era igual a 0,25 % (p/v).

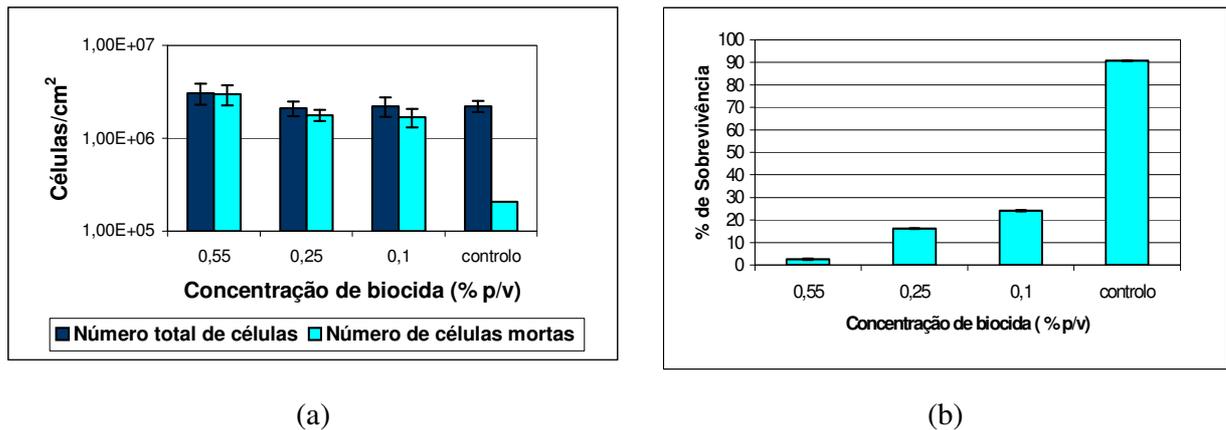


Figura 4.13 – Efeito do OPA em células de *P. aeruginosa* aderidas durante 1 h ao aço inoxidável na presença de 0,3 g/L de BSA, (a) – número total de células aderidas e número de células mortas aderidas, (b)- percentagem de sobrevivência.

No caso da *P. aeruginosa*, a Figura 4.13 (b) permite, também, verificar que a percentagem de sobrevivência diminui com o aumento da concentração de OPA. A comparação das médias obtidas para os vários resultados de percentagem de sobrevivência mostra que estes valores são estatisticamente diferentes entre si ($p < 0.05$) quando comparados com o controlo. No entanto, não há diferença significativa entre os resultados quando células aderidas de *P. aeruginosa* são expostas a concentrações de 0,25 % (p/v) e 0,1 % (p/v) de OPA durante 5 min. De salientar que para uma concentração de 0,55 % (p/v) de OPA e para um tempo de exposição ao biocida de 5 min, a percentagem de sobrevivência é, ainda, de 4 %.

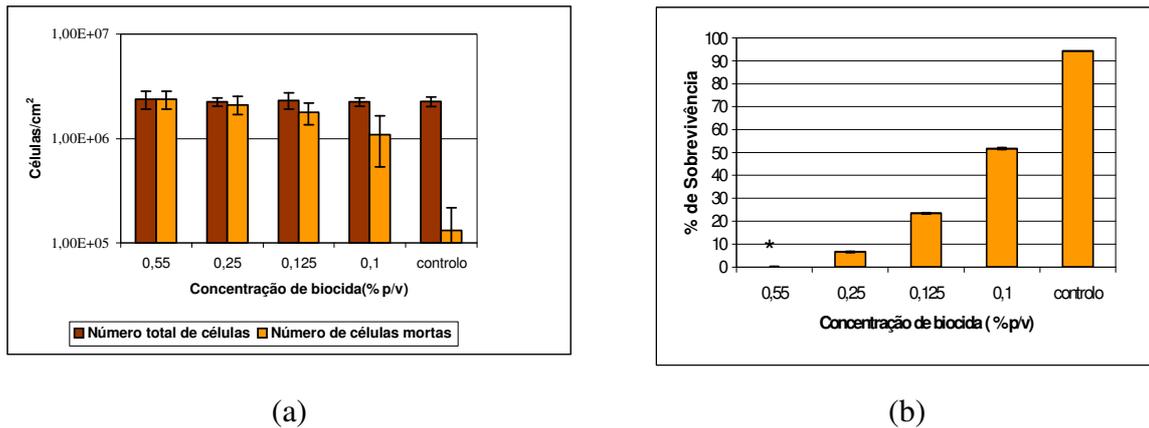


Figura 4.14 – Efeito do OPA em células de *E.coli* aderidas durante 1 h ao aço inoxidável na presença de 0,3 g/L de BSA, (a) – número total de células aderidas e número de células mortas aderidas, (b)- percentagem de sobrevivência. O asterisco indica que as células não sobreviveram.

A análise da Figura 4.14 (b) permite verificar que a percentagem de sobrevivência das células de *E. coli* aderidas diminui com o aumento da concentração de OPA à qual foram expostas. Efectivamente, a comparação das médias obtidas para os vários resultados mostra que os valores são estatisticamente diferentes quando comparados com o controlo e que há diferenças significativas ($p > 0.05$) entre os resultados das diferentes concentrações de OPA, pelo que há uma forte dependência entre a percentagem de sobrevivência das células aderidas de *E. coli* e a concentração de OPA à qual são expostas.

Pela comparação dos dados da Figura 4.14 (b) com a Figura 4.9 (b), verifica-se que para a concentração de 0.1 % (p/v) de OPA, o número de células mortas é menor na presença de BSA nas condições iniciais de adesão, o que traduz um ligeiro aumento da percentagem de sobrevivência das células aderidas.

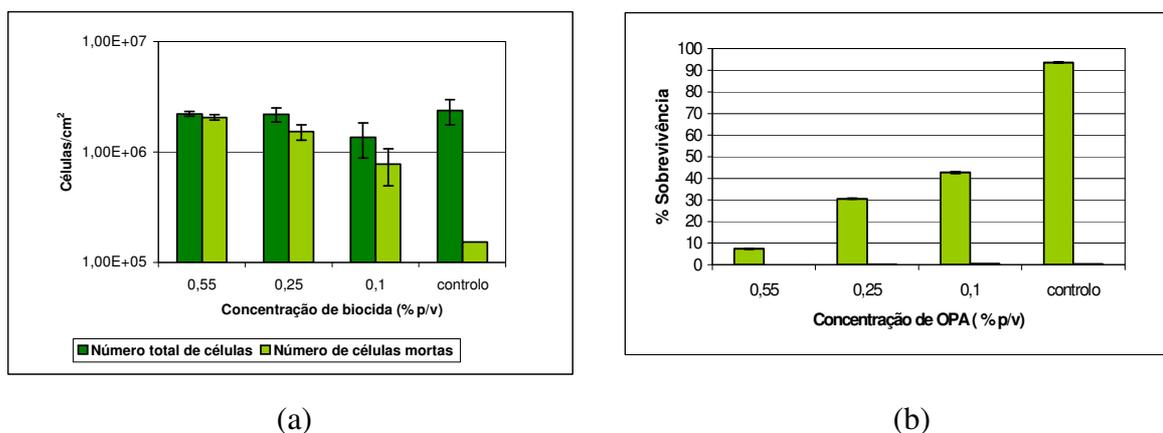


Figura 4.15 – Efeito do OPA em células de *S. epidermidis* aderidas durante 1 h ao aço inoxidável na presença de 0,3 g/L de BSA, (a) – número total de células aderidas e número de células mortas aderidas, (b)- percentagem de sobrevivência.

