

**SÍLVIA MARIA DE OLIVEIRA MACHADO**

**Avaliação do efeito antimicrobiano do  
surfactante cloreto de benzalcónio no controlo da  
formação de biofilmes indesejáveis**

Dissertação apresentada ao Departamento de Engenharia Biológica da  
Universidade do Minho para a obtenção do grau de Mestre em  
Tecnologia do Ambiente

Tese realizada sob orientação da:  
**Doutora Maria Olívia Pereira**



**Universidade do Minho**  
Escola de Engenharia  
**Departamento de Engenharia Biológica**

2005

**“Everything that lives, lives not alone, nor for itself.”**

William Blake

## AGRADECIMENTOS

Quero aqui expressar os meus agradecimentos a todos os que me apoiaram, encorajaram e ajudaram ao longo deste projecto.

À minha orientadora, **Doutora Olívia Pereira**, pela sua enorme disponibilidade e atenção dedicada a este mestrado, comentando e criticando nos momentos necessários com simpatia e boa disposição.

Ao **Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho**, por me ter disponibilizado as condições (instalações e material) indispensáveis à execução experimental.

Aos meus **colegas de Mestrado**, especialmente à **Cíntia, Florbela, Salomé e Sanna** pela sua amizade e ajuda.

Aos **colegas de LMA**, pelo óptimo convívio e, em particular, gostaria de agradecer ao **Manuel**, por me ter ensinado as técnicas de formação de biofilme e à **Ana Paula e Mariana** pelas indicações experimentais, relativas à determinação dos ângulos de contacto.

Aos meus **Pais e Irmão** por estarem sempre presentes, pois sem o apoio e a confiança que depositaram em mim, teria sido mais difícil chegar até aqui.

Ao **Ricardo** pelo amor, paciência, preocupação e carinho ao longo deste mestrado.

## RESUMO

A deposição de microrganismos numa determinada superfície e a consequente formação de biofilme são fenómenos que ocorre naturalmente, mas, também, são estratégias desenvolvidas pelos microrganismos para se protegerem de factores agressivos externos. Os microrganismos, quando em biofilme, podem causar sérios problemas nos vários sectores industriais, bem como, na área médica, pois estes são mais resistentes à acção dos agentes antimicrobianos do que quando estão dispersos numa fase líquida. Recentemente, vários estudos têm vindo a ser realizados de forma a desenvolverem-se protocolos eficazes para prevenção da acumulação de biofilmes nas mais diversas superfícies. Na prevenção e combate à formação de biofilmes indesejáveis recorre-se, frequentemente, à aplicação de agentes químicos com propriedades antimicrobianas, tais como, biocidas e surfactantes.

A presente dissertação teve como principal objectivo avaliar a capacidade do surfactante cloreto de benzalcónio (BAC) e contribuir, assim, para o desenho e/ou melhoramento de protocolos eficientes de controlo de biofilmes nas superfícies da área alimentar e médica. O BAC foi testado com culturas em suspensão de *Pseudomonas fluorescens* em suspensão e em sistemas de biofilmes. Os biofilmes foram desenvolvidos em aço inox e silicone (sujeitos ou não a pré-tratamento com o surfactante). A eficácia antimicrobiana do BAC foi, essencialmente, avaliada através da determinação da actividade respiratória das bactérias, do conteúdo em ATP e da capacidade de remoção de biofilme, tendo-se testado várias concentrações, tempos de contacto e presença de uma substância potencialmente interferente (BSA).

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que o BAC apresenta propriedades antimicrobianas acentuadas, que se manifestam quer com as bactérias em suspensão, quer em biofilme. No entanto, os biofilmes desenvolvidos sobre o aço foram bastante mais difíceis de inactivar (BIC=0,25 mM) do que os desenvolvidos sobre o silicone (BIC=0,0625 mM). Surpreendentemente, estes últimos foram mais facilmente inactivados do que as culturas em suspensão (MBC=0,125 mM). A eficiência do BAC foi, consideravelmente, reduzida quando a BSA estava presente nas culturas bacterianas (MBC=1 mM). Ainda em relação aos ensaios com biofilmes, o pré-tratamento das superfícies favoreceu a formação de biofilmes, pois, de uma maneira geral, a acumulação de biomassa sobre as placas de aço e silicone condicionadas foi maior, assim como, a actividade respiratória que apresentavam. O condicionamento das superfícies pareceu, também, fomentar nos biofilmes um aumento da resistência destes ao tratamento com o surfactante, uma vez que estes se tornaram mais difíceis de inactivar. Essa resistência foi mais evidente quando foram testadas concentrações de BAC mais elevadas. Também se constatou que a eficácia do BAC foi mais significativa na inactivação dos biofilmes do que na remoção destes das placas de aço inox e silicone, independentemente, das superfícies estarem ou não condicionadas. A resistência mecânica dos biofilmes, também, foi superior quando os biofilmes foram, previamente, tratados com o BAC.

A realização deste trabalho permitiu concluir que o tipo de material das superfícies de adesão tem um papel preponderante nas características dos biofilmes sobre elas formados, bem como, na susceptibilidade destes com BAC. Apesar do BAC ter mostrado actividade antimicrobiana significativa, esta fica comprometida na presença de matéria orgânica e quando as superfícies de adesão são pré-tratadas com surfactante.

## ABSTRACT

Microorganism's deposition in solid surfaces, and consequent biofilm formation, are phenomena that happen naturally but are also microorganism's strategies to protect themselves from external toxic factors. Biofilm microorganisms can cause serious problems in industry and medical area, since they are more resistant to the action of antimicrobial agents than their liquid suspended counterparts. In recent years, several studies have been carried out in order to develop suitable and efficient protocols to avoid biofilm accumulation on the most diverse surfaces. The control and prevention of undesirable biofilms often includes the application of chemical products with antimicrobial properties, such as biocides and surfactants.

The main goal of the present study was to evaluate the antimicrobial ability of the surfactant benzalkonium chloride (BAC) against *Pseudomonas fluorescens* planktonic cells and biofilm cells and, thus, to contribute to the design and/or the improvement of efficient procedures of biofilm control in food and medical surfaces. BAC efficiency was tested against *P. fluorescens* planktonic cultures and biofilms formed on stainless steel and silicone rubber (pre-treated or not with the surfactant). BAC antimicrobial efficacy was basically evaluated through the determination of the respiratory activity of the bacteria, ATP content and through the quantification of biofilm removal, being tested several BAC concentrations, contact times and the presence of an interfering substance (BSA).

Based on the results, it can be concluded that BAC presents noticeable antimicrobial properties against suspended bacteria and biofilms. However, the biofilms developed on the stainless steel plates were more difficult to inactivate (BIC=0,25 mM) than the ones formed on the silicone rubber (BIC=0,0625 mM). Surprisingly, the latter were more easily inactivated than the bacterial suspended cultures (MBC=0,125 mM). Moreover, BAC efficiency was considerably reduced when BSA was introduced in the cultures (MBC=1 mM). Concerning the biofilms assays, the pre-treatment of the surfaces favored biofilm formation, since, in a general way, the accumulation of biomass on the conditioning metal and silicone plates increased, as well as the respiratory activity. The conditioning of the surfaces seemed also to promote the increase of biofilm resistance to BAC, since biofilms became more difficult to inactivate. That biofilm resistance was more evident when higher BAC concentrations were applied. From the overall results, it was also possible to detect that BAC was more efficient in the inactivation of biofilms than in its removal, regardless surfaces were conditioning or not. The mechanical resistance of the biofilms was also increased when biofilms were previously treated with the surfactant.

The experimental work gathered in this thesis permitted to conclude that the type of material of the adhesion surfaces play an important role in the characteristics of the biofilm formed on those surfaces, as well as, in the susceptibility of biofilms to the surfactant. Despite that BAC showed to have considerable antimicrobial capacity, that ability was disturbed in the presence of organic matter and when the surfaces are pre-treated with the surfactant.

## ÍNDICE

Agradecimentos.....	I
Resumo.....	II
Abstract.....	III
Índice.....	IV
Índice de tabelas.....	VII
Índice de figuras.....	IX
Nomenclatura.....	XII
1 Introdução.....	1
1.1 Objectivos do trabalho experimental.....	2
1.2 Organização da Dissertação.....	3
2 Fundamentos teóricos.....	4
2.1 Biofilmes microbianos.....	5
2.2 Biofilmes: Prejudiciais ou benéficos?.....	7
2.3 Formação dos biofilmes.....	9
2.4 Principais factores que influenciam a formação de biofilmes.....	12
2.5 Vantagens e desvantagens do desenvolvimento em biofilmes.....	14
2.5.1 Vantagens do desenvolvimento dos microrganismos em biofilmes.....	14
2.5.2 Desvantagens do desenvolvimento dos microrganismos em biofilmes.....	14
2.6 Estratégias de controlo de biofilmes.....	15
2.6.1 Surfactante.....	16
2.6.2 Estudo da susceptibilidade das células bacterianas ao surfactante.....	19
2.7 Substância interferente.....	21
2.8 Estabilidade física dos biofilmes.....	22
3 Materiais e Métodos.....	23
3.1 Microrganismo.....	24
3.1.1 Modo de preservação.....	24
3.1.2 Meio de cultura.....	24

3.1.3	Preparação do inóculo.....	26
3.2	Superfícies de adesão .....	27
3.3	Surfactante.....	28
3.3.1	Concentrações de trabalho .....	28
3.3.2	Condicionamento das placas de aço inox e silicone .....	29
3.3.3	Substância interferente (Albumina de soro bovino).....	29
3.4	Ensaio realizado com cultura de <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	30
3.4.1	Ensaio com <i>Pseudomonas fluorescens</i> em suspensão .....	30
3.4.2	Ensaio com biofilme formado por <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	32
3.4.3	Determinação da estabilidade física de biofilmes desenvolvidos por <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	35
3.5	Métodos Analíticos.....	38
3.5.1	Determinação da biomassa.....	38
3.5.2	Determinação da actividade microbiana.....	38
3.5.3	Método para a determinação de ATP .....	41
3.5.4	Caracterização bioquímica de biofilmes .....	42
3.5.5	Influência do BAC nas propriedades superficiais de placas de aço e silicone .....	44
3.5.6	Microscopia electrónica de varrimento.....	50
3.6	Análise estatística.....	51
3.6.1	Distribuição <i>t</i> de Student .....	51
4	Resultados e discussão .....	52
4.1	Avaliação do efeito do BAC em culturas de <i>Pseudomonas fluorescens</i> em suspensão .....	53
4.1.1	Efeito do tempo de contacto na acção antimicrobiana do BAC .....	53
4.1.2	Efeito da concentração de BAC na actividade respiratória das bactérias.....	56
4.1.3	Determinação do conteúdo em ATP de uma suspensão bacteriana antes e após aplicação de BAC.....	58
4.2	Avaliação da interferência da BSA na actividade respiratória de <i>Pseudomonas fluorescens</i> e na eficiência antimicrobiana do BAC.....	60
4.2.1	Efeito da BSA na actividade respiratória das culturas em suspensão de <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	60
4.2.2	Efeito da BSA no desempenho antimicrobiano do surfactante .....	61
4.3	Avaliação do efeito do BAC em biofilmes de <i>Pseudomonas fluorescens</i> formados em superfícies de aço inox e silicone .....	64
4.3.1	Efeito da aplicação de BAC a biofilmes .....	64

4.3.2	Efeito da aplicação de BAC na estrutura superficial dos biofilmes.....	69
4.4	Influência do BAC nas propriedades superficiais do aço e silicone.....	73
4.4.1	Ângulos de contacto, tensões superficiais e hidrofobicidade das superfícies de aço inox e silicone .....	73
4.4.2	Influência do condicionamento das placas de aço inox e silicone na formação e actividade dos biofilmes .....	79
4.4.3	Efeito da aplicação de BAC a biofilmes formados em placas de aço inox e silicone previamente condicionadas .....	81
4.4.4	Caracterização bioquímica dos biofilmes .....	92
4.4.5	Determinação da estabilidade física dos biofilmes após tratamento com cloreto de benzalcónio .....	95
5	Conclusões e Sugestões de trabalho.....	98
6	Bibliografia.....	102

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1 - Composição do meio de cultura para a <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	25
Tabela 3.2 - Composição das soluções tampão a pH 7 utilizadas nos diferentes ensaios .....	25
Tabela 3.3 - Características do surfactante – Cloreto de Benzalcónio .....	28
Tabela 3.4 - Características físicas e químicas da proteína BSA .....	29
Tabela 3.5 - Componentes da tensão superficial da água, formamida e $\alpha$ -bromonaftaleno a 20 °C .....	45
Tabela 4.1 - Percentagem de redução da actividade respiratória da bactéria <i>Pseudomonas fluorescens</i> resultante da aplicação de 0,0625 mM de BAC, ao longo do tempo. ....	55
Tabela 4.2 - Percentagem de redução da actividade respiratória da bactéria <i>Pseudomonas fluorescens</i> obtida com a aplicação de BAC, durante 30 minutos. ....	56
Tabela 4.3 - Redução da actividade respiratória da bactéria <i>Pseudomonas fluorescens</i> obtida para concentrações crescentes de BAC durante 30 minutos de contacto na presença de 3 g/L de BSA .....	62
Tabela 4.4 - Redução da actividade respiratória de biofilme formado em placas de aço e silicone obtida para concentrações crescentes de BAC durante 30 minutos de contacto.....	68
Tabela 4.5 - Redução da massa de biofilme formado em placas de aço e silicone obtida para concentrações crescentes de BAC durante 30 minutos de contacto.....	69
Tabela 4.6 - Valores médios dos ângulos de contacto ( $\pm$ desvio padrão) determinados à temperatura ambiente (20°C) com água ( $\theta_w$ ), sobre superfícies de aço inox e silicone antes e após condicionamento com BAC.....	73
Tabela 4.7 - Valores médios do ângulo de contacto ( $\pm$ desvio padrão) determinados à temperatura ambiente (20°C) com água ( $\theta_w$ ), sobre superfícies de células <i>P. fluorescens</i> na ausência de surfactante .....	74
Tabela 4.8 - Valores das componentes apolar ( $\gamma_s^{LW}$ ), polar( $\gamma_s^{AB}$ ) e respectivos parâmetros ( $\gamma_s^+ e \gamma_s^-$ ) da tensão superficial ( $\gamma_s^{tot}$ ), das superfícies de aço inox e silicone, antes e após condicionamento com BAC .....	75