A análise da Figura 4.15 (b), referente à *S. epidermidis* aderida na presença de 0.3 g/L de BSA, permite constatar, tal como nos casos anteriores, que existe uma forte dependência entre a percentagem de sobrevivência de células e a concentração de biocida. Verifica-se que quando a concentração de biocida aplicada aumenta, o número de células aderidas mortas também aumenta. A comparação das médias obtidas para os vários resultados mostra que os valores são estatisticamente diferentes entre si e quando comparados com o controlo ($p < 0.05$), mas que não há diferença significativa entre os resultados, quando as células aderidas de *S. epidermidis* são expostas, durante 5 min, às várias concentrações de OPA estudadas. De referir ainda que a percentagem de sobrevivência obtida para uma concentração 0.55 % (p/v) de OPA é de 7 %, apesar de ser esta a concentração e o tempo de exposição de OPA recomendados pelo fornecedor.

A análise das Figuras 4.12, 4.13, 4.14 e 4.15 permite constatar que, tal como verificado na ausência de BSA, existe uma forte dependência entre a percentagem de sobrevivência de células e a concentração de biocida. Verifica-se, também, que quando a concentração de biocida aplicada aumenta, o número total de células aderidas parece aumentar ligeiramente.

No entanto, os resultados obtidos também permitem concluir que a presença de 0.3 g/L de BSA durante o processo de adesão diminui a eficácia antimicrobiana do biocida. Nota-se que para baixas concentrações de OPA, a presença das proteínas conduz a uma diminuição da acção antimicrobiana do biocida, indicando a possibilidade de reacção dos grupos amina da BSA, que se encontra adsorvida à superfície do aço inoxidável e às células aderidas, com o OPA, diminuindo assim a concentração do biocida disponível para inviabilizar as células.

Os resultados obtidos reforçam o conceito que a matéria orgânica pode reduzir a capacidade antibacteriana do OPA. A BSA é uma proteína que contém resíduos de amina primária que é capaz de reagir com os grupos aldeído livres do OPA, reduzindo, conseqüentemente a disponibilidade destes grupos para reagirem com as células, e assim exercerem a sua acção biocida. Adicionalmente, a matéria orgânica presente, também, pode reduzir a acessibilidade do biocida ao seu local de acção: por exemplo, no caso da BSA, esta pode formar um revestimento em torno da célula microbiana. Contrariamente, Frau *et al.* (2000) não verificaram uma diminuição do efeito do OPA em micobactérias na presença de 3 g/L de BSA. Porém, este estudo foi efectuado com células em suspensão pelo que as interacções estabelecidas entre a proteína e as células e as superfícies são diferentes, na situação em estudo. Para além disso, as espécies microbianas são diferentes podendo afectar as reacções do biocida (por exemplo, o alto conteúdo lipídico das células de micobactérias).

A comparação dos resultados dos testes de desinfecção com células aderidas das várias estirpes, na presença 0,3 g/L de BSA, é apresentada na Figura 4.16.

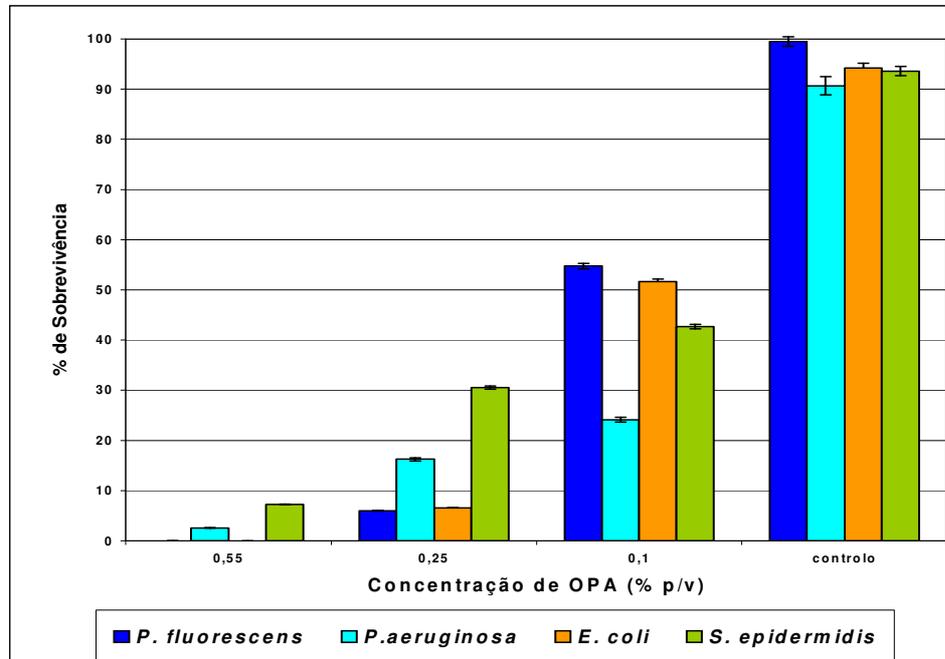


Figura 4.16 – Percentagem de sobrevivência de *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. epidermidis* aderidas na presença de 0,3 g/L de BSA, após testes de desinfecção com OPA.

Pela análise da Figura 4.16, observa-se que a percentagem de sobrevivência das várias estirpes estudadas diminui após um tempo de exposição de 5 min ao OPA. Conclui-se, ainda, que na presença de 0,3 g/L a *S. epidermidis* é menos susceptível ao aumento da concentração de OPA do que as outras estirpes, embora para a concentração de OPA de 0,1% (p/v) seja a menos resistente.

A análise da tendência dos valores de sobrevivência em função de concentração de OPA mostra que existem diferenças significativas ($p < 0,05$) para todas as estirpes estudadas. Comparando os valores de sobrevivência da *P. fluorescens* na presença de 0,3 g/L de BSA com os resultados das outras estirpes, verificou-se novamente que cada estirpe tem um comportamento próprio na presença de OPA. Tal como na ausência de BSA, a eficácia do OPA depende do tipo de microrganismo que se pretende inativar.

Comparando a Figura 4.16 com a Figura 4.11, conclui-se que o comportamento das estirpes na presença de albumina de soro bovino é similar ao comportamento na ausência de BSA apesar da taxa de sobrevivência aumentar na presença de BSA, demonstrando o efeito protector da proteína na acção do OPA.

4.4.2.2 Condições sujas

Para o estudo do efeito da substância interferente, em condições sujas, procedeu-se à adesão de células de *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. epidermidis* em aço inoxidável, na presença de 3 g/L de proteína, após o que se procedeu a testes de desinfecção com várias concentrações de OPA (0,55 % (p/v), 0,25 % (p/v) e 0,1 % (p/v)). Nas Figuras 4.17, 4.18, 4.19 e 4.20 apresentam-se o número total de células aderidas e o número de células aderidas mortas e as percentagens de sobrevivência para cada estirpe bacteriana estudada.

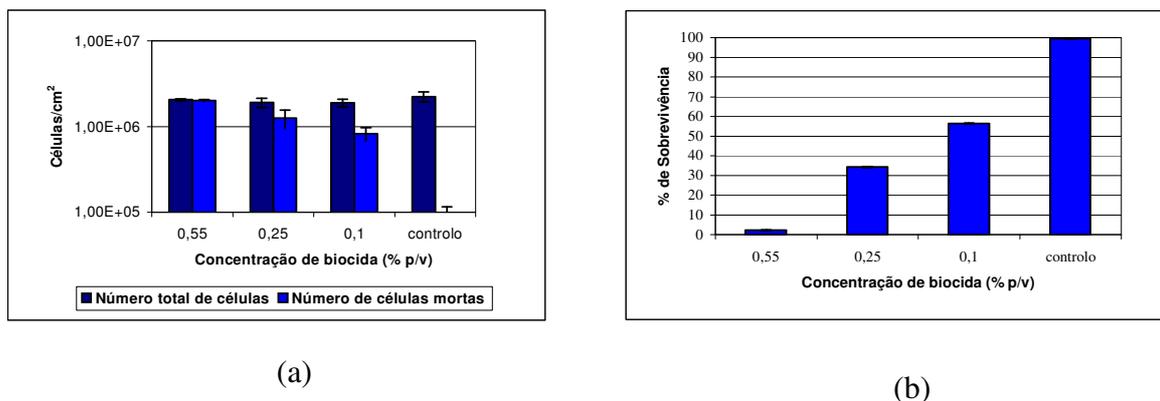


Figura 4.17 – Efeito do OPA em células de *P. fluorescens* aderidas na presença de 3 g/L de BSA ao aço inoxidável, após 2 h (a) – número total de células aderidas e o número de células aderidas mortas, (b)- percentagem de sobrevivência.

A análise da Figura 4.17 (b) mostra, tal como nos casos anteriores, que existe uma forte dependência entre a percentagem de sobrevivência de células e a concentração de biocida. Contudo, convém, mais uma vez, referir que para uma concentração de OPA de 0,55 (% p/v) e um tempo de exposição de 5 min, não se consegue inviabilizar completamente a bactéria. De facto, a conjugação desta concentração e de tempo não é suficiente para atingir uma percentagem de morte de 100 %, apesar de serem estas as condições aconselhadas pelo fornecedor (Alfa *et al.*, 1994). A avaliação das médias obtidas para os vários resultados mostra que os valores são estatisticamente diferentes quando comparados com o controlo e entre si ($p < 0.05$).

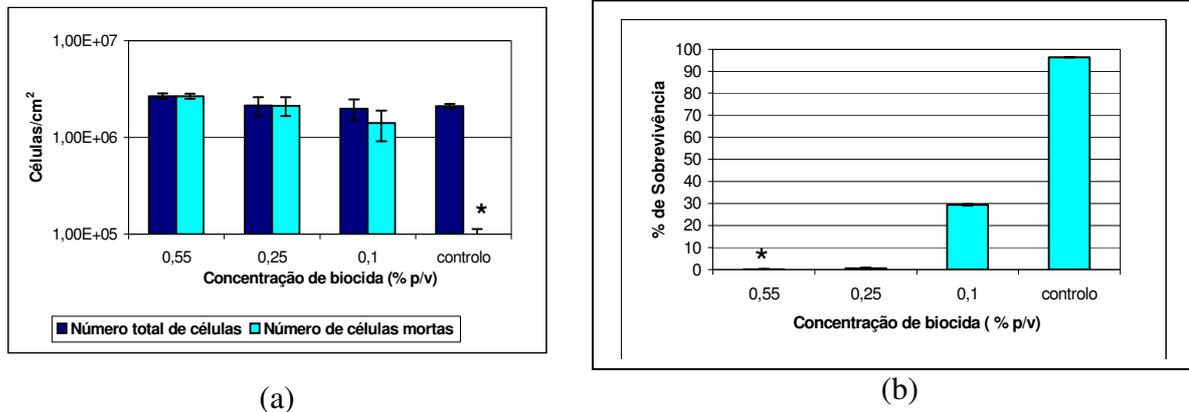


Figura 4.18 – Efeito do OPA em células de *P. aeruginosa* aderidas na presença de 3 g/L de BSA ao aço inoxidável, durante 1 h (a) – número total de células aderidas e o número de células aderidas mortas, (b)- percentagem de sobrevivência.

A Figura 4.18 (b) mostra que a percentagem de sobrevivência de células aderidas de *P. aeruginosa* diminui quando a concentração de OPA aumenta. A comparação dos valores da percentagem de sobrevivência em função da concentração de OPA mostra que os resultados obtidos são significativamente diferentes quando comparados com o controlo ($p < 0.05$), não havendo, no entanto, diferença entre as concentrações 0.25 % (p/v) e 0.55 % (p/v) de OPA. Conclui-se que para células de *P. aeruginosa* aderidas durante 1 hora na presença de 3 g/L de BSA, a concentração mínima bactericida de OPA é de 0.25 % (p/v) (sobrevivência aproximada 1%), para um tempo de exposição de 5 min ao biocida.

Comparando a Figura 4.18 (b) com a Figura 4.13 (b) observa-se um aumento da percentagem de sobrevivência de *P. aeruginosa* para a concentração de 0.1 % de OPA (p/v). No entanto, para a concentração de 0.25 % e 0.55 % (p/v) de OPA, contrariamente ao que era esperado, a percentagem de sobrevivência diminui quando a concentração de BSA aumenta de 0.3 g/L para 3 g/L.

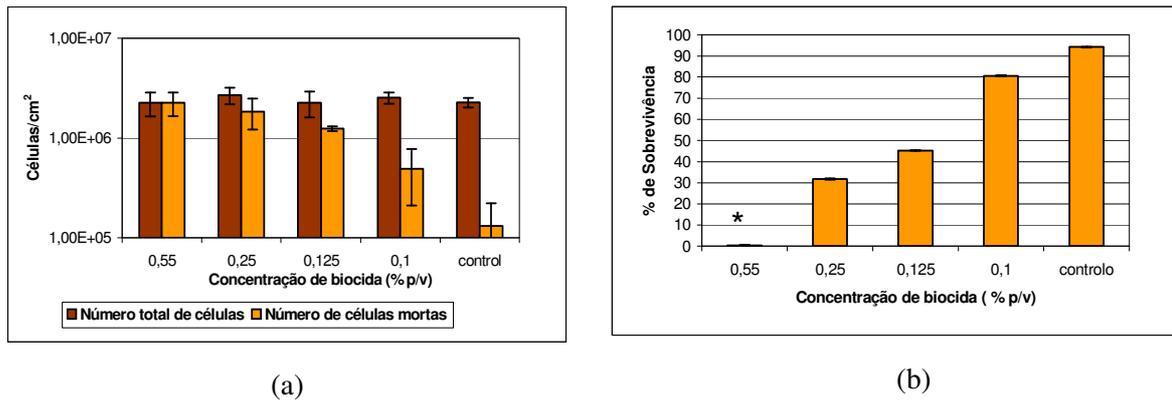


Figura 4.19 – Efeito do OPA em células de *E.coli* aderidas na presença de 3 g/L de BSA ao aço inoxidável, durante 1 h (a) – número total de células aderidas e o número de células aderidas mortas, (b)- percentagem de sobrevivência.

A Figura 4.19 (b), relativa à *E. coli*, mostra que, tal como com as estirpes anteriores, a percentagem de sobrevivência de células aderidas diminui quando a concentração de OPA aplicada aumenta. A comparação dos valores da percentagem de sobrevivência em função da concentração de OPA mostra que os resultados obtidos são significativamente diferentes quando comparados com o controlo ($p < 0.05$). Contudo, convém referir que para uma concentração de OPA de 0.55 % (p/v) e para um tempo de exposição de 5 min (aconselhado pelo fornecedor) a percentagem de sobrevivência é superior a 1 %, não sendo suficiente para atingir uma percentagem de morte de 100 %.

Comparando a Figura 4.19 (b) com a Figura 4.14 (b) observa-se um aumento da percentagem de sobrevivência de *E. coli* para as concentrações de OPA de 0.25 % (p/v), 0.125 % (p/v) e 0.1 % (p/v). Os resultados indiciam que o aumento da concentração de BSA diminui a eficiência do biocida, aumentando a viabilidade das células aderidas. Conclui-se então, que a presença de BSA na suspensão bacteriana diminui a actividade biocida do OPA em células aderidas de *E. coli*.