Tabela 4.9 - Valores da energia livre de interacção (grau de hidrofobicidade - $\Delta G_{sws}^{tot}$ ) da superfície das placas de aço inox e silicone antes e após condicionamento com BAC.....	76
Tabela 4.10 - Valor energia livre de interacção (grau de hidrofobicidade - $\Delta G_{sws}^{tot}$ ) da superfície das células <i>P. fluorescens</i> , na ausência de surfactante.....	76
Tabela 4.11 - Valores da energia livre de adesão ( $\Delta G_{bws}^{ad}$ ) da bactéria <i>Pseudomonas fluorescens</i> ao aço inox e silicone.....	77
Tabela 4.12 - Variação da actividade respiratória de biofilme formado em placas de aço obtida para concentrações crescentes de BAC.....	83
Tabela 4.13 - Variação da quantidade de biofilme, formado em placas de aço condicionadas, obtida em resultado da aplicação de concentrações crescentes de BAC.....	86
Tabela 4.14 - Variação da actividade respiratória de biofilme formado em placas de silicone obtida para concentrações crescentes de BAC.....	87
Tabela 4.15 - Redução da quantidade da massa de biofilme formado em placas de silicone obtida para concentrações crescentes de BAC.....	90
Tabela 4.16 – Valores da actividade respiratória e de massa acumulada de biofilmes formados em diferentes suportes de adesão (aço inox e silicone).....	93
Tabela 4.17 - Composição bioquímica de biofilmes formados nas diferentes superfícies de adesão (aço e silicone).....	94

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1- Etapas de formação de um biofilme (adaptado de Xavier <i>et al.</i> , 2003) .....	9
Figura 2.2- Estrutura química do cloreto de benzalcónio - BAC (adaptado de McDonnell <i>et al.</i> , 1999).....	19
Figura 3.1- Fotografia geral da instalação experimental .....	32
Figura 3.2- Fotografia mais pormenorizada da instalação experimental.....	33
Figura 3.3- Pormenor do suporte das placas de aço inox/silicone.....	34
Figura 3.4- Fotografia de um dos cilindros de aço inox com biofilme desenvolvido durante 5 dias (Cortesia Manuel Simões) .....	37
Figura 3.5 - Fotografia do respirómetro .....	39
Figura 3.6 – Exemplo de um respirograma tipo: 1 e 3 – respiração endógena; 2 – respiração total; A – injeção de substrato; t – tangente no ponto de injeção de substrato .....	40
Figura 3.7- Fotografia da bactéria <i>Pseudomonas fluorescens</i> obtidas por microscopia electrónica de varrimento.....	50
Figura 4.1- Actividade respiratória das culturas em suspensão da bactéria <i>Pseudomonas fluorescens</i> , ao longo do tempo. ....	54
Figura 4.2 - Efeito do tempo de contacto na acção do cloreto de benzalcónio sobre a actividade respiratória das bactérias, quando aplicado numa concentração de 0,0625 mM. O tempo “0” refere-se ao teste de controlo, isto é, sem adição de BAC. ....	54
Figura 4.3 - Efeito da concentração de BAC na actividade respiratória da bactéria <i>Pseudomonas fluorescens</i> , após um tempo de contacto de 30 minutos. O “0” refere-se ao teste de controlo, isto é, sem adição de BAC. ....	56
Figura 4.4- Conteúdo em ATP de soluções de BAC preparada com tampão fosfato. O “0” refere-se ao teste de controlo, isto é, sem adição de BAC. ....	58
Figura 4.5- Conteúdo em ATP de suspensões bacterianas tratadas com diferentes concentrações de BAC. O “0” refere-se ao teste de controlo, isto é, sem adição de BAC.....	58

Figura 4.6- Influência de 3 g/L de BSA (Bovine Serum Albumine) na actividade respiratória da bactéria <i>Pseudomonas fluorescens</i> , ao longo do tempo. O tempo “0” refere-se ao teste de controlo, isto é, à actividade respiratória bacteriana obtida sem adição de BSA. ....	61
Figura 4.7- Efeito da concentração de BAC na actividade respiratória da <i>Pseudomonas fluorescens</i> após um tempo de contacto de 30 min, na presença de 3 g/L de BSA. O “0” refere-se ao teste de controlo, isto é, à actividade respiratória obtida sem adição de BAC mas na presença da BSA. ....	62
Figura 4.8- Actividade respiratória de biofilmes de <i>Pseudomonas fluorescens</i> formados em placas de aço (a) e em placas de silicone (b) antes e após a aplicação de concentrações crescentes de BAC.....	65
Figura 4.9 - Massa de biofilme formado em placas de aço (a) e em placas de silicone (b) antes e após a aplicação de várias concentrações de BAC .....	66
Figura 4.10- Microfotografias de imagens obtidas por SEM da estrutura superficial do aço inox (a) e do silicone (b).....	70
Figura 4.11- Microfotografias de imagens obtidas por SEM da estrutura superficial do biofilme de <i>P. fluorescens</i> formado sobre aço inox e do silicone, antes [(a) e (b)] e após [(c) e (d)] a aplicação de 0,0625 mM de BAC. ....	71
Figura 4.12- Actividade respiratória de biofilme formados em placas de aço e silicone previamente condicionadas.....	79
Figura 4.13- Massa de biofilme aderida a placas de aço inox e silicone previamente condicionadas .....	80
Figura 4.14- Microfotografias de imagens obtidas por SEM da estrutura superficial do biofilme de <i>P. fluorescens</i> formado sobre aço inox (a) e silicone (b) condicionados. ....	81
Figura 4.15- Actividade respiratória dos biofilmes formados em placas de aço previamente condicionadas, antes (controlo) e após a aplicação de concentrações crescentes de BAC .....	82
Figura 4.16- Actividade respiratória dos biofilmes formados em placas de aço inox, antes (controlo) e após a aplicação de concentrações crescentes de BAC.....	84
Figura 4.17- Massa de biofilme formada, em placas de aço previamente condicionadas, antes (controlo) e após a aplicação de concentrações crescentes de BAC.....	85
Figura 4.18- Actividade respiratória dos biofilmes formados em placas de silicone previamente condicionadas, antes (controlo) e após a aplicação de concentrações crescentes de BAC .....	86
Figura 4.19- Actividade respiratória dos biofilmes formados em placas de silicone não condicionadas, antes (controlo) e após a aplicação de concentrações crescentes de BAC .....	88

Figura 4.20- Massa de biofilme formada, em placas de silicone previamente condicionadas, antes (controlo) e após a aplicação de concentrações crescentes de BAC .....	89
Figura 4.21- Massa de biofilme formada, em placas de silicone não condicionadas, antes (controlo) e após a aplicação de concentrações crescentes de BAC.....	90
Figura 4.22- Microfotografias de imagens obtidas por SEM da estrutura superficial do biofilme de <i>P. fluorescens</i> formado sobre aço inox (a) e do silicone (b) condicionado, após a aplicação de 0,0625 mM de BAC.....	91
Figura 4.23- Remoção de biofilme causada pela submissão do biofilme a diferentes velocidades de rotação, antes (Concentração “0”) e após ser tratado com várias concentrações de BAC. ....	96

## NOMENCLATURA

### Abreviaturas

BAC	Cloreto de Benzalcónio
ATCC	American Type Culture Collection
D.O.	Densidade Óptica
BIC	Concentração mínima inibitória dos biofilmes
BSA	Albumina de Soro Bovino (“Bovine Serum Albumine”)
PBS	Tampão Fosfato Salino
EPS	Substâncias Poliméricas Extracelulares (“Extracellular Polymeric Substances”)
SEM	Microscopia Electrónica de Varrimento (“Scanning Electron Microscopy”)
QAC	Compostos Quaternários de Amónia (“Quaternary amonium compound”)
CMC	Concentração Miceliar Crítica
MIC	Concentração Mínima de Inibição
MBC	Concentração Mínima Bactericida (“minimum bactericidal concentration”)
SVT	Sólidos Voláteis Totais
BOM	Monitor de Oxigénio (“Biological Oxygen Monitor”)
A.R.	Actividade Respiratória
ATP	Adenosina Tri-fosfato
RLU	Relative Light Units

### Símbolos Gregos

$\theta$  Ângulo de contacto

$\Delta_{sws}^{tot}$  Energia livre global de interacção entre as moléculas de um sólido (s) imerso em

água

$\Delta_{sws}^{LW}$  Componente apolar da variação da energia livre de adesão de interação

hidrofóbica de uma superfície

$\Delta_{lwl}^{AB}$  Componente polar

$\gamma_s^-$  Componentes da tensão superficial da superfície

$\gamma_s^+$  Componentes da tensão superficial da superfície

$\gamma_s^{LW}$  Componentes da tensão superficial da superfície

$\gamma_w^{LW}$  Componentes da tensão superficial do líquido

$\gamma_l^+$  Componentes da tensão superficial do líquido

$\gamma_s^-$  Componentes da tensão superficial do líquido

## 1 INTRODUÇÃO

---

Neste capítulo pretende-se contextualizar o leitor para o tema deste trabalho. Apresentam-se, também, os objectivos gerais da dissertação, bem como, o modo como esta foi organizada.

---

## 1.1 OBJECTIVOS DO TRABALHO EXPERIMENTAL

No âmbito deste trabalho, pretendeu-se caracterizar o comportamento antimicrobiano do surfactante cloreto de benzalcónio (BAC), em condições operatórias que simulassem situações reais.

Para tal, escolheu-se uma bactéria, frequentemente, encontrada nos mais diversos sistemas industriais, a *Pseudomonas fluorescens*, da colecção ATCC 13525, e variaram-se diversas condições consideradas como determinantes na caracterização da eficácia de um surfactante, tais como:

- Utilização de bactérias crescidas em suspensão (bactérias planctónicas) e desenvolvidas em biofilme (bactérias na forma sésil);
- Utilização de superfícies de adesão de material diferente;
- A concentração do surfactante;
- O tempo de contacto do surfactante com a suspensão bacteriana e com os biofilmes bacterianos desenvolvidos em placas suspensas;
- A presença de substâncias orgânicas (albumina de soro bovino – BSA);
- Utilização de superfícies de adesão condicionadas, isto é, pré-tratadas com o surfactante.

Com a realização deste trabalho pretendeu-se:

- Avaliar o efeito antimicrobiano do surfactante BAC sobre as células de *Pseudomonas fluorescens* em suspensão e em biofilme, quanto à actividade respiratória e à remoção de massa;
- Testar a influência da presença de substâncias orgânicas, potencialmente interferentes, na actividade respiratória e na eficiência da actividade antimicrobiana do surfactante sobre as células de *Pseudomonas fluorescens*;
- Avaliar a influência do tipo de material da superfície de adesão (aço inox e silicone) na formação de biofilme e no desempenho do BAC;
- Avaliar o efeito do condicionamento das superfícies de adesão na formação do biofilme e na eficácia do BAC;
- Determinar a estabilidade física dos biofilmes após tratamento com cloreto de benzalcónio.

## 1.2 ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação está organizada em cinco capítulos, orientados no sentido de apresentar o trabalho desenvolvido ao longo desta investigação. Neste **primeiro capítulo**, pretende-se orientar o leitor para o tema deste trabalho, apresentando-se o contexto e as motivações que estiveram na base desta dissertação. Também se expõem os objectivos gerais da dissertação, bem como o modo como esta foi organizada. O **capítulo 2** constitui uma breve revisão bibliográfica sobre o tema dos biofilmes e do surfactante. Apresenta-se o conceito de biofilme, apontando as suas principais vantagens e inconvenientes, assim como, as principais estratégias de controlo de biofilmes. Por fim, faz-se uma breve alusão ao conceito de surfactante, assim como a alguns dos parâmetros que afectam a sua eficácia. No **capítulo 3**, apresentam-se os materiais e métodos usados durante a execução do trabalho experimental. Os resultados obtidos são apresentados, relacionados e discutidos no **capítulo 4**. Neste capítulo avalia-se o efeito do surfactante BAC na actividade respiratória de suspensões bacterianas, na ausência e na presença de BSA. O efeito do BAC na remoção de massa e na alteração da actividade respiratória de biofilmes de *Pseudomonas fluorescens*, desenvolvidos sobre superfícies de aço inox e silicone, pré-condicionadas ou não, também, é apresentado neste capítulo. Na parte final, apresentam-se e discutem-se os resultados relativos à caracterização bioquímica dos biofilmes, assim como, à estabilidade física dos biofilmes após tratamento com BAC. No **capítulo 5** faz-se uma síntese das principais conclusões resultantes do trabalho experimental realizado no domínio desta dissertação e apresentam-se, no seguimento, algumas ideias e sugestões para trabalho futuro.