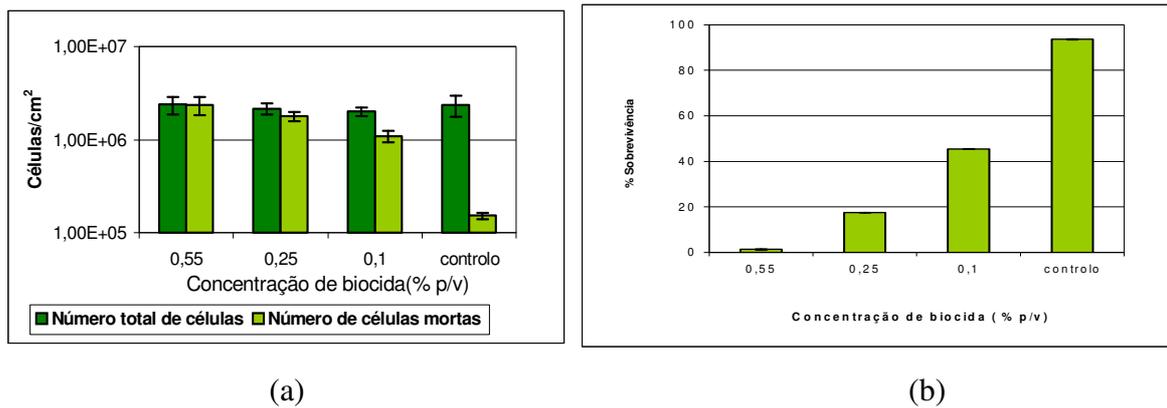


Figura 4.20 – Efeito do OPA em células de *S.epidermidis* aderidas na presença de 3 g/L de BSA ao aço inoxidável, durante 1 h (a) – número total de células aderidas e o número de células aderidas mortas, (b)- percentagem de sobrevivência.

A Figura 4.20, relativa a células de *S. epidermidis* aderidas em aço inoxidável na presença de 3 g/L de BSA, mostra tal como nos casos anteriores, que existe uma forte dependência entre a percentagem de sobrevivência de células aderidas e a concentração de biocida. A avaliação estatística das médias obtidas para os vários resultados mostra que os valores são estatisticamente diferentes quando comparados com o controlo ($p < 0.05$).

Verifica-se, também, uma diminuição da resistência de *S.epidermidis* com o aumento da BSA, especialmente quando as concentrações de OPA são elevadas. No entanto, a comparação da Figura 4.20 com a Figura 4.15 mostra que para concentrações mais baixas a percentagem de sobrevivência das células aderidas de *S. epidermidis* diminui na presença de BSA.

A comparação dos resultados obtidos na presença de 0.3 g/L de BSA e os resultados obtidos na presença de 3 g/L de BSA mostra um aumento da resistência de *P. fluorescens* na presença de concentrações mais elevadas da proteína, especialmente quando as concentrações de OPA são baixas e conseqüentemente a viabilidade das células de *Pseudomonas fluorescens* aumenta com o aumento da concentração de BSA. Verifica-se, novamente, que a presença de BSA na superfície de adesão e na superfície das bactérias diminui a actividade biocida do OPA. Estes resultados corroboram, mais uma vez, o papel da matéria orgânica na redução da acessibilidade do biocida aos locais de ligação, uma vez que o OPA pode reagir com aminas primárias (Simons *et al.*, 2000) presentes na BSA. No entanto, a quantidade de BSA que reage com o OPA é reduzida, uma vez que para concentrações elevadas de biocida, o efeito da acção da proteína não é significativo para a quantidade global do OPA existente.

Na Figura 4.21 apresenta-se a comparação do efeito do OPA nas várias estirpes bacterianas.

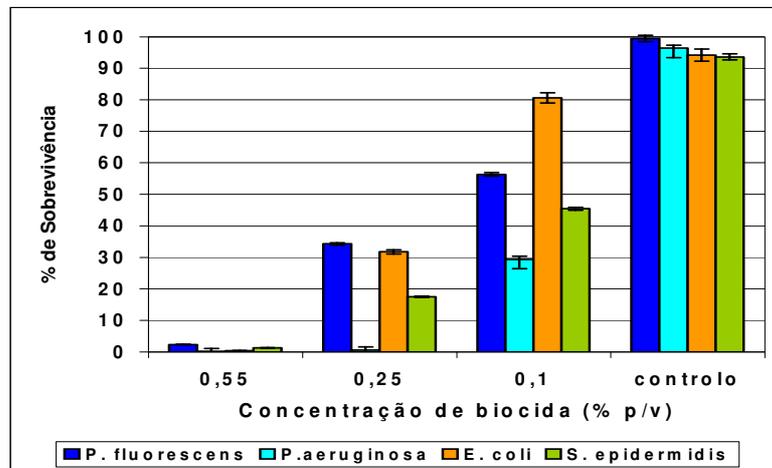


Figura 4.21 – Percentagem de sobrevivência de *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. epidermidis* aderidas na presença de 3 g/L de BSA, após testes de desinfecção com OPA.

Após a análise da Figura 4.21, observa-se que a percentagem de sobrevivência das estirpes diminui após um tempo de exposição de 5 min ao OPA. As bactérias *P. fluorescens* e *E. coli* continuam a mostrar grande resistência embora se note que para a concentração de OPA de 0.55 % (p/v) as células aderidas de *S. epidermidis* mostram ainda resistência.

As tendências dos valores de sobrevivência para cada estirpe apresentam diferenças significativas entre si, para todas as estirpes estudadas ($p < 0.05$). A comparação das tendências dos valores de sobrevivência em função da concentração de OPA da *P. fluorescens* na presença de 3 g/L de BSA com os resultados das outras estirpes evidencia que cada estirpe tem um comportamento próprio na presença de OPA. Pode concluir-se, então, que a eficácia do OPA depende do tipo de microrganismo que se pretende inviabilizar e da natureza das substâncias interferentes, bem como, da concentração quer do biocida quer das substâncias interferentes.

4.4.3 Comparação da acção do OPA na ausência e na presença de BSA

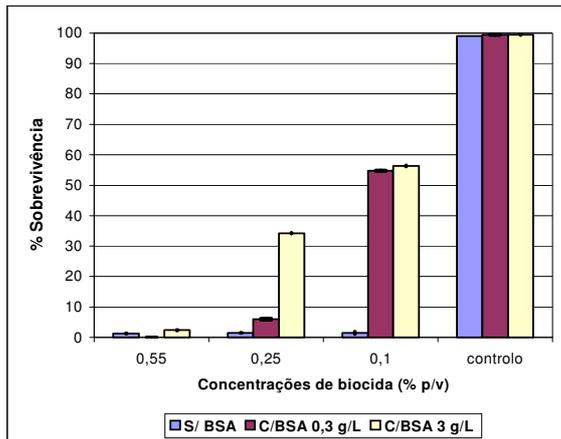
Com o objectivo de comparar o efeito da acção do OPA e da BSA nos 4 tipos de bactérias agruparam-se parte dos resultados anteriores na Tabela 4.6 e Figura 4.22.

Tabela 4.6 - Concentrações mínimas bactericidas (MBC) para cada uma das estirpes aderidas, na ausência de BSA, na presença de 0.3 g/L de BSA e na presença de 3 g/L de BSA

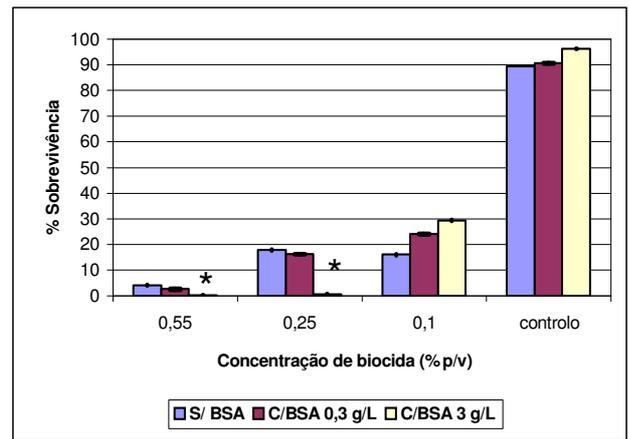
Estirpe	MBC (% p/v)	MBC (% p/v)	MBC (% p/v)
	aderidas sem BSA	0.3 g/L BSA	3 g/L BSA
<i>P.fluorescens</i>	0.25	0.55	> 0.55
<i>P.aeruginosa</i>	> 0.55	> 0.55	> 0.55
<i>E.coli</i>	> 0.55	> 0.55	> 0.55
<i>S.epidermidis</i>	> 0.55	> 0.55	> 0.55

A comparação da desinfecção com OPA na ausência e na presença de BSA permite concluir que a concentração mínima bactericida (MBC) do OPA depende da presença de proteína, mas não da sua concentração.

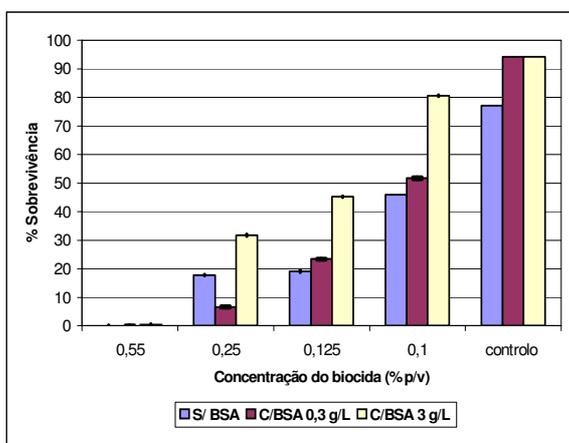
Na Figura 4.22 agrupam-se as percentagens de sobrevivência obtidas com a aplicação de diferentes concentrações de OPA em células de *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. epidermidis* aderidas na ausência e na presença 0.3 g/L de BSA e 3 g/L de BSA.



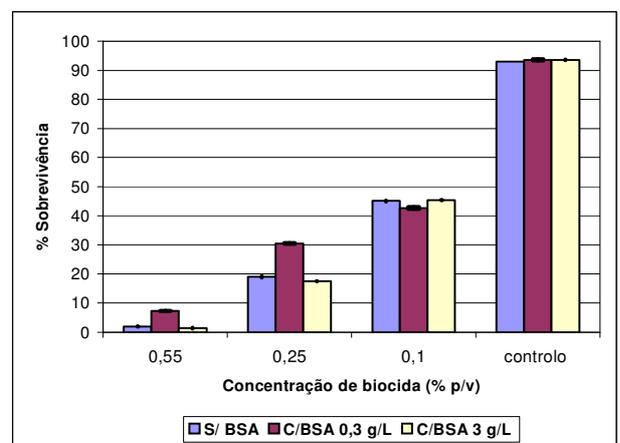
(a) *P. fluorescens*



(b) *P. aeruginosa*



(c) *E. coli*



(d) *S. epidermidis*

Figura 4.22 – Percentagem de sobrevivência de (a) *P. fluorescens*, (b) *P. aeruginosa*, (c) *E. coli* e (d) *S. epidermidis* aderidas a uma superfície de aço inoxidável, na ausência e na presença de BSA, após exposição a diferentes concentrações de OPA (0.55 % (p/v), 0.25 % (p/v) e 0.1 % (p/v)) durante 5 min. O asterisco indica que as células não sobreviveram.

Pela análise da Figura 4.22 verifica-se que, de uma maneira geral, na presença de BSA nas condições iniciais de adesão, a ação do biocida diminui para a mesma concentração de OPA, pois a percentagem de sobrevivência das células aumenta em função da concentração de BSA. Com efeito, na maioria dos ensaios, as maiores percentagens de sobrevivência registam-se para a concentração de BSA 3 g/L, especialmente para as bactérias de *P. fluorescens* e *E. coli*. Conclui-se que a presença de uma proteína no período de adesão aumenta a resistência extrínseca das bactérias aderidas ao OPA, provavelmente devido à presença de proteínas adsorvidas na superfície metálica ou nas células. Estas proteínas podem reagir com o OPA, diminuindo assim a quantidade disponível para reacção com as células bacterianas.

No entanto, alguns autores sugeriram que a diminuição do efeito do OPA (Carvalho, 2003) pode estar associado a uma estimulação do metabolismo bacteriano e daí a uma resistência acrescida das bactérias. Os dados da Figura 4.22 também parecem mostrar que a presença de BSA nas condições iniciais de adesão causa um aumento da percentagem de sobrevivência das bactérias dos ensaios de controlo.

No caso da *P. fluorescens*, os valores para cada condição inicial de adesão (sem BSA, 0.3 g/L e 3 g/L de BSA) foram estatisticamente estudados e verifica-se que apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$), para baixas concentrações de OPA. Comparando os valores das percentagens de sobrevivência na presença de OPA e na ausência de BSA, verifica-se que para a concentração máxima de OPA utilizada (0.55 % (p/v)) não existem diferenças significativas, contrariamente ao observado para a concentração de 0.25 % (p/v). Neste caso, não só a presença de BSA diminui a eficácia do OPA como, também, a própria concentração de BSA, pois quando é utilizada uma concentração mais elevada de BSA a percentagem de sobrevivência é maior. Para concentrações mais baixas de OPA, (0.1 % (p/v)) nota-se uma diferença mais significativa entre os resultados na ausência e na presença de BSA, embora a concentração de BSA não pareça influenciar a acção antimicrobiana do biocida.

A percentagem de sobrevivência da *P.aeruginosa* aumenta com o aumento da concentração de BSA para concentrações baixas de OPA (0.1 % (p/v)). Verifica-se que para concentrações de OPA de 0.55 % (p/v) e 0.25 % (p/v) a presença desta proteína nas condições iniciais de adesão aumenta a sobrevivência da *P. aeruginosa*. Os valores da percentagem de sobrevivência para cada condição inicial de adesão foram estatisticamente estudados e verifica-se que apresentam diferenças significativas, para baixas concentrações de OPA ($p < 0,05$). Comparando a eficiência do OPA na ausência de BSA com os outros resultados, verificou-se que para as concentrações de 0.55 % (p/v) e de 0.25 % (p/v) de OPA não existem diferenças significativas, mas para uma concentração de 0.1 % (p/v) não só a presença de albumina diminui a eficiência como a concentração de BSA influencia a acção do OPA. Nota-se ainda uma diferença mais significativa entre os resultados na ausência e na presença de BSA. Neste caso, não só a presença de BSA diminui a eficácia antimicrobiana do OPA como também, a própria concentração de BSA, pois quando é utilizada uma concentração mais elevada a percentagem de sobrevivência é maior.

A percentagem de sobrevivência da *E. coli* aumenta com o aumento da concentração de BSA e, conseqüentemente, interfere na acção do biocida, quando este se encontra em baixas

concentrações pois as maiores percentagens de sobrevivência registam-se para a concentração de BSA 3 g/L.

Comparando os resultados da eficiência do OPA na ausência e na presença de BSA, verificou-se que para a concentração de 0.55 % (p/v) não existem diferenças significativas ($p > 0,05$), mas para as concentrações de 0.25 % (p/v), 0.125 % (p/v) e 0.1 % (p/v) não só a presença como também a concentração de BSA influenciam a acção do OPA ($p < 0,05$). Conclui-se que a acção antimicrobiana do OPA sobre células de *E. coli* aderidas, depende da concentração do biocida e da concentração de proteínas presentes durante a fase de adesão e desinfecção.

No caso do *S. epidermidis* verifica-se que, na presença de BSA durante a adesão, a acção do biocida diminui para a mesma concentração de OPA pois a percentagem de sobrevivência da *S. epidermidis* aumenta em função da concentração de BSA.