## 2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

---

Neste capítulo são abordados os conceitos teóricos que serviram de base para a execução deste trabalho. Começa-se por se fazer uma breve revisão bibliográfica sobre a estrutura e composição dos biofilmes, apontando as suas principais vantagens e inconvenientes. Referem-se, também, os factores que afectam a formação do biofilme. Por fim, faz-se uma breve alusão às estratégias de controlo de biofilmes, incidindo-se na importância do uso de surfactantes e enfatizando as suas potencialidades para provocar o desprendimento e a inactivação de biofilmes. Dá-se especial ênfase ao cloreto de benzalcónio, que foi o surfactante utilizado neste trabalho.

---

## 2.1 BIOFILMES MICROBIANOS

Os microrganismos são estruturas simples, que estão presentes nos mais diversos habitats, mas capazes de desenvolverem comportamentos bastante complexos.

Apresentam-se nos ambientes aquosos, tanto na forma planctónica com na forma sésil (Costerton *et al.*, 1987; Characklis *et al.*, 1982). Na forma planctónica os microrganismos encontram-se em suspensão e dispersos no meio aquoso, enquanto que, na forma sésil se encontram aderidos a superfícies sólidas sob a forma de biofilmes.

No que diz respeito ao crescimento e à capacidade para resistir aos agentes biocidas, os microrganismos associados em biofilmes exibem um comportamento diferente dos microrganismos na forma planctónica. Os mecanismos responsáveis pela resistência das bactérias dos biofilmes aos agentes antimicrobianos podem estar relacionados com limitações difusionais à passagem do agente pela matriz extracelular, com alterações fenotípicas das células no biofilme e ainda com o desenvolvimento de mecanismos de resistência por alteração do genótipo das células (Donlan & Costerton, 2002; Gilbert *et al.*, 2003).

Estima-se que mais do que 90% dos microrganismos vivem sob a forma de biofilmes (Costerton *et al.*, 1987) e praticamente não existe nenhuma superfície que não possa ser ou vir a ser colonizada por bactérias (Characklis e Marshall, 1990).

A composição dos biofilmes é dependente das condições do meio (como a temperatura, composição do meio, pressão, pH e oxigénio dissolvido) (Flemming, 1991; O'Toole *et al.*, 2000) e não é necessariamente uniforme, podendo até englobar partículas sólidas (argilas, areias, partículas orgânicas) provenientes do meio aquoso onde está imerso (Characklis e Marshall, 1990; Wimpenny *et al.*, 1993).

Existem várias definições de biofilme mas, no geral, estes podem ser definidos como sendo uma matriz polimérica de aspecto gelatinoso, aderida a uma superfície sólida, quase sempre imersa em meio líquido e que é, essencialmente, constituída por um aglomerado de células microbianas, por água e pelos seus produtos de excreção (substâncias poliméricas extracelulares) (Allison, 2003; Sutherland *et al.*, 2001). Um biofilme é considerado uma estrutura muito adsorvente e porosa (possui canais de água e poros) devido a ser constituído essencialmente por água (pois contém cerca de 80 a 95% de água). Os microrganismos representam somente uma parte da massa de biofilme que, frequentemente, é menor que 10%. As substância poliméricas extracelulares (“Extracellular Polymeric Substances” - EPS)

que formam um emaranhado polimérico que envolve todas as células microbianas representam cerca de 70 a 95% da matéria orgânica da massa seca do biofilme.

A matriz polimérica é a responsável pela morfologia, estrutura, coesão, integridade funcional dos biofilmes e a sua composição determina a maioria das propriedades físico-químicas e biológicas dos biofilmes (Flemming e Wingender, 1999).

A composição química das EPS é muito heterogênea e complexa, no entanto, de uma maneira geral, são os polissacarídeos que predominam (Horan e Eccles, 1986; Wimpenny *et al.*, 1993) A matriz polimérica pode ser constituída por proteínas, substância húmicas, ácidos nucleicos (DNA, RNA), (Jahn e Nielsen 1995), glicoproteínas, fosfolípidos (Gehrke *et al.*, 1998), etc. De acordo com alguns autores esta matriz tem o potencial de prevenir o acesso físico de certos agentes antimicrobianos restringindo a difusão destes para o interior dos biofilmes (Elvers e Lappin-Scott, 2000; Gilbert *et al.*, 1997; Allison, 2003).

A estrutura interna dos biofilmes é caracterizada por uma heterogeneidade acentuada: as células encontram-se agrupadas em aglomerados contendo a rede de polímeros por elas excretados, entre estes aglomerados (“clusters”) encontram-se canais e poros preenchidos com o líquido onde a película está imersa.

Dos microrganismos, frequentemente, encontrados num biofilme, são as bactérias o grupo predominante. As elevadas taxas de reprodução, grande capacidade de adaptação e de produção de substâncias e estruturas extracelulares, são as principais características que fazem das bactérias organismos com grandes capacidades de produção de biofilme (Characklis *et al.*, 1990). *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Staphylococcus*, são os géneros mais comuns de bactérias produtoras de biofilme ainda que umas apresentem, naturalmente, uma maior aptidão que outras (Mattila-Sandholm e Wirtanen, 1992; Wirtanen, 1995).

A família de bactérias mais pesquisada, em termos de adesão a superfícies pertence à *Pseudomonadaceae*, sendo o género *Pseudomonas* o mais estudado. Morfologicamente, as *Pseudomonas fluorescens* têm forma de bastonete cujo comprimento pode variar entre 1,5 e 5 µm e apresentam, geralmente, um diâmetro inferior a 1 µm. São células procariontes Gram negativas, aeróbias, quimiorganotróficas ou quimiolitotoautotróficas facultativas, não são formadoras de esporos e possuem flagelos que lhes conferem mobilidade. O metabolismo das *Pseudomonas fluorescens* é do tipo respiratório. A sua taxa específica de crescimento depende do pH do meio, verificando-se o crescimento máximo a pH 7, diminuindo o crescimento para valores inferiores a pH 4,5 e superiores a 9 (Pinheiro, 1987). A *Pseudomonas fluorescens* produz um pigmento de cor esverdeada, que é fluorescente sob radiação ultravioleta (Stanier, 1995).

## 2.2 BIOFILMES: PREJUDICIAIS OU BENÉFICOS?

Os biofilmes podem ter efeitos prejudiciais ou benéficos, em diversas áreas tais como indústria, ambiente e saúde.

Quando a produção de biofilme é indesejada, este é designado, frequentemente, por “sujamento biológico” (em inglês, *biofouling*), podendo ocorrer em inúmeras situações, tais como: desenvolvimento nos permutadores de calor em centrais térmicas de produção de energia; circuitos de transporte de água (tubos, válvulas), diminuindo a qualidade da água (aumentando, conseqüentemente, os riscos da saúde pública); torres de arrefecimento, como no caso dos equipamentos de processamento do leite (tanques de armazenagem, pasteurizadores), assim como na deterioração das superfícies dos equipamentos (corrosão). No sector industrial, as principais conseqüência do sujamento biológico é a nível económico, devido à redução do desempenho dos processos, à diminuição da eficiência de operação dos equipamentos, e aos danos nas superfícies sólidas onde se acumulam. Como tal, há perdas de energia, verificando-se aumento no consumo energético e diminuição da qualidade dos produtos, bem como, despesas acrescidas de limpeza e manutenção através da substituição precoce de peças deterioradas dos equipamentos (Characklis, 1990).

Igualmente considerados indesejáveis e extremamente prejudiciais à saúde, são as películas bacterianas que se desenvolvem nos dentes, originando a cárie dentária e outras doenças da boca, nos pulmões, nos catéteres urinários, nas lentes de contacto, podendo originar infecções graves, por exemplo, em tecidos (osteomielite e endocardite) e rejeições do material das próteses (Costerton *et al.*, 1987; Morton e Surman, 1994; Neu, 1996).

A adesão de bactérias a superfícies de aço inox e de silicone na indústria alimentar (por ex: nos serviços de “catering”, nas mesas de fabrico e processamento de alimentos, etc) e nas área médica (instrumentos médicos, tubagens, etc) é um fenómeno recorrente que requer adequada limpeza e desinfecção e vigilância constante. Após uso, a limpeza química é sistematicamente aplicada nos equipamentos e superfícies, quer alimentares, quer médicas. No entanto, esta operação, quando não executada devidamente, pode eliminar apenas alguns dos microrganismos aderidos deixando outros na superfície (Boulangé-Petermann, *et al.*, 2004).

Os biofilmes sempre existiram na natureza onde se acumulam nos depósitos dos rios, lagos ou no mar sendo benéficos porque contribuem para a remoção de contaminantes da água. Têm sido usados em processos biotecnológicos, nomeadamente, no tratamento de

efluentes, removendo poluentes orgânicos e inorgânicos de águas contaminadas. Alguns dos exemplos mais vulgares da aplicação de sistemas de biofilme em tratamento de efluentes são os filtros de areia, os leitos percolador, os sistemas de biodiscos aplicados à purificação de água, etc. Na indústria alimentar, os biofilmes podem ser aplicados na produção de vinagre por oxidação biológica de etanol (Melo, 1994), de ácido cítrico e na produção de “sherry” (Gjaltema, 1996).

## 2.3 FORMAÇÃO DOS BIOFILMES

A acumulação de biofilme em superfícies é um fenómeno natural que acontece em meios aquosos e resulta de processos físicos, químicos e biológicos que ocorrem simultaneamente.

Na Figura 2.1 estão esquematizadas as diferentes etapas de formação de biofilme.

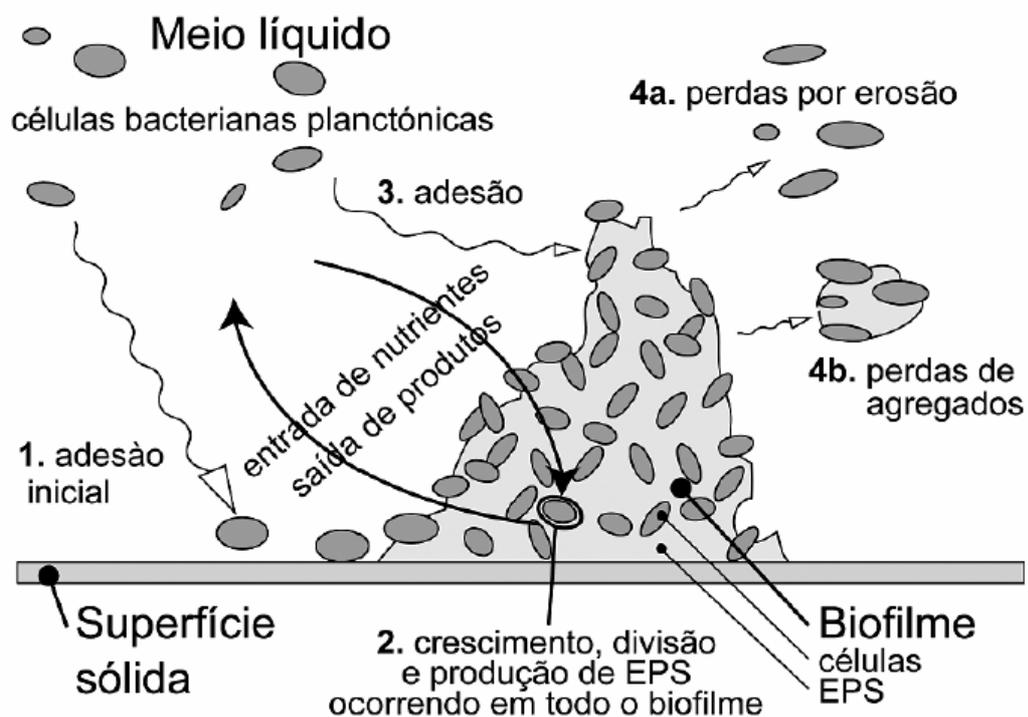


Figura 2.1- Etapas de formação de um biofilme (adaptado de Xavier *et al.*, 2003)

- Etapa 1- Transporte de células livres do meio líquido para uma superfície sólida e sua subsequente fixação;
- Etapa 2- Crescimento e divisão de células fixas à custa de nutrientes provenientes do líquido circundante, conjuntamente com a produção e excreção de EPS;
- Etapa 3- Fixação de células bacterianas flutuantes (e outras partículas), contribuindo para a acumulação do biofilme;
- Etapa 4- Libertação de material celular por vários tipos de mecanismos: (a) erosão superficial (perda de células individuais), (b) descolamento (“sloughing off”), (c), abrasão e (d) ataque por predadores.

O transporte de células livres do meio líquido para uma superfície sólida, e sua subsequente fixação, é a base de todo o desenvolvimento de um biofilme. Esta fase ocorre em poucos minutos após o transporte e adsorção à superfície de substâncias orgânicas dissolvidas no meio aquoso (Etapa 1 e 2). A velocidade a que ocorre a formação inicial do biofilme (também denominado de filme condicionador) depende da concentração de moléculas orgânicas no meio aquoso que contacta com a superfície sólida, da afinidade das moléculas para com o suporte e das condições hidrodinâmicas do meio líquido (Chamberlain, 1992) sendo de capital importância para a adesão das moléculas orgânicas as características da superfície do suporte (carga superficial, energia livre de superfície, rugosidade da superfície) (Marshall e Blainey, 1990 e Flemming, 1990).