Conclui-se que a acção antimicrobiana do OPA sobre células aderidas a aço inoxidável depende da concentração do biocida e da presença de proteínas durante a fase de adesão e desinfecção. Para concentrações mais baixas de OPA a presença de BSA deve ser um parâmetro a considerar. No entanto, estes resultados vêm mostrar, mais uma vez, que o tipo de bactéria influencia a acção antimicrobiano do biocida, pois não se obtém o mesmo comportamento nos diferentes casos em estudo.

Para além dos factores apontados anteriormente, o número de células aderidas à superfície metálica é menor na presença de BSA, ainda que de um modo pouco significativo, diminuindo a razão células aderidas/concentração de OPA, ou seja, na presença de BSA o número de células disponíveis para reagir com o OPA é menor. No entanto, a acção do OPA é menor na presença de proteína, possivelmente porque o OPA reage fortemente com as células bacterianas por reacção com aminas primárias das cadeias polipeptídicas (Walsh *et al.*, 1997; Simons *et al.*, 2000), presentes quer na BSA adsorvida nas células quer na BSA adsorvida na superfície metálica.

As conclusões obtidas desta análise são de extrema importância, uma vez que, em situações reais, a presença de substâncias interferentes é um dado frequente e a sua omissão pode conduzir a resultados indesejados nos procedimentos de controlo microbiológico.

4.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TEMPO DE CONTACTO NA EFICÁCIA DO BIOCIDA

A acção do biocida depende de vários factores (Capítulo 2) sendo um desses factores o tempo de contacto (Nagl *et al.*, 2000). Com o objectivo de estudar o efeito do tempo de contacto na eficácia do biocida realizaram-se ensaios com bactérias de *P. fluorescens* aderidas para diferentes tempos de exposição ao biocida (5, 7 e 10 min) em que se escolheram concentrações de OPA menores que a MBC do OPA para um tempo de exposição de 5 min. Apresentam-se, na Figura 4.23, as percentagens de sobrevivência para as concentrações de OPA de 0,05 % (p/v), 0,075 % (p/v) e 0,1 % (p/v) ao longo do tempo.

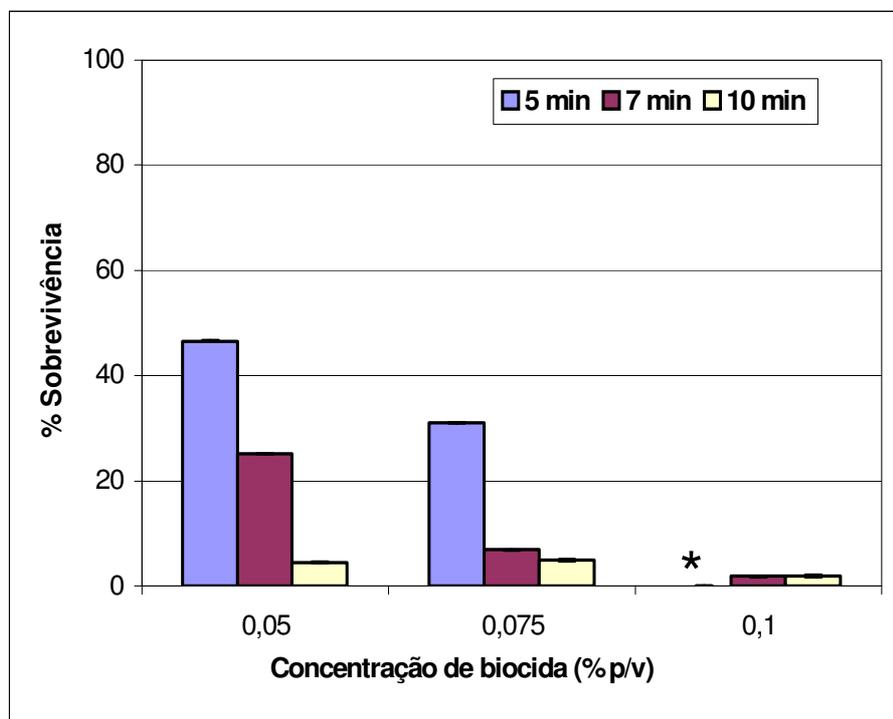


Figura 4.23 – Sobrevivência de células aderidas de *P. fluorescens* em função do tempo de exposição, obtida com a aplicação de diferentes concentrações de OPA (0,05 %, 0,075 % e 0,1 % (p/v)). O asterisco indica que as células não sobreviveram.

A análise dos valores das percentagens de sobrevivência da Figura 4.23. mostra que para todas as concentrações de OPA estudadas, a redução da viabilidade da *P. fluorescens* é dependente do tempo de contacto com o biocida. A Figura permite ainda concluir que à medida que a concentração de biocida diminui o tempo necessário para obter a mesma percentagem de sobrevivência aumenta. À medida que aumenta a concentração de biocida torna-se menos importante o tempo de contacto.

Nota-se que para uma concentração de 0.1 % (p/v) de OPA, após um tempo de exposição de 10 min, a sobrevivência celular não é significativa. Verifica-se, novamente, que para concentrações menores que 0.1 % (p/v), a percentagem de sobrevivência depende fortemente da concentração do OPA. Neste caso, a percentagem de sobrevivência é inversamente proporcional à concentração do biocida.

A tendência dos valores de percentagem de sobrevivência em função da concentração, para cada tempo de contacto com o biocida, foi estatisticamente avaliada e concluiu-se que apresenta diferenças significativas ($p < 0.05$), pelo que a acção antimicrobiana do OPA, quando este se encontra em baixas concentrações, depende do tempo de exposição das células de *P. fluorescens* ao biocida.

Estes resultados vão de encontro aos referidos por Walsh *et al.* (1999) quando compararam a eficácia do OPA e do GTA na inactivação de diferentes microrganismos: para baixas concentrações de OPA é necessário aumentar o tempo de exposição para obter inactivações semelhantes aos das obtidas com altas concentrações de OPA.

O OPA é considerado um desinfectante de alto nível pois a sua acção antimicrobiana é exercida logo após os primeiros minutos de contacto. No entanto, esta conclusão foi obtida com base na aplicação de OPA na concentração máxima fornecida pelo fabricante (0.55 % (p/v) e em células em suspensão. Os resultados da Figura 4.23 permitem concluir que, para concentrações inferiores a 0.55 %, o tempo assume um papel importante na acção do biocida.

De facto, poder-se-á chegar a taxas de sobrevivência microbiana menores usando concentrações de OPA inferiores à recomendada pelo fabricante, só que implementando tempos de exposição superiores a 5 min. Deste modo, rentabiliza-se a solução de OPA, tornando o processo de desinfeção mais económico e menos agressivo do ponto de vista ambiental e da segurança dos operadores.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS DE TRABALHO

Sumário

No presente capítulo apresentam-se as principais conclusões da análise ao trabalho experimental realizado no âmbito desta dissertação.

Também são apresentadas algumas ideias para trabalhos futuros, na continuidade deste trabalho.