Após ter ocorrido a formação inicial do biofilme, ocorre o transporte de células microbianas desde o meio aquoso até à superfície sólida (Etapa 3). Esse transporte ocorre devido ao gradiente de concentrações de microrganismos entre o meio aquático e a superfície. As moléculas existentes no desenvolvimento inicial do biofilme podem estabelecer ligações para uma adesão forte e estável através da formação de cadeias poliméricas com os microrganismos existentes à superfície, ou em consequência da motilidade que os microrganismos apresentam devido à existência de apêndices externos filamentosos, tais como *flagela*, *pili*, *fimbriae* (Characklis, 1990) para além das EPS. Uma vez formada a primeira camada de microrganismos, a adesão de outros microrganismos é favorecida. O desenvolvimento e reprodução dos primeiros colonizadores pode também contribuir para a modificação das propriedades superficiais da superfície do suporte, tornando-a mais adequada para a colonização subsequente dos microrganismos secundários, favorecendo assim a acumulação de biofilme (Charackils *et al.* 1990).

O processo de desprendimento de porções de biomassa de biofilme para o meio aquoso pode ter origem em fenómenos de erosão superficial, descolamento (“sloughing off”), abrasão e ataque por predadores (Characklis *et al.*, 1990; Gjaltema, 1996; Gantzer *et al.*, 1989) (Etapa 4). A erosão consiste na perda contínua de porções de biofilme causada pelas alterações ambientais, nomeadamente, a alterações de fluxo. A taxa de remoção do biofilme aumenta à medida que o biofilme se vai desenvolvendo. Esta remoção depende também da velocidade do fluido, tendo esta dois efeitos, pois se, por um lado, o seu aumento desencadeia um incremento das forças hidrodinâmicas e consequentemente da erosão, por outro lado favorece a formação de depósitos com maior resistência mecânica (Vieira, 1995).

O descolamento ou “sloughing off”, acontece quando há destacamento de grandes porções de biofilme em resultado da alteração de certas condições dentro do próprio

biofilme. Está associado a biofilmes espessos, desenvolvidos em ambientes ricos em nutrientes ou em condições de baixa tensão de corte.

A abrasão corresponde à perda de biofilme devido a repetidas colisões entre a superfície que suporta o biofilme e as partículas existentes no fluido, ou a colisões de partículas suspensas com biofilme (Gjaltema, 1996).

O ataque por predadores (“grazing”) pode também reduzir consideravelmente a acumulação de biofilme (Ratsak *et al.*, 1996) em resultado dos protozoários se alimentarem na superfície dos biofilmes bacterianos.

As próprias células englobadas no biofilme podem provocar o seu desprendimento pela segregação e excreção de enzimas que podem levar à quebra das ligações da matriz polimérica (Boyd e Chakrabarty, 1994).

## 2.4 PRINCIPAIS FACTORES QUE INFLUENCIAM A FORMAÇÃO DE BIOFILMES

De entre os diversos factores que afectam a formação de películas de biofilme e respectivas propriedades destacam-se: as características dos microrganismos; a composição e rugosidade das superfícies; a composição do fluido: o pH, a temperatura, a velocidade e turbulência do fluido; a presença de partículas inorgânicas.

O tipo de microrganismo afecta a formação de biofilmes porque se um microrganismo apresenta uma maior capacidade de produção de polímeros extracelulares, esse microrganismo adere com maior facilidade a suportes sólidos por ligação entre as cadeias de polímeros situadas na parede do organismo e no suporte.

O tipo de material, nomeadamente, a composição e rugosidade, é um factor importante na formação de biofilme porque quase todas as superfícies onde ocorre a deposição de microrganismos possui irregularidades. Estudos efectuados permitiram concluir que a rugosidade e porosidade do suporte condicionam a adesão celular. A transferência de massa do meio do líquido para o suporte parece aumentar devido a uma intensificação da turbulência e/ou aumento da área de transferência de massa (Vieira, 1995). A rugosidade de uma superfície pode aumentar a retenção de microrganismos, pois proporciona locais de abrigo menos afectados pelas forças do fluido. Estudos demonstraram que suportes sólidos com poros de dimensões equivalentes a cerca de 4 a 5 vezes o comprimento dos microrganismos constituíam as melhores superfícies de adesão (Vieira, 1995). O efeito da rugosidade da superfície é importante quando ocorre a adesão da primeira camada de microrganismos tendo menos influência quando uma superfície de adesão já tem biofilme formado.

Relativamente à composição do fluido, há vários parâmetros que influenciam a formação de biofilmes. A maioria dos biofilmes forma-se a valores de pH próximos da neutralidade. Alteração do pH para valores superiores ou inferiores a 7 irá com certeza afectar o desenvolvimento e actividade do biofilme, pois o pH tem um efeito preponderante no metabolismo microbiano (Pereira, 2001).

O pH também afecta as propriedades eléctricas dos microrganismos e da superfície dos sólidos, podendo alterar a repulsão electrostática entre eles e consequentemente o processo de adesão dos microrganismos às superfícies (Melo, 1994).

A concentração do substrato é um factor igualmente importante no desenvolvimento do biofilme. Estudos efectuados por Characklis (1990) demonstraram um aumento de biofilme com o aumento da carga orgânica, mantendo-se a velocidade constante.

Os efeitos da velocidade e turbulência do fluido têm um papel importante no desenvolvimento e estabilidade dos biofilmes. Quando se aumenta a velocidade esta vai interferir, por um lado, com a transferência de massa aumentando-a, o que poderá beneficiar o crescimento do biofilme e, por outro lado, quanto maior a velocidade maior a erosão e desprendimento de porções de biofilme, diminuindo a biomassa que está aderida ao suporte sólido. A redução em biomassa origina biofilmes menos espessos, o que vai favorecer o transporte dos nutrientes no interior do biofilme.

## 2.5 VANTAGENS E DESVANTAGENS DO DESENVOLVIMENTO EM BIOFILMES

### 2.5.1 Vantagens do desenvolvimento dos microrganismos em biofilmes

As principais vantagens destes sistemas de biomassa imobilizada - biofilmes - relativamente aos de biomassa suspensa são:

- Aumento da concentração de nutrientes nas interfaces líquido-biofilme uma vez que a matriz polimérica favorece a adsorção de moléculas de nutrientes;
- Protecção contra factores ambientais agressivos, como por exemplo as flutuações de pH, concentração de sais, desidratação, substâncias químicas agressivas, agentes bactericidas, predadores, antibióticos.
- Possibilidade de troca de material genético devido aos longos tempos de retenção dos microrganismos.
- Facilidade de desenvolvimento de microconsórcios que permitem o estabelecimento de relações de simbiose (líquenes) bem como a utilização de substratos de difícil degradação (ex: celulose)
- Capacidade para estabelecer e colonizar nichos ecológicos.

### 2.5.2 Desvantagens do desenvolvimento dos microrganismos em biofilmes

A existência de uma matriz a envolver e proteger os microrganismos apresenta dois principais inconvenientes:

- Introdução de resistências adicionais ao transporte de substâncias e metabolitos resultantes da actividade celular;
- Desvio do substrato para a produção dos EPS em detrimento da produção de células.

Esses inconvenientes traduzem-se, por vezes, numa redução da taxa específica de crescimento dos microrganismos inseridos no biofilme, relativamente à dos mesmos em suspensão.

## 2.6 ESTRATÉGIAS DE CONTROLO DE BIOFILMES

Para que não haja acumulação indesejável de biofilmes em qualquer sistema industrial é necessário controlar a sua formação. Para isso é necessário definir estratégias de actuação de carácter preventivo, onde se evita ou retarda a formação de biofilmes. Algumas medidas podem ser aplicadas:

- Definição e implementação de um plano de limpeza
- Redução da concentração de substâncias orgânicas (nutrientes) na corrente líquida
- Implementação de técnicas de monitorização de biofilmes, inspecção visual da acumulação de biofilme e de sinais de corrosão
- Projectção e desenho adequado dos equipamentos (evitar zonas mortas e zonas de estagnação, utilização de materiais de construção de superfícies lisas,...).

Devem-se também definir estratégias de carácter curativo, onde se remove total ou parcialmente os biofilmes já formados.

Várias estratégias de controlo de biofilmes podem ser implementadas dependendo da extensão do problema. Essas estratégias podem recorrer a métodos físicos, químicos e biológicos.

Os métodos físicos envolvem técnicas de remoção física de biofilmes. Exemplos deste método são a limpeza manual, a aplicação de ultra-sons, a radiação ultravioleta, a injeção de ar ou gás e os choques térmicos.

Quando as medidas preventivas e os métodos físicos não são suficientes para evitar a acumulação do biofilme e as suas consequências implementam-se, geralmente, os métodos químicos que envolvem a aplicação de compostos com capacidade de remoção da massa de biofilme e inactivação dos microrganismos que permanecem na superfície. Estes compostos são substâncias químicas com propriedades antimicrobianas, dispersantes e/ou tensioactivas (ex. surfactantes)- cujos mecanismos de acção passam pela fragilização da matriz polimérica dos biofilmes, pelo enfraquecimento das interações biofilme - superfícies de adesão e pela dispersão de depósitos microbianos. A nível industrial tem-se vindo, gradualmente, a utilizar cada vez mais os compostos biodegradáveis e menos tóxicos, especialmente surfactantes sintéticos, denominados por dispersantes ou biodispersantes (Lutey, 1995). O motivo para o

uso de produtos biodegradáveis de baixa toxicidade é o de restringir que afectem outros microrganismos que não os microrganismos alvo, pois esses produtos acabarão por chegar ao meio. No entanto, todos os químicos têm algum efeito na vida animal e das plantas. A diluição e degradação natural poderão inactivar esse efeito.

Já tem havido investigações em que se demonstrou que quando os tratamentos químicos são realizados por períodos muito longos, as bactérias tornam-se resistentes pois estas adaptam-se e tornam-se tolerantes ao agente antimicrobiano. A resistência dos microrganismos aos agentes antimicrobianos pode ser, essencialmente, de três tipos: resistência natural ou inerente ou intrínseca; resistência adquirida devido à mutação e resistência por adaptação (Cloete, 2003; Heinzl, 1998). Bactérias intrinsecamente resistentes são bactérias cujas propriedades naturais podem reduzir ou prevenir acções bacterianas. Geralmente é verificado que as bactérias Gram – são menos susceptíveis a biocidas e antibióticos do que as bactérias Gram+ (McDonnell e Russell, 1999). A resistência intrínseca nas bactérias Gram- podem envolver vários mecanismos, sendo o mais importante as propriedades de protecção da membrana externa. No caso da resistência adquirida, os mecanismos de resistência surgem, geralmente, como resultado da aquisição de material genético ou de mutação. Também podem ocorrer trocas genéticas resultantes da conjugação, transformação ou mutações no genoma da célula (Cloete, 2003; Lambert *et al.*, 2001). Numa colónia de biofilme, onde as células microbianas estão mais próximas umas das outras, acredita-se que esta proximidade pode aumentar a troca de material genético. A resistência adaptativa é um tipo de resistência que as bactérias rapidamente perdem assim que se alteram as condições fisiológicas (Heinzl, 1998).

Dos diferentes tipos de resistência bacteriana, a resistência intrínseca é considerado o mecanismo mais utilizado pelas bactérias para se adaptarem às condições físico-químicas agressivas a que são submetidas (McDonnell e Russell, 1999).

### 2.6.1 Surfactante

Surfactante é uma abreviação de “agente activo de superfícies”, que significa “activo à superfície”. Um surfactante é caracterizado pela sua tendência de adsorver em superfícies e interfaces.

Os surfactantes têm sido intensivamente usados no controlo da formação de biofilmes no equipamento industrial, especialmente na indústria alimentar (Zottola e Sashara, 1994; Paulus, 1993).

### 2.6.1.1 *Classificação dos surfactantes*

Os surfactantes são caracterizados pela sua capacidade de reduzir a tensão superficial dos fluidos aquosos. Esta característica permite-lhes actuar como substâncias detergentes, agentes humificantes, e emulsionantes. Alguns investigadores definiram-os como moléculas com duas partes distintas: a parte hidrofóbica (parte apolar que repele a água) e a parte hidrofílica (parte polar que atrai a água). A parte hidrofílica (polar) é referente ao grupo da cabeça e a parte hidrofóbica (apolar) à cauda.

A uma concentração baixa o surfactante é uniformemente distribuído, enquanto que se estiver em concentrações elevadas, o surfactante forma micelas. A concentração a partir da qual se inicia o processo de formação das micelas, ao qual se dá o nome de micelização é chamada de CMC (Concentração Miceliar Crítica) que é uma propriedade intrínseca e característica do surfactante. A formação das micelas pode ser vista como um mecanismo alternativo à adsorção em interfaces, mediante o isolamento do contacto com a água dos grupos hidrofóbicos, reduzindo-se, assim, a energia livre do sistema. É um fenómeno considerado de grande importância uma vez que as moléculas de surfactante se tornam muito diferentes quando presentes em micelas ou unidades livres em solução.

As micelas são esferas de agregados de moléculas caracterizadas por um núcleo hidrofóbico e uma superfície externa hidrofílica. Numa micela, a parte da cabeça (grupo hidrofílico) encontra-se em contacto com a água enquanto que a parte da cauda, como é hidrofóbica, encontra-se no interior da micela. Assim, quando um surfactante, em solução aquosa, é adsorvido, a superfície hidrofóbica normalmente orienta o grupo hidrofóbico para a superfície e expõe o grupo polar à água. A superfície torna-se assim hidrofílica e, como resultado, a tensão interfacial entre a superfície e a água é reduzida.

A classificação primária dos surfactantes é feita de acordo com a natureza iónica do grupo cabeça polar, sendo designados de aniónicos, catiónicos, não-iónicos e anfotéricos, conforme esse grupo de cabeça seja um anião, um catião, não tenha carga ou contenha dois grupos de carga de diferente sinal, respectivamente.

Os surfactantes mais vulgarmente utilizados são os surfactantes aniónicos e catiónicos. Ambos têm um papel na desinfecção pois podem inactivar células vivas (McDonnell e Russell, 1999) e alterar as propriedades superficiais da superfície de adesão e, por este motivo, contribuir para prevenir a adesão (Campbell *et al.*, 1999) e promover o destacamento de

células aderidas. Os surfactantes aniónicos reduzem a permeabilidade da parede celular e podem dissolver a membrana celular. Os surfactantes catiónicos adsorvem à superfície da membrana celular e reagem com os fosfolípidos que compõem a membrana citoplasmática e, também, reagem quimicamente com a carga negativa dos iões associados à parede celular (Lutey, 1995). A força electrostática estabelecida entre o químico e a célula cria “stress” na parede levando à lise celular e conseqüentemente à morte da célula.

Os compostos quaternários de amónio (QAC's) representam o grupo dos surfactantes catiónicos e manifestam, normalmente, actividade antimicrobiana. Os QAC's causam a morte celular por desnaturaçã das proteínas, alterando a permeabilidade da parede celular e reduzindo a entrada normal de nutrientes na célula. Conseqüentemente, há libertaçã de  $K^+$  intracelular e de outros constituintes intracelulares e induzindo-se a autolise celular (Ishakawa *et al.*, 2002; McDonnell e Russell, 1999; Tabata *et al.*, 2003).

A actividade antimicrobiana do QAC's depende da sua estrutura e tamanho, mas depende, especialmente, do comprimento da cadeia longa do grupo alquilo. A eficácia dos QAC's aumenta com a temperatura e o pH, sendo as condições alcalinas as mais favoráveis. A  $pH < 3$  os QAC's são praticamente ineficientes.

No presente trabalho, o surfactante testado foi o cloreto de benzalcónio (BAC) preparado em soluções de concentrações abaixo da sua concentraçã micelar crítica (CMC) de  $5,3 \times 10^{-3} M$  deste surfactante (Smith *et al.*, 2002).

### **2.6.1.2 Cloreto de Benzalcónio (*alkyldimethylzylammonium chloride*)**

O cloreto de benzalcónio (BAC) é uma mistura de compostos de alkyl benzyl dimethyl ammonium. O BAC tem vindo a ser utilizado como um agente antimicrobiano e surfactante na indústria, em produtos de limpeza, em preparações farmacêuticas e em produtos de consumo. Devido à grande capacidade de desinfecçã que tem vindo a evidenciar, a concentraçã de uso é, normalmente, menor que 1% (Gardner *et al.* 2000), sendo, especialmente, eficaz entre pH 6 e 8.

A estrutura química do cloreto de benzalcónio é mostrada na figura seguinte (Figura 2.2).

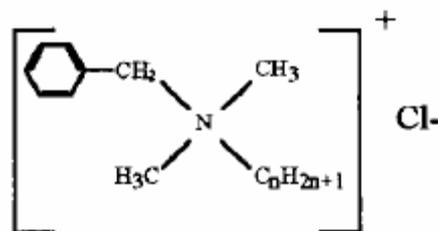


Figura 2.2- Estrutura química do cloreto de benzalcónio - BAC (adaptado de McDonnell *et al.*, 1999)

A natureza surfactante destes compostos dificulta a análise devido à agregação dos compostos e à formação de micelas.

O seu largo espectro de actividade antimicrobiana cobre bactérias, leveduras, fungos, algas, líquenes e organismos formadores de biofilme. Como composto activo nas superfícies, o BAC, quando usado em concentrações de 1 a 2%, reduz a tensão superficial da água, causa uma boa humedificação e penetração em profundidade estando, portanto, garantidas condições para ser utilizado como agente de pré-tratamento de superfícies.

O cloreto de benzalcónio tem vindo, também, a ser usado como um ingrediente activo em desinfectantes. No entanto, tem sido observado uma relativa fraca actividade antimicrobiana contra *Pseudomonas* e *Aspergillus* (Paulus, 1993), bem como, a sua inactivação por detergentes aniónicos e matéria orgânica.

No presente trabalho, a actividade antimicrobiana do surfactante BAC foi testada em biofilmes de *Pseudomonas fluorescens* formados sobre superfícies de aço inoxidável e silicone. A eficácia antimicrobiana do BAC foi avaliada em termos da sua capacidade de inactivação e de remoção de biofilme determinando-se, respectivamente, a actividade respiratória das bactérias constituída nos biofilmes e a variação da massa de biofilme (através da avaliação do seu peso seco).

### 2.6.2 Estudo da susceptibilidade das células bacterianas ao surfactante

A concentração dos agentes antimicrobianos é um dos factores mais importante a determinar de forma a haver sucesso aquando da sua aplicação (Russell e MacDonnell, 2000). O uso de concentrações baixas (concentrações inibitórias ou sub-letais) pode conduzir ao desenvolvimento de fenómenos de adaptação que se podem traduzir em resistência adaptativa dos microrganismos a esses produtos antimicrobianos (Mereguetti, *et al.*, 1999). Tendo em conta que a concentração do biocida é um factor determinante na eficácia antimicrobiana do mesmo, o estudo do efeito da alteração da concentração na taxa de

inactivação das células, pode ser determinado com base em alguns parâmetros. A sensibilidade das células bacterianas à acção dos agentes antimicrobianos é, normalmente, determinada pela concentração mínima necessária para inibir o crescimento dos microrganismos (Concentração Mínima de Inibição - MIC), em que os microrganismos contactam desde o início do seu crescimento (inoculação) com o agente antimicrobiano. Para a obtenção do MBC (concentração mínima bactericida), o microrganismo é inicialmente desenvolvido e só depois sujeito à agressão do produto antimicrobiano (Johnson *et al.*, 2002; Gilbert *et al.*, 2003; Ishikawa *et al.*, 2002). O MBC é normalmente referido como a concentração à qual já não se detecta actividade dos microrganismos, depois de um determinado tempo de contacto destes com os agentes antimicrobianos (geralmente 99,9% de inactivação). Refira-se, no entanto, que por vezes os conceitos de MIC e MBC são usados quase indistintamente, apesar destes se obterem com condições operatórias diferentes.

Neste trabalho, o estudo comparativo da susceptibilidade das bactérias *Pseudomonas fluorescens*, em suspensão e desenvolvidas em biofilmes, ao surfactante (BAC) foi caracterizada em termos de MBC, quer para as bactérias em suspensão, quer para as bactérias associadas em microcolónias (biofilme). Refira-se que em relação a estes últimos, o uso da denominação MBC, foi substituída pela denominação BIC, isto é, a concentração mínima de inactivação de biofilme (Johnson *et al.*, 2002).

## 2.7 SUBSTÂNCIA INTERFERENTE

A matéria orgânica pode interferir com a eficiência antimicrobiana de vários produtos usados na limpeza e desinfecção de superfícies, como, por exemplo, os produtos surfactantes (Ishikawa *et al.*, 2002). Frequentemente, estabelecem-se interações entre o surfactante 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 surfactante pode também ser devida à barreira protectora criada pela matéria orgânica em torno dos microrganismos, protegendo-os do ataque dos agentes antimicrobianos. Uma adequada limpeza das superfícies antes da aplicação do surfactante ou a aplicação, conjuntamente com o surfactante, de um detergente adequado poderá resolver este tipo de inibição da acção do agente antimicrobiano por matéria orgânica.

No trabalho realizado, a substância interferente utilizada foi a albumina de soro bovino (BSA), que é uma das substâncias recomendadas pela norma europeia EN 1276:1997. Segundo esta norma, para simulação de condições sujas deve-se testar a BSA na concentração de 3 g/L.

## 2.8 ESTABILIDADE FÍSICA DOS BIOFILMES

A estabilidade física dos biofilmes, isto é, o seu comportamento físico face a alterações das condições hidrodinâmicas do meio circundante, é uma característica de grande importância, quer em biofilmes benéficos, quer em biofilmes prejudiciais, pois tem um papel determinante na estrutura e função dos sistemas de biofilme.

Tal como já referido, os biofilmes são microambientes complexos onde as bactérias estão envolvidas numa matriz polimérica que lhes confere protecção face a factores agressivos ambientais externos (Campanac *et al*, 2002). A matriz polimérica contribui para a estabilidade física dos biofilmes pelo preenchimento e formação de espaços entre as células bacterianas, mantendo-as juntas.

Os procedimentos de controlo da formação de biofilmes incluem normalmente a aplicação de agentes químicos e forças mecânicas. O uso somente de produtos químicos pode não bastar para a limpeza e remoção dos biofilmes, uma vez que, regra geral, os biocidas podem inactivar os biofilmes mas, estes permanecerem aderidos às superfícies (Flemming, 1996). Esta situação não é desejável, pois estes biofilmes podem, posteriormente, recuperar a sua actividade e/ou serem utilizados como suporte para o desenvolvimento de novos biofilmes, bem como, serem usados como substrato por outros microrganismos. Com as medidas mecânicas de remoção de biofilme, pretende-se obviar essa situação, isto é, pretende-se remover esses biofilmes inactivos por variações bruscas das condições hidrodinâmicas do meio (nomeadamente, as forças de tensão de corte). Para que as acções mecânicas tenham sucesso, é importante saber, antecipadamente se a aplicação de produtos químicos favorece ou prejudica a coesão da estrutura do biofilme e assim interferir com as medidas físicas de remoção de biofilme.

Sendo assim, neste trabalho, também se procurou avaliar se a aplicação do BAC alterava a estabilidade física intrínseca dos biofilmes, afectando, assim, o posterior tratamento mecânico de remoção dos biofilmes.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

---

No presente capítulo são descritos os métodos analíticos e instrumentais utilizados na execução do trabalho experimental. São também referidas as metodologias e equipamentos utilizados no cultivo dos microrganismos na forma planctónica e na forma de biofilme. Apresenta-se, ainda, uma caracterização sumária do surfactante (BAC) testado, assim como, a proteína BSA..

---

### 3.1 MICRORGANISMO

O microrganismo utilizado ao longo dos ensaios laboratoriais, tanto nos ensaios em suspensão como nos ensaios de formação de biofilme, foi uma estirpe da bactéria Gram-*Pseudomonas fluorescens* obtida da colecção americana (ATCC 13525). Optou-se por esta bactéria porque esta possui uma grande capacidade de formação de biofilme, assim como, também, pertence ao género *Pseudomonas*, que é um dos géneros mais frequentemente encontrados nos circuitos de água dos sistemas industriais (Mattila-Sandholm e Wirtanen, 1992; Bott, 1995).

#### 3.1.1 Modo de preservação

A bactéria *Pseudomonas fluorescens* foi conservada a 4 °C, em tubos de ensaio inclinados e rolhados com algodão cardado com meio sólido de nutriente agar. Periodicamente, a cultura era repicada para novos inclinados de nutriente agar.

A reactivação das células foi feita por espalhamento da bactéria em meio sólido de nutriente agar (20 g/L) em placas de Petri. As placas de Petri foram postas a incubar a 27±1°C, durante cerca de 24 h. As colónias assim obtidas constituíam o “stock” de bactérias para utilização posterior.

#### 3.1.2 Meio de cultura

A bactéria *Pseudomonas fluorescens* cresceu eficazmente em meio sintético aquoso cuja composição está descrita na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Composição do meio de cultura para a *Pseudomonas fluorescens*

Componentes	Concentração (g/L)
Glucose	5
Peptona	2.50
Extracto de levedura	1.25
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.88
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,15

O meio de cultura foi preparado dissolvendo todos os componentes mencionados na tabela anterior, em água destilada.

Todos os meios de cultura utilizados, quer para preparação de inóculos quer para a alimentação dos reactores, foram esterilizados num autoclave durante 20 min a 121°C.

A preparação dos meios de cultura, utilizados nos diversos ensaios, foi efectuada com tampão fosfato pH 7, de modo a proporcionar o pH óptimo de crescimento da bactéria *Pseudomonas fluorescens*. O tampão utilizado na lavagem das células foi o tampão fosfato salino (PBS) também a pH 7.

A composição das soluções tampão está resumida na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Composição das soluções tampão a pH 7 utilizadas nos diferentes ensaios

Componente	Tampão Fosfato (pH 7)	Tampão PBS (pH 7)
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (g /L)	0,75	0,75
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (g/L)	3,12	3,12
NaCl (g/L)	-	0,25

### 3.1.3 Preparação do inóculo

Na inoculação dos reactores foi necessária uma quantidade suficiente de bactérias, assim como, foi necessário que estas se encontrassem em fase de crescimento exponencial.