5.1	<i>Conclusões.....</i>	84
5.2	<i>Sugestões para o trabalho futuro</i>	85

5.1 CONCLUSÕES

O estudo da adesão de *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *S. Epidermidis* e *E. coli* ao aço inox e a avaliação da eficiência antimicrobiana do biocida OPA sobre estas quatro bactérias produziram resultados de alguma pertinência, especialmente para a área médica. Em resumo, as principais conclusões desta dissertação são:

- Existe uma forte dependência entre a concentração de biocida e a actividade antimicrobiana, isto é, quanto maior é a concentração de biocida mais intensa é a sua acção.
- A eficácia antimicrobiana do OPA, ainda, é muito significativa mesmo para concentrações bastante mais baixas do que a aconselhada como concentração de uso (0.5 % p/v), mas ocorre sobrevivência significativa bacteriana em algumas situações nomeadamente células aderidas, na presença de BSA, entre outras.
- As diferentes bactérias reagem de modo semelhante à variação de concentração de biocida testado. A acção do OPA é semelhante em células bacterianas gram-negativas e gram-positivas.
- Não foram notadas diferenças na acção do OPA nas bactérias gram-positivas e gram-negativas, ainda, que estas últimas apresentem uma parede celular mais complexa.
- A concentração mínima bactericida (MBC) de OPA depende da bactéria.
- As células quando aderidas são mais difíceis de inactivar do que quando crescidas em suspensão, pelo que, para a mesma bactéria, os valores de MBC de OPA são maiores para as bactérias aderidas.
- A BSA diminui a acção antimicrobiana do OPA uma vez que os valores de MBC do OPA aumentam na presença desta proteína. Estes resultados indicam que o OPA deixa de ser um desinfectante eficaz na presença de matéria orgânica.
- A concentração de BSA afecta a actividade antimicrobiana do OPA, isto é, os valores de MBC do OPA na presença de BSA aumentam, apesar da concentração de proteína presente não afectar as bactérias da mesma forma.
- O OPA revelou-se ineficaz na remoção de microrganismos de superfícies.

- Na ausência de substâncias interferentes, o OPA é um biocida de alto nível pois a sua acção antimicrobiana é exercida logo após os primeiros minutos de contacto, para concentrações elevadas de biocida.
- Para concentrações baixas de biocida, o tempo de exposição é um parâmetro importante: quanto menor for a concentração de biocida, mais elevado é o tempo necessário para obter a mesma inactivação.
- Em algumas situações verifica-se sobrevivência bacteriana mesmo para concentrações de OPA de 0.55 % (p/v).
- A utilização de metodologias que permitem a visualização directa dos microrganismos viáveis e não-viáveis na superfície após a desinfectação revelou-se um método eficaz (evita-se os falsos negativos do crescimento em placa).

5.2 SUGESTÕES PARA O TRABALHO FUTURO

Ao longo deste trabalho foram surgindo algumas questões que ficaram por responder. Assim apresentam-se as seguintes sugestões:

- Desenvolvimento de métodos experimentais para avaliação da remoção das células bacterianas da superfície pelo OPA.
- Estudar os mecanismos de acção do OPA nas células bacterianas gram-negativas e gram-positivas.
- Avaliar o efeito do OPA ao longo do tempo, para concentrações baixas de biocida.
- Avaliar o efeito de implementação de métodos limpeza prévios (tratamentos enzimáticos, por exemplo), na eficiência antimicrobiana do OPA em células aderidas

Esta é uma área vasta em que desafios não faltam, basta que haja vontade e persistência...

6. BIBLIOGRAFIA

- Alfa , M. J., Sitter, D.L., In hospital evaluation of contamination of duodenoscopes: a quantitative assessment of the effects of drying. *Journal of Hospital Infeccion*.1992, 19: 89-98.
- Alfa M. J. and Sitter D. L. 1994. In-hospital evaluation of orthophthalaldehyde as a high level disinfectant for flexible endoscopes. *Journal of Hospital Infeccion*. 26, 15-26.
- Allen, J. I., Allen, M., Disson, M. M., *et al*, *Pseudomonas* infection of the biliary system resulting from use of a contaminated endoscope. *Gastroenterology* 1987, 92, 759-763.
- An Y. H., and Skowronski P. 2000. General Considerations for Studying Bacterial Adhesion to Biomaterials. *In: An, Y. H., Friedman, R. J. eds. Handbook of Bacterial Adhesion: Principles, Methods and Applications*. Totowa, NJ, Humana Press Inc., 8, 121-131.
- An, Y. H., Blair, B. K., Martin, K. L., e Friedman, R. J. 2000a. Macromolecule Surface Coating for Preventing Bacterial Adhesion. *In: An, Y. H., Friedman, R. J. eds. Handbook of Bacterial Adhesion: Principles, Methods and Applications*. Totowa, NJ, Humana Press Inc., 39, 609-625.
- An, Y. H., Dickinson, R. B., e Doyle, R. J. 2000b. Mechanisms of Bacterial Adhesion and Pathogenesis of Implant and Tissue Infections. *In: An, Y. H., Friedman, R. J. eds. Handbook of Bacterial Adhesion: Principles, Methods and Applications*. Totowa, NJ, Humana Press Inc., 1, 1-27.
- Azeredo, J. C. V. R., 1998. Dissertação de Doutoramento: Adesão de microrganismos e composição da matriz de bioagregados. Universidade do Minho, Braga, Portugal.
- Barnes, L. M., Lom, F., Adams, M. R. e Chamberlain A.H. L. 1999. Effect of Milk Proteins on Adhesion of Bacteria to Stainless Steel Surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*. 65, 4543-4548.
- Boland, T., Latour R. A., e Stutzenberger, F. J. 2000. Molecular Basis of Bacterial Adhesion. *In: An, Y. H., Friedman, R. J. eds. Handbook of Bacterial Adhesion: Principles, Methods and Applications*. Totowa, NJ, Humana Press Inc., 2, 29-41.
- Bott, T. R., 1992. The use of biocides in industry. *In: Biofilms- Science and Technology. Applied sciences*, Vol. 223 London. Kluwer Academic Publishers. 567-581.
- Boulos, L., Prévost, M., Barbeau, B., Coallier e J., Desjardins, R. 1999. LIVE/DEAD® *BacLigth*TM : application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water, *Journal of Microbiological Methods*, 37, 77-86.

- Christensen, G. D., Simpson, W. A., Anglen, J. O., Gainor, B. J., 2000. Methods for evaluating attached bacteria and biofilms. In: An, Y. H., Friedman, R. J. eds. *Handbook of Bacterial Adhesion: Principles, Methods and Applications*. Totowa, NJ, Humana Press Inc., 213-233
- Cloete, T. E., Jacobs, L., Brozel V. S., 1998. The chemical control of biofouling in industrial water systems. *Biodegradation*. 9, 23-37.
- Cunliffe, D., Smart C. A., Alexander, C. e Vulfson E. N. 1999. Bacterial Adhesion at Synthetic Surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*. 65, 4995-5002.
- Dalton, H. M. e March P. E. 2000 Molecular Genetics of Bacterial Adhesion and Biofouling. In: An, Y. H., Friedman, R. J. eds. *Handbook of Bacterial Adhesion: Principles, Methods and Applications*. Totowa, NJ, Humana Press Inc., 3, 43-67.
- Das, J. R., Bhakoo, M., Jones M.V. e Gilbert P. 1998 Changes in the biocide susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* and *Escherichia coli* cells associated with rapid attachment to plastic surfaces, *Journal of Applied Microbiology*. 84, 852-858.
- Denyer, S. P. and Stewart, G. S. A., 1998. Mechanisms of action of disinfectants, *international Biodeterioration & Biodegradation*, 41: 261-268.
- Denyer, S. P., 1995. Mechanisma of action antimicrobial biocides. *Internacional Biodeterioration Biodegradation*, 224-295.
- Diehl M. A., Chapman J. S. (1999) Association of the biocide 5-chloro-2-methyl-isothiazol-3-one with *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens*. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 44, 191-199.
- Fraenkel-Conrad, H, and H. S. Olcott, 1946. Reaction of formaldehyde with proteins II. Participation of the guanidyl groups and evidence of cross-linking. *Journal of American Chemistry Society* 68: 34-37.
- Gilbert, P., McBain, A., 2003. Potencial impact of Increased use of biocides in consumer. Prods on prevalence of antibiotic resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 2, 189-208.
- Gregory, A. W., Schaalje, G. B., Smart, J. D. and Robison, R. A. , 1999. The mycobactericidal efficacy of ortho-phthaldehyde and the comparative resistances of

- Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium terrae*, and *Mycobacterium chelonae*. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 20,5, 324-330.
- Holah J. T., Lavaud A., Peters W., Dye K. A. (1998) Future techniques for disinfectant efficacy testing. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 41, 273-279.
- Hsueh, P., Teng, L. J., Pan, H. J., Chen, Y. C., Sun, C. C., Ho, S. W., Luh, K., T. 1998. Outbreak of *Pseudomonas fluorescens* bacteraemia among oncology patients. *Journal of clinical microbiology*. 36, 2914-2917
- Joseph, B., Otta, S. K., Karunasagar, I. 2001. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*. 64, 367-372.
- Langsrud, S. and Sundheim, G., 1998. Factors influencing a suspension test method for antimicrobial activity of disinfectants, *Journal of Applied Microbiology*. 85, 1006-1012.
- Lopes, I. T. 2002. Dissertação de Mestrado: Aplicação de surfactantes no controlo da formação de biofilmes de *Pseudomonas fluorescens*. Universidade do Minho, Braga, Portugal.
- Maillard, J.-Y. 2002. Bacterial target sites for biocide action. *Journal of applied Microbiological Symposium Supplement*. 92, 16S-27S:
- Martin, K. L. e An Y., H. 2000. Basic Equipment and Microbiological Techniques for Studying Bacterial Adhesion. In: An, Y. H., Friedman, R. J. eds. *Handbook of Bacterial Adhesion: Principles, Methods and Applications*. Totowa, NJ, Humana press Inc., 7, 103-119.
- Maukonen, J., Mattila-Sandholm T., Wirtanen, G. 2000, Metabolic indicators for assessing bacterial viability in hygiene sampling using cells in suspension and swabbed biofilm, *Lebensm-wiss.u-Technol.*. 33, 225-233.
- McDonnell G. and Denver Russell A. (1999) Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. 12, 147-179.
- McFeters, G. A., Yu, F. P., Pyle, B. H. e Stewart, P. S. 1995. Physiological assessment of bacteria using fluorochromes, *Journal of Microbiological Methods*. 21, 1-13.
- Morita C., Sano K., Morimatsu S., Kiura H., Goto T., Kohno T., Hong W., Miyoshi H., Iwasawa A., Nakamura Y., Tagawa M., Yokosuka O., Saisho H., Maeda T., Katsuoka Y.

- (2000) Disinfection potential of electrolyzed solutions containing sodium chloride at low concentrations. *Journal of Virological Methods*. 85, 163-174.
- Nagl M., Hess M. W., Pfaller K., Hengster P., and Gottardi W. (2000) Bactericidal Activity of Micromolar *N*-Chlorotaurine: Evidence for Its Antimicrobial Function in the Human Defence System. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 44, 2507-2513.
- Norma European Standard, EN1276, 1997. Chemical disinfectants and antiseptics- Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and institutional areas- test method and requirements. European Committee for standardization. Brussels.
- Oliveira, R., Melo, L., Oliveira, A. e Salgueiro, R. 1994. Polysaccharide production and biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens*: effects of pH and surface material. *Colloids and surfaces B: Biointerface*. 2, 41-46.
- Parente, A. M., Sousa, J. C., 1998. Características morfológicas e ultraestruturais dos microrganismos procariotas. *In: Microbiologia*, volume I. Lisboa, Lidel-Eds.Técnicas, 20-23.
- Paulus, W, 1993. Microbiocides for the protection of materials- a handbook. Chapman and Hall, London.
- Peixe, L. V., 1998. Esterilização, antiseptia e desinfecção. *In: Microbiologia*, volume I. Lisboa, Lidel-Eds.Técnicas. 11, 221.
- Pereira, O. 2001. Dissertação de Doutoramento: Comparação da eficácia de dois biocidas (carbamato e glutaraldeído) em sistemas de biofilme. Universidade do Minho, Braga, Portugal.
- Pinheiro, M. M. 1997. Dissertação de Doutoramento: Sujamento biológico de superfícies de transferência de calor. Universidade do Minho, Braga, Portugal.
- Power, E. G. M., 1997. Aldehydes as biocide. *Progress in Medical Chemistry*. 34: 149-2001
- Reid, G. 2000. Studying Bacterial colonization of tubular medical devices. *In: An, Y. H., Friedman, R. J. eds. Handbook of Bacterial Adhesion: Principles, Methods and Applications*. Totowa, NJ, Humana Press Inc., 345-350.

- Rodney, M. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. In: <http://www.medscape.com/viewarticle>
- Russel, A. D., Furr, J. R. Maillard, J. Y., 1997. Microbiobial susceptibility and resistance to biocides, *ASM News*. 63, 481-487.
- Russell, A. D., 1986. Bacterial resistance to disinfectants. *Journal of hospital infection*. 7, 213-225
- Russell, A. D., 1994. Glutaraldehyde: its current status and uses. *Infect control hospital Epidemiology*. 15: 724-733.
- Rutala W. A. and Weber D. J. (1997) Uses of Inorganic Hypochlorite (Bleach) in Health-Care Facilities. *Clinical Microbiology Reviews*.10, 597-610.
- Schaule, G., Fleming, H.-C. E Ridgway, H. F. 1993. Use of 5-Cyano-2,3-Ditoly Tetrzolium Chloride for Quantifying Planktonic and sessile respiring bacteria in drinking water, *Applied and Environmental Microbiology*, 59, II, 3850-3857.
- Sheperd, M. G., Poulter, T. M., Sullivan, P. A., 1985. Cândida albicans biology, genetics and phatogeneicity. *Ann.Reviews Microbiology*. 39, 579-614.
- Simões et al, 2004 Validation of respirometry as a short-term method to assess the efficacy of biocides. submitted
- Simons, C., Walsh, S. E., Maillard, J. Y. e Russell, A. D., 2000. A note: Ortho:phthalaldehyde: proposed mechanism of action of new antimicrobial agent. *Letters in Applied Microbiology*. 31, 299-302.
- Sissons, C. H., Wong, L., and An Y. H. 2000. Laboratory Culture and Analysis of Microbial Biofilms. In: An, Y. H., Friedman, R. J. eds. *Handbook of Bacterial Adhesion: Principles, Methods and Applications*. Totowa, NJ, Humana press Inc., 9, 133-161.
- Srinivansan et al, R., Stewart, P.S., Griebe, T., Chen, C., 1995, Biofilm Parameters Influencing biocide efficacy. *Biotechnology and Bioenhineering*, 46, 553-560.
- Tattawasart U., Maillard J. -Y., Furr J. R. and Russell A. D. (1999) Comparative responses *Pseudomonas stutzeri* and *Pseudomonas aeruginosa* to antibacterial agents. *Journal of Applied Microbiology*. 87, 323-331.
- Teflon[®] Home Page, Du Pont. In: <http://www.DuPont.com>

Vieira, M. J. 1995. Dissertação de Doutoramento: Estudo da formação de filmes biológicos por *Pseudomonas fluorescens* e dos efeitos associados à transferência de massa interna e à incorporação de partículas de caulino. Universidade do Minho, Braga, Portugal.

Vieira, M. J., Oliveira, R., Melo, L., Pinheiro, M. M., Martins, V. 1993. Effect of metallic ions on the adhesion of biofilms formed by *Pseudomonas fluorescens*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 1, 119-124.

Walsh S. E., Maillard J.-Y., and Russell A. D., 1999. Ortho-phthalaldehyde: a possible alternative to glutaraldehyde for high level disinfection. *Journal of Applied Microbiology*. 86,1039-1046.

www.ASMMicrobeLibrary.org

www.Homepage.sms.edu/environmentalMicro.htm