Para tal procedeu-se do seguinte modo:

- Em condições de assepsia, inoculou-se 200 mL de meio de cultura, num matraz de 500 mL, com células obtidas a partir do espalhamento da bactéria em placas de Petri;
- Incubou-se a 27 °C, com agitação orbital (140 rpm) durante, aproximadamente, 12 h (o tempo necessário para que a cultura atingisse a fase exponencial de crescimento);
- Decorrido esse tempo, as suspensões bacterianas foram utilizadas para ensaios em suspensão, bem como para inoculação dos reactores de formação de biofilme.

### 3.2 SUPERFÍCIES DE ADESÃO

Para os ensaios que envolveram a formação de biofilmes, foram utilizadas placas de aço inox 316 e placas de silicone como superfícies de adesão (de dimensões 2,5×2,5cm e 1mm de espessura). Estes materiais foram escolhidos pois grande parte dos equipamentos industriais, nomeadamente na indústria alimentar, e instrumentos e superfícies médicas são fabricados com estes materiais.

O aço inox é largamente usado na indústria alimentar pois é considerado um material de fácil limpeza e resistente à corrosão em soluções alcalinas ou ácidas (Boulangé-Petermann, 2004). No entanto, num meio como a água, ar ou área alimentar, o aço inox é modificado pela adsorção de camadas orgânicas, camada, usualmente, referida como filme condicionador. Este filme modifica as propriedades físico-químicas da superfície do material.

Antes de serem usadas, as placas de aço inox, foram polidas com lixa de água sendo posteriormente desengorduradas (detergente comercial), lavadas abundantemente com água da torneira e em seguida com água destilada. As placas de silicone foram desengorduradas e lavadas do mesmo modo como se procedeu para as placas de aço inox, tendo-se, contudo, efectuado o polimento com esfregão verde (comercial) em vez da lixa de água.

### 3.3 SURFACTANTE

O objectivo deste trabalho foi avaliar o potencial antimicrobiano de um surfactante, na remoção e inactivação das bactérias *Pseudomonas fluorescens* aderidas às superfícies referidas no ponto 3.2 bem como, na inactivação das suspensões bacterianas.

O surfactante testado foi o Cloreto de Benzalcónio (BAC) obtido da Calbiochem (Cat.no.198901). Este surfactante pertence ao grupo dos compostos quaternários de amónio (QAC) (Paulus, 1993).

Na Tabela 3.3 são apresentadas algumas características deste produto.

Tabela 3.3 - Características do surfactante – Cloreto de Benzalcónio

Parâmetro	Cloreto de Benzalcónio
<b>Fórmula química</b>	$[C_6H_5H_2N(CH_3)CH_3R]Cl$
<b>Peso molecular</b>	354
<b>Estado físico</b>	Líquido (viscoso)
<b>Cor</b>	Incolor a amarelo pálido
<b>Solubilidade em água</b>	Solúvel
<b>pH a 20°C</b>	7 e 8
<b>Ponto de solidificação</b>	Aproximadamente +5 a -12°C

O surfactante BAC foi fornecido no estado líquido viscoso com concentração 0,444 M, a partir do qual se preparou uma solução stock por diluição 1:40 em água ultra-pura, à temperatura ambiente. Era a partir desta solução que se preparavam, por diluição com água, as diversas concentrações de trabalho. De cada vez que se realizava um ensaio, uma nova solução de diluição de 1:40 foi preparada de forma a garantir que a mesma se mantinha com características constantes.

#### 3.3.1 Concentrações de trabalho

Nos testes laboratoriais realizados as concentrações de surfactante usadas, foram sempre as mesmas, ou seja, 1,95 E-3 mM; 0,00391 mM; 0,00781 mM; 0,0156 mM; 0,0313 mM; 0,0625 mM; 0,125 mM; 0,25 mM; 0,5 mM; e 1 mM. O critério base de selecção destas

concentrações do BAC foi operar abaixo da concentração miceliar crítica (CMC=  $5,3 \times 10^{-3} \text{M}$ ) deste surfactante (Smith *et al.*, 2002).

### 3.3.2 Condicionamento das placas de aço inox e silicone

No estudo da influência do BAC na adesão de *Pseudomonas fluorescens* às superfícies, placas de aço inox e silicone foram pré-tratadas com concentrações de surfactante de 0,0625 mM; 0,125 mM; 0,25 mM; 0,5 mM. Este pré-tratamento, que foi denominado de condicionamento foi realizado colocando placas de aço inox e silicone em matrizes contendo soluções de surfactante a várias concentrações, durante 30 minutos.

### 3.3.3 Substância interferente (Albumina de soro bovino)

Uma das partes do trabalho experimental incluiu a avaliação do comportamento do surfactante quando em presença de uma potencial substância interferente. Optou-se pela proteína albumina de soro bovino (BSA), uma vez que as proteínas podem influenciar a actividade antimicrobiana de biocidas e surfactantes (Simões *et al.*, 2003) e também porque é esta que é recomendada pela Norma EN 1276:1997. A proteína utilizada neste estudo foi obtida da Merck.

A caracterização da proteína utilizada, a BSA, está na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 - Características físicas e químicas da proteína BSA

Parâmetro	BSA
Peso Molecular	68000
Cor	Amarela
pH (60 mg/mL água)	6,8 – 7,2
Albumina	≥98 %
Proteína	≤95 %
Glicose	≤0,05 %
Glicerol	≤0,005 %
L-Lactase	≤0,1 %

### **3.4 ENSAIOS REALIZADOS COM CULTURA DE *Pseudomonas fluorescens***

Neste trabalho, a investigação experimental envolveu, numa fase inicial, o estudo do modo de acção do surfactante em culturas em suspensão de *Pseudomonas fluorescens* e, numa fase posterior, a investigação do modo de actuação do mesmo surfactante nas bactérias *Pseudomonas fluorescens* quando estas estavam constituídas em biofilme.

#### **3.4.1 Ensaios com *Pseudomonas fluorescens* em suspensão**

Para a preparação das suspensões celulares, as culturas bacterianas de *Pseudomonas fluorescens* crescidas em matraz durante 24 h (segundo o procedimento referido no ponto 3.1.3) foram centrifugadas a 5000 rpm, durante 7 min, a 20 °C, e lavadas 3 vezes com PBS por centrifugação. O pellet obtido foi, depois, ressuspenso num determinado volume de tampão fosfato de modo a obter-se uma suspensão bacteriana com densidade óptica próxima de 0,4 (absorvância a 640 nm). Esta suspensão foi, depois, distribuída por matrizes de 100 mL (cada um contendo 50 mL de suspensão bacteriana) para os ensaios posteriores de averiguação da eficácia do BAC.

##### **3.4.1.1 Aplicação do surfactante**

A cada matraz (100 mL) contendo 50 mL de suspensão bacteriana foram adicionados volumes adequados da solução de surfactante de modo a obter-se concentrações finais de BAC de 1,96E-3 mM; 0,00391 mM; 0,00781 mM; 0,0156 mM; 0,0312 mM; 0,0625 mM; 0,125 mM; 0,25 mM; 0,5 mM e 1 mM. Durante os ensaios os matrizes, contendo as suspensões bacterianas, foram mantidos em agitação (120 rpm) e à temperatura de, aproximadamente, 27±1 °C. Após 30 min de contacto das células bacterianas com o BAC, procedeu-se à lavagem da suspensão bacteriana com PBS. Para tal, a suspensão bacteriana foi vertida para tubos de centrífuga adequados e centrifugada a 4000 rpm durante 7 min. O pellet obtido foi, posteriormente, lavado três vezes com PBS por centrifugação, por forma a garantir-se a ausência de glucose bem como de outras fontes externas de energia. Com esta prática de lavagem também se garantiu que a concentração residual de BAC em cada suspensão bacteriana foi reduzida a um nível significativamente inferior ao da concentração mínima inibitória do BAC (resultados não apresentados). Desta forma, a acção tóxica do surfactante

foi praticamente neutralizada tornando dispensável o uso de um neutralizador específico. O pellet bacteriano obtido após as lavagens foi ressuspensionado em 50 mL de tampão fosfato pH 7. Estas suspensões bacterianas foram reservadas para posterior avaliação da sua actividade respiratória.

Quando se pretendeu avaliar o efeito do tempo de contacto do surfactante com a suspensão bacteriana, na actividade respiratória da mesma, o procedimento experimental seguido compreendeu a aplicação de uma só concentração de BAC (0,0625 mM) às suspensões bacterianas variando-se somente o tempo de contacto (5 min; 15 min; 30 min; 45 min e 60 min). Após cada tempo de contacto, as suspensões bacterianas foram lavadas de acordo com o procedimento acima referido.

Em todos os testes efectuados, alguns matrizes representativos das suspensões bacterianas foram reservados para controlo e a estes não foi adicionado o surfactante.

#### **3.4.1.2 Adição de BSA às suspensões bacterianas**

Para a avaliação da interferência da BSA na actividade respiratória da *Pseudomonas fluorescens*, a cada um dos matrizes contendo 50 mL de suspensão bacteriana foi, previamente, adicionada uma determinada quantidade de BSA por forma a obter-se uma concentração final, em cada matriz, de 3 g/L (concentração recomendada pela norma europeia EN 1276:1997 para simulação de condições sujas). Estes matrizes contendo as suspensões bacterianas mais a BSA foram colocados numa incubadora orbital com uma agitação de 120 rpm. Ao fim do tempo de contacto pretendido entre a suspensão bacteriana e a BSA, procedeu-se à recolha do pellet bacteriano bem como à sua lavagem da mesma forma como referido no ponto 3.4.1.1. Depois do pellet ressuspensionado em tampão fosfato a pH 7 procedeu-se à determinação da actividade respiratória microbiana.

Nos ensaios da avaliação da influência da BSA na eficiência antimicrobiana do BAC, 3 g/L de BSA foram adicionados à suspensão bacteriana (D.O.<sub>640</sub> inicial de 0,4). Após homogeneização da suspensão bacteriana com a BSA, a suspensão resultante foi repartida pelos diferentes matrizes, cada um contendo um volume de 50 mL. Após esta fase, para os ensaios de avaliação da influência da BSA na eficiência antimicrobiana do BAC, quando utilizado contra a bactéria *Pseudomonas fluorescens*, as suspensões bacterianas, contendo a proteína, estiveram 30 min em contacto com diferentes concentrações de BAC (1,96E-3 mM; 0,00391 mM; 0,00781 mM; 0,0156 mM; 0,0312 mM; 0,0625 mM; 0,125 mM; 0,25 mM; 0,5 mM e 1 mM), encontrando-se os matrizes em agitação contínua (120 rpm). No fim dos 30

min, procedeu-se à lavagem da cultura bacteriana de acordo com o protocolo atrás descrito e à determinação da actividade respiratória específica das bactérias.

Em todos os ensaios realizados, alguns matrizes representativos das suspensões bacterianas com 3 g/L de BSA foram reservados para testes de controlo e a estes não foi adicionado o surfactante.

### 3.4.2 Ensaios com biofilme formado por *Pseudomonas fluorescens*

#### 3.4.2.1 Instalação experimental

Nesta fase da investigação em que se pretendeu avaliar o modo de actuação do surfactante nas bactérias *Pseudomonas fluorescens* quando estas estavam constituídas em biofilme foi necessário montar um sistema experimental para formação de biofilme (Figura 3.1 e Figura 3.2).



Figura 3.1- Fotografia geral da instalação experimental

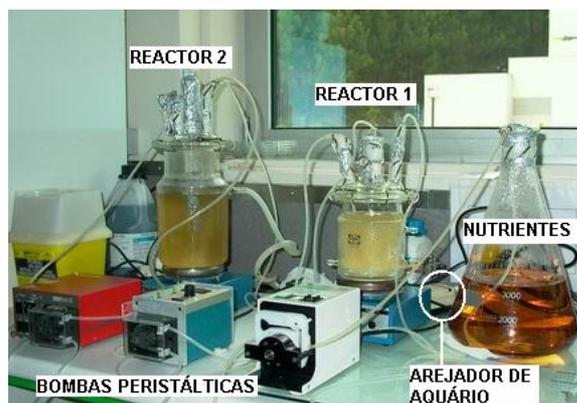


Figura 3.2- Fotografia mais pormenorizada da instalação experimental

Este sistema compreendia, essencialmente, dois reatores: um deles de 0,5 L de volume útil (denominado de fermentador) era aquele onde se procedia ao desenvolvimento contínuo da *Pseudomonas fluorescens* para inoculação contínua de um segundo reactor de 2 L de volume.

### **Reactor 1 (Fermentador)**

Para a obtenção de uma fonte constante de bactérias *Pseudomonas fluorescens* em fase exponencial de crescimento, preparou-se um reactor de vidro de 0,5 L e esterilizou-se em autoclave, a 121 °C durante 15 min, já contendo meio de cultura tamponado (preparado de acordo como descrito no ponto 3.1.2), a barra magnética para posterior agitação, o tubo dispersor de oxigénio para o arejamento, as tubagens (de silicone) para a alimentação e arejamento do reactor. A agitação foi promovida pela introdução de uma barra magnética adequada no interior do reactor e este permaneceu sobre uma placa de agitação de velocidade regulável. Quanto ao arejamento do reactor, este era implementado pela entrada de ar atmosférico através de um arejador de aquário. Antes de entrar no fermentador, o ar atravessava um filtro de disco (GyroDisc de porosidade 0,2 µm) para evitar qualquer tipo de contaminação do ambiente exterior, como partículas e microrganismos.

Antes da inoculação do fermentador foram fixadas as condições óptimas de operação no que respeita à velocidade de agitação e ao arejamento.

O reactor contendo meio de cultura já esterilizado, foi inoculado com a transferência de um inóculo entretanto preparado em condições assépticas (como descrito no ponto 3.1.3).

Inicialmente o reactor foi colocado em modo descontínuo durante cerca de 24 h até que as células atingissem uma concentração elevada. Terminado este tempo, o reactor passou a funcionar em modo contínuo pela alimentação (100 mL/h) de meio de cultura fresco através de uma bomba peristáltica. O nível do fermentador foi mantido pela saída do excesso

de cultura microbiana para o reactor 2 por um tubo de silicone através de uma bomba peristáltica.

### ***Reactor 2***

Para o estudo da acção do surfactante sobre biofilmes de *Pseudomonas fluorescens* foi necessário promover a formação de biofilmes nas superfícies de adesão seleccionadas. Na formação de biofilmes em placas suspensas, foi necessário um suporte metálico construído para o efeito. Este suporte era constituído por uma vareta central de aço inox que possuía hastes perpendiculares dobrados na ponta para pendurar as várias placas de aço inox/silicone (Figura 3.3)

A tampa do reactor 2 possuía num dos orifícios uma rolha de borracha perfurada para acomodar o suporte das placas para adesão dos microrganismos.

O conjunto formado pelo reactor, suporte com placas de aço/silicone, tubagens e barra magnética, meio de cultura, devidamente acondicionados, foi esterilizado em autoclave a 121 °C durante 15 min. O nível deste reactor foi mantido pela saída de excesso de cultura microbiana para o esgoto através de um tubo “ladrão”.



Figura 3.3- Pormenor do suporte das placas de aço inox/silicone

#### ***3.4.2.2 Formação de biofilme em placas suspensas***

A formação de biofilme era promovida nas placas de adesão instaladas no reactor 2, reactor este continuamente alimentado e inoculado com cultura microbiana proveniente do fermentador (reactor 1) (Figura 3.1 e Figura 3.2).

A alimentação do reactor 1 (a um caudal de 10 mL/h) era fornecida através de uma bomba peristáltica a partir de um matraz de 5 litros que continha meio de crescimento esterilizado. Para que não houvesse formação de espumas foram adicionadas umas gotas de agente anti-espumante a este meio de cultura. Parte da cultura produzida neste reactor (cerca de 100 mL/h) foi encaminhada por uma bomba peristáltica através de uma tubagem de

silicone para inocular continuamente o reactor 2, mantendo-se assim, também, um nível constante de suspensão bacteriana no reactor 1.

O reactor 2 foi também alimentado com um meio de cultura fresco diluído. O caudal de alimentação do meio de cultura fresco diluído foi ajustado para cerca de 0,97 L/h através de uma bomba peristáltica. Este meio estava incluído em recipientes de plástico, esterilizáveis em autoclave, com uma capacidade de 50 L. O meio foi preparado por diluição dos seus constituintes com água da torneira. Esta alimentação tem por objectivo garantir a diluição da concentração bacteriana assim como constituir uma fonte de nutrientes.

Os biofilmes bacterianos foram desenvolvidos nas placas suspensas no reactor 2 durante 5 dias.

### **3.4.2.3 Aplicação de surfactante**

No estudo da acção antimicrobiana do surfactante em biofilmes de *Pseudomonas fluorescens* foi necessário a aplicação de BAC a esses biofilmes. Sendo assim, depois do biofilme formado, as placas com biofilme foram transferidas para matrizes contendo soluções de diferentes concentrações de BAC. As placas foram mantidas em posição vertical por suspensão no próprio matraz. Em seguida colocou-se os matrizes em agitação a 40 rpm (uma rotação baixa para que não houvesse desprendimento de biofilme) e durante 30 min.

No fim do contacto das diferentes concentrações de BAC com o biofilme formado, as placas foram retiradas, e o biofilme formado nas placas foi raspado para um goblé, sendo seguidamente, lavado de acordo com o descrito no ponto 3.4.1. As suspensões bacterianas resultantes foram reservadas para posterior avaliação da actividade respiratória.

### **3.4.3 Determinação da estabilidade física de biofilmes desenvolvidos por *Pseudomonas fluorescens***

Para se conhecer o modo como os biofilmes de *Pseudomonas fluorescens* reagem fisicamente face a alterações hidrodinâmicas do meio envolvente, foi avaliada a sua estabilidade física intrínseca antes e após aplicação de BAC, de acordo com Simões *et al.* (2003a).

Para tal, promoveu-se o desenvolvimento de biofilmes sobre a superfície de 3 cilindros de aço inox (ASI 316; diâmetro=2,2 cm; comprimento=5 cm) introduzidos num reactor biológico de 3,5 L de capacidade. Este sistema rotativo de formação de biofilme, foi descrito por Azeredo e Oliveira (2000). As condições de operação deste reactor biológico foram

semelhantes às aplicadas no reactor 2 já anteriormente descrito. Ou seja, este reactor foi também inoculado com bactérias provenientes do reactor 1 e continuamente alimentado com uma corrente diluída de nutrientes (ponto 3.4.2.1). Durante o período de formação dos biofilmes (5 dias) os cilindros foram mantidos em constante rotação a uma velocidade de 300 rpm. Depois de 5 dias de formação, os cilindros com o biofilme (Figura 3.4) foram removidos com cuidado do reactor biológico de 3,5 L. Um dos cilindros foi imerso num reactor com tampão fosfato (o cilindro de controlo), os restantes cilindros foram inseridos em reactores contendo diferentes soluções de surfactante de concentração diferente (o volume de cada reactor era de 170 mL). Este tratamento químico foi realizado com os cilindros em rotação a 300 rpm durante 30 min. Seguidamente, os cilindros foram removidos dos reactores, que continham as soluções de surfactante, foram pesados e introduzidos noutros reactores contendo tampão fosfato e submetidos consecutivamente a uma série crescente de velocidades de rotação, *i.e.*, 500, 1000 e 2000 rpm, por um período de 30 segundos cada. Com o aumento da velocidade de rotação dos cilindros alterou-se as forças de tensão de corte na superfície destes, modificando-se, deste modo, as condições hidrodinâmicas do sistema. O peso húmido de cada cilindro com o biofilme aderido foi determinado antes e depois de cada velocidade de rotação. As experiências foram repetidas em três diferentes ocasiões.

Para cada experiência, os cilindros de aço inox foram identificados e pesados antes e depois de serem introduzidos nos vários reactores. O mesmo procedimento foi seguido com o ensaio de controlo, isto é, com o cilindro mais biofilme aderido imerso na solução tampão. A massa húmida de biofilme removida da superfície de cada cilindro, depois de cada velocidade de rotação, foi expressa em percentagem de biofilme removido, de acordo com as equações seguintes:

$$\text{Biofilme removido}_{500 \text{ rpm}} (\%) = (X_{\text{após tratamento}} - X_{500}) / (X_{\text{após tratamento}} - X_c) \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

$$\text{Biofilme removido}_{1000 \text{ rpm}} (\%) = (X_{500} - X_{1000}) / (X_{\text{após tratamento}} - X_c) \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

$$\text{Biofilme removido}_{2000 \text{ rpm}} (\%) = (X_{1500} - X_{2000}) / (X_{\text{após tratamento}} - X_c) \times 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

em que  $X_{\text{após tratamento}}$  representa o peso do biofilme húmido mais cilindro depois da aplicação do BAC durante 30 min,  $X_c$  é o peso húmido do cilindro,  $X_{500}$ ,  $X_{1000}$ ,  $X_{2000}$  é o peso húmido do biofilme mais cilindro após a aplicação das várias velocidades de rotação, respectivamente, 500, 1000 e 2000 rpm.

A estabilidade física dos biofilmes foi avaliada pela determinação da massa perdida devido à exposição dos biofilmes, tratado ou não com BAC, ao aumento da velocidade de rotação no sistema rotativo de formação de biofilme.



Figura 3.4- Fotografia de um dos cilindros de aço inox com biofilme desenvolvido durante 5 dias (Cortesia Manuel Simões)

## 3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

### 3.5.1 Determinação da biomassa

#### 3.5.1.1 Determinação dos sólidos voláteis totais

A massa de biofilme formada nas superfícies das placas de aço inox e silicone foi quantificada pela determinação dos sólidos voláteis totais (SVT) de suspensões homogeneizadas de biofilme, de acordo com o descrito no APHA, AWWA, WPCF Standard Methods (1989). A massa de biofilme acumulada nas superfícies de adesão foi expressa em mg biofilme por cm<sup>2</sup> da área da placa de adesão (mg<sub>biofilme</sub>/cm<sup>2</sup>).

### 3.5.2 Determinação da actividade microbiana

#### 3.5.2.1 Método respirométrico

O ensaio de respirometria permite a medição do consumo de oxigénio, na ausência de uma fonte de carbono, e por adição de um substrato oxidável, podendo este último consumo de oxigénio ser considerado uma medida indirecta de actividade respiratória das células (Stewart *et al*, 1994; McFeters *et al*, 1995).

A actividade respiratória das amostras foi avaliada através da medição das taxas de consumo de oxigénio necessárias para a oxidação da glicose.

A acção antimicrobiana do BAC foi avaliada em termos da redução da taxa de consumo de oxigénio necessário para a oxidação da glicose.

O respirómetro usado neste trabalho experimental foi um respirómetro (BOM - Biological Oxygen Monitor) “Yellow Springs Instruments” (Model 53) e o procedimento seguido foi o descrito segundo Pereira *et al*, 2002. O respirómetro é constituído por dois eléctrodos de oxigénio encaixados num suporte de perspex que se introduz hermeticamente numa câmara de reacção (Figura 3.5). Nestas câmaras de reacção (com um volume útil de 10 a 12 ml) encontrava-se a biomassa em agitação proporcionada por um magnete. O consumo de oxigénio foi continuamente monitorizado e enviado por um sistema de aquisição de dados (adquirido em computador através do programa LABTECH NOTEBOOKpro).



Figura 3.5 - Fotografia do respirómetro

Antes de cada ensaio de respirometria, as amostras foram lavadas 3 vezes com PBS (pH 7) de modo a garantir a ausência de fonte de carbono e a redução significativa da concentração do surfactante, o que minimiza as interferências que o surfactante poderia criar na actividade celular durante o ensaio da respirometria.

Posteriormente foram ressuspendidas em 10 ml de tampão fosfato e colocadas nas células do respirómetro.

As amostras já dentro das células do respirómetro foram arejadas durante 30 minutos de modo a garantir a saturação em oxigénio e o eventual consumo de algum carbono residual. As células do respirómetro foram fechadas com os eléctrodos de oxigénio, tendo-se o cuidado de remover todas as bolhas de ar existentes no interior da célula antes de ser accionada a agitação magnética.. O programa LABTECH NOTEBOOKpro era seleccionado e dava-se início ao ensaio de respirometria com a aquisição dos dados no computador.

Após se obter uma curva considerável, correspondente ao consumo de oxigénio na ausência de glicose, injectava-se um determinado volume de substrato (50  $\mu$ L de uma solução de glucose de concentração 50 g/L) e deixava-se correr o ensaio até se obter uma nova curva representativa (normalmente, de maior declive que a primeira).

Todos os testes respiratórios foram efectuados pelo menos duas vezes.

A taxa específica de consumo de oxigénio pode ser determinada na presença ou ausência de fontes de carbono e energia externas aos microrganismos. No caso de não estarem presentes fontes de carbono ou de energia externas, o consumo de oxigénio é devido ao metabolismo endógeno designando-se esta taxa de respiração por taxa de respiração endógena. Na presença de fontes de carbono e energia, o consumo de oxigénio é devido às reacções de oxidação, designando-se a taxa de respiração por taxa de respiração total. Um

respirómetro de funcionamento descontínuo permite obter a evolução da concentração em oxigénio dissolvido ao longo do tempo. Este registo é denominado de respirograma.

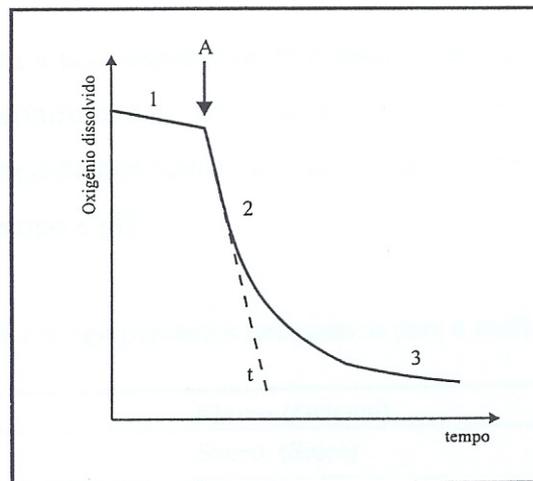


Figura 3.6 – Exemplo de um respirograma tipo: 1 e 3 – respiração endógena; 2 – respiração total; A – injeção de substrato; t – tangente no ponto de injeção de substrato

A interpretação de um respirograma envolve o cálculo da taxa de respiração endógena (fases 1 e 3) e da taxa de respiração total (fase 2). A taxa de respiração endógena é calculada a partir do declive da recta obtida na fase 1 e a taxa de respiração total é calculada a partir da tangente no momento da injeção de substrato. A taxa de respiração devido à adição de uma determinada concentração de substrato é igual à diferença entre a taxa de respiração total e a taxa de respiração endógena. Esta diferença, após determinação da quantidade de biomassa, foi designada de actividade respiratória específica. É representada, abreviadamente, pela sigla AR (Actividade respiratória específica) e vem expressa em  $\text{mg O}_2/\text{g}_{\text{bactérias}} \cdot \text{min}$  para ensaios em suspensão e em  $\text{mg O}_2/\text{g}_{\text{biofilme}} \cdot \text{min}$  para os ensaios com biofilme.

Para determinar a actividade respiratória específica, é necessário, então, conhecer a biomassa (matéria volátil) presente na câmara de reacção do respirómetro. Para tal, no fim do ensaio retirou-se o conteúdo das câmaras de reacção e colocou-se num cadinho (registando-se o volume utilizado), que, por sua vez, foi colocado numa estufa durante cerca de 24 h sendo, posteriormente, submetido a uma temperatura de 550 °C (numa mufla) para determinação do material volátil (tem de se ter o cuidado de registar o volume da amostra).

### **Avaliação da redução da actividade**

O efeito do BAC na actividade respiratória das *Pseudomonas fluorescens*, foi avaliada quantitativamente em termos da redução da actividade respiratória, tendo por referência a

actividade respiratória nos ensaios realizados na ausência de BAC (teste de controlo). Os resultados foram determinados com base na seguinte equação:

$$\% \text{ de redução} = ((AR_{\text{Controlo}} - AR_{\text{BAC}}) / AR_{\text{Controlo}}) \times 100 \quad (\text{Eq. 4})$$

Em que  $AR_{\text{Controlo}}$  é a actividade respiratória do teste de controlo, sem tratamento com BAC, e  $AR_{\text{BAC}}$  é a actividade respiratória após a aplicação de cada concentração de BAC.

O mesmo procedimento foi usado quando a BSA foi adicionada às culturas bacterianas em suspensão. Neste caso, as culturas bacterianas do ensaio de controlo também incluíam 3 g/L da referida proteína.

### 3.5.3 Método para a determinação de ATP

Os organismos possuem ATP como fonte de energia e quando ocorre perturbações ao nível celular, como a ocorrência de ruptura das membranas, há libertação de ATP para o meio extracelular. Este fenómeno é, normalmente, denominado de lise celular. Neste trabalho doseou-se o ATP libertado para o meio de cultura com o objectivo de se avaliar se ocorria lise celular pela adição de diferentes concentrações de BAC às culturas de *Pseudomonas fluorescens*.

O ATP libertado foi determinado com recurso a um aparelho denominado de bioluminómetro em que os valores de ATP são medidos em RLUs (RLU - Relative Light Units).

O ATP libertado das células foi medido com um sistema de luciferina-luciferase/sigma FL-AAM. Após o tempo de contacto com o BAC, a 100 µl de amostra da suspensão celular foi adicionado 100 µl de uma mistura de luciferina e luciferase diluída 25×. A transmissão da luz foi medida num bioluminómetro (Lumac, Biocounter M 25000). Os ensaios de controlo foram realizados com tampão fosfato e com diferentes concentrações de BAC para avaliar a interferência do surfactante com o método.

O efeito do BAC nas bactérias, avaliado em termos de conteúdo relativo de ATP libertado, foi calculado usando a seguinte equação:

$$\text{Conteúdo relativo de ATP} = (RLU_1 / RLU_0) \quad (\text{Eq. 5})$$

onde  $RLU_0$  é o RLU do ensaio de controlo (bactérias sem adição de BAC) e  $RLU_1$  é o RLU da amostra em teste.

### 3.5.4 Caracterização bioquímica de biofilmes

A caracterização bioquímica de biofilmes envolveu a quantificação do teor de proteínas e polissacarídeos totais (extra e intracelulares) constituintes do biofilme. Para tal, procedeu-se numa primeira fase à separação da matriz polimérica do biofilme recorrendo ao método de extracção com resina Dowex. Posteriormente, quantificou-se as proteínas através do método de Lowry *et al.*, utilizando um Kit Sigma P5656. Para a quantificação dos polissacarídeos utilizou-se o método de Dubois.

#### 3.5.4.1 Método de extracção com Resina Dowex

O protocolo utilizado para a extracção da matriz polimérica com resina Dowex (50× 8, Na<sup>+</sup> form, 20-50 mesh, Aldrich-Fluka 44445) foi desenvolvido e otimizado para biofilmes de *Pseudomonas putida* por Jahn e Nielson (1995). A resina Dowex tem vindo a ser utilizada com sucesso para a extracção da matriz polimérica (Azeredo, 1998), usando o tampão de extracção (0,328 g/L Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; 0,48 g/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,527 g/L NaCl; 0,0746 g/L KCl a pH 7).

Começou-se por se raspar o biofilme das placas de adesão procedendo-se. Posteriormente, à sua lavagem por centrifugação com tampão fosfato pH 7. O pellet obtido foi ressuscitado em 50 mL de tampão de extracção, tendo-se de seguida adicionado 50 g de resina Dowex por grama de sólidos voláteis de biofilme. O teor em sólidos voláteis do biofilme foi previamente determinado de acordo com APHA, AWWA, WPCF Standard Methods (1989). A suspensão obtida foi agitada a 600 rpm durante 4 horas e à temperatura de 4 °C. Após este tempo a resina foi separada da mistura e esta foi centrifugada a 3777 g durante 5 min. O sobrenadante obtido correspondia à matriz enquanto que o pellet correspondia às células. Posteriormente, cada uma das fracções obtidas (sobrenadante e pellet) foi analisada quanto ao teor de proteínas e de polissacarídeos.

#### 3.5.4.2 Proteína Total

A quantificação da proteína total foi efectuada pelo método modificado de Lowry *et al* (1951) utilizando o kit Sigma P5656. O reagente de Folin & Ciocalteu, cujo constituinte activo é o ácido misto fosfomolibdotúngstico, está na base deste método. Este ácido, na

presença de proteína, é reduzido por perda de 1 a 3 átomos de oxigénio. Obtêm-se assim várias espécies reduzidas possuindo uma cor azul característica (absorção máxima a 745 nm). A fixação do cobre por quelação facilita a transferência de electrões para o ácido misto.

O procedimento experimental consistiu em adicionar a 1 mL de amostra, 1 mL de reagente de Lowry e homogeneizou-se no vórtex durante 30 segundos. Após 20 min de reacção, à temperatura ambiente, voltou-se a homogeneizar e adicionou-se simultaneamente 0,5 mL de reagente de Folin & Ciocalteu's . Deixou-se reagir à temperatura ambiente e ao abrigo da luz durante 30 min, findo o qual se leu a absorvância a 740 nm. O branco obteve-se pela substituição da amostra por solução tampão (a mesma na preparação das culturas bacterianas), seguindo-se o mesmo procedimento utilizado na amostra.

Antes das determinações e sempre que se mudava de reagente, procedia-se à calibração do espectrofotómetro através da análise de soluções padrão de albumina soro de bovino (0 mg/L a 400 mg/L).

### **3.5.4.3 Conteúdo em polissacarídeos**

Os polissacarídeos são vulgarmente determinados por métodos colorimétricos, que envolvem o aquecimento da amostra com ácido sulfúrico concentrado e a adição de um reagente, por exemplo, o fenol. Este é o método mais utilizado porque permite obter resultados com precisão. O mecanismo de acção deste método, envolve a hidrólise dos polissacarídeos em monossacarídeos que reagem com o reagente, desenvolvendo uma cor característica. Este método requer um padrão que normalmente é a glicose uma vez que apresenta uma grande semelhança com os monómeros que compõem os polissacarídeos permitindo assim estimar a quantidade de polissacarídeos nas amostras (Azeredo, 1998).

A determinação do conteúdo em polissacarídeos foi realizada pelo método de Dubois *et al.* (1956). O procedimento experimental consistiu em adicionar a 1 mL de amostra, 1 mL de solução de fenol (50 g/L, preparado com água ultra pura filtrada) e, de forma rápida, 5 mL de ácido sulfúrico concentrado (97 %). Agitou-se no vórtex e, após arrefecimento à temperatura ambiente, leu-se a absorvância a 490 nm. O branco obteve-se pela substituição da amostra por solução tampão (a mesma utilizada na preparação das culturas bacterianas) seguindo-se o mesmo procedimento utilizado na amostra (Pereira, 2001).

A calibração do espectrofotómetro foi realizada recorrendo a soluções padrão de glicose (entre 0 mg/L e 80 mg/L).

### 3.5.5 Influência do BAC nas propriedades superficiais de placas de aço e silicone

Quando se pretende estudar os mecanismos de adesão de microrganismos a suportes é necessário o conhecimento das propriedades superficiais tanto do suporte como da superfície das células.

Neste ponto descreve-se a técnica utilizada para a determinação das propriedades superficiais que estão na base da adesão de microrganismos, nomeadamente a tensão superficial e a hidrofobicidade. Estes parâmetros foram determinados a partir dos valores dos ângulos de contacto obtidos sob superfícies de aço inox e silicone condicionadas ou não com surfactante.

Existem vários métodos para a determinação das tensões superficiais de sólidos. As técnicas mais utilizadas baseiam-se na medição dos ângulos de contacto.

Este método consistiu em determinar o ângulo formado por uma gota de um líquido sobre uma superfície sólida. Este método deve ser utilizado sobre superfícies homogêneas, planas, lisas e secas o que torna a sua aplicação a microrganismos bastante difíceis (Johnson *et al.*, 1977).

#### 3.5.5.1 Determinação da tensão superficial

São vários os métodos utilizados para determinar as tensões superficiais dos sólidos. A técnica mais usada e mais vulgarmente aceite é a medição de ângulos de contacto.

Para determinar as componentes apolar  $\gamma_s^{LW}$  (componente apolar devida às interações de Lifshitz-van der Waals- LW) e polar  $\gamma_s^{AB}$  (componente polar devida às interações de ácido-base de Lewis) de um material  $s$ , mediram-se os ângulos de contacto ( $\theta$ ) na superfície desse material formado por três líquidos distintos, cujas componentes apolares ( $\gamma^{LW}$ ) e polares ( $\gamma^{AB}$ ,  $\gamma^-$ ,  $\gamma^+$ ) eram conhecidas.

O ângulo de contacto ( $\theta$ ) formado por uma gota de líquido sobre uma superfície sólida está directamente relacionado com a molhabilidade da superfície por esse líquido.

Existem vários métodos para a medição do ângulo de contacto sólido/líquido, no entanto, de acordo com Busscher (1984), o método mais fácil de utilizar é o da gota séssil.

Segundo van Oss *et al.* (1988) a tensão superficial é determinada pelo somatório entre a componente apolar e polar da respectiva superfície. A equação de Young-Good-Girifalco-Fowkes (Eq. 7) relaciona os ângulos de contacto ( $\theta$ ) formado por uma gota de água ( $\theta_w$ ),

formamida ( $\theta_F$ ) e  $\alpha$ -bromonaftaleno ( $\theta_B$ ) (Tabela 3.5) sobre uma determinada superfície com as respectivas componentes das tensões superficiais do líquido ( $\gamma_l^{LW}$ ,  $\gamma_l^{AB}$ ,  $\gamma_l^-$ ,  $\gamma_l^+$ ) e do sólido ( $\gamma_s^{LW}$ ,  $\gamma_s^{AB}$ ,  $\gamma_s^-$ ,  $\gamma_s^+$ ).

Os líquidos usados para a determinação das tensões superficiais do aço inox e do silicone foram:  $\alpha$ -bromonaftaleno (líquido apolar), formamida e água (líquidos polares), cujas componentes da tensão superficial encontram-se na Tabela 3.5.

É de referir que os líquidos utilizados foram escolhidos porque cumprem o requisito necessário a qualquer líquido destinado a ser usado na medição dos ângulos de contacto, que é ter a tensão superficial superior à tensão superficial do sólido. Caso contrário, o líquido espalhar-se-ia no sólido e não seria possível a medição dos ângulos.

Tabela 3.5 - Componentes da tensão superficial da água, formamida e  $\alpha$ -bromonaftaleno a 20 °C

Tensão superficial (mJ/m <sup>2</sup> )				
Líquido	$\gamma_l^{tot}$	$\gamma_l^{LW}$	$\gamma_l^+$	$\gamma_l^-$
Água	72,8	21,8	25,5	25,5
Formamida	58,0	39,0	2,28	39,6
$\alpha$ -bromonaftaleno	44,4	44,4	0,0	0,0

Então a equação de Young-Good-Girifalco-Fowkes será:

$$(1 + \cos\theta) \gamma_l = 2 \left( \sqrt{\gamma_s^{LW} \gamma_l^{LW}} + \sqrt{\gamma_s^+ \gamma_l^-} + \sqrt{\gamma_s^- \gamma_l^+} \right) \quad (\text{Eq. 7})$$

em que  $s$  e  $l$  significam sólido e líquido, respectivamente.

Com os valores dos ângulos de contacto obtidos com a água ( $\theta_w$ ), formamida ( $\theta_F$ ) e  $\alpha$ -bromonaftaleno ( $\theta_B$ ), aplicando a Equação 7 e, com auxílio dos valores da Tabela 3.5 obtém-se o seguinte sistema de equações:

$$\begin{aligned} \gamma_s^{LW} &= 11,1(1 + \cos \theta_B)^2 \\ 5,049\sqrt{\gamma_s^+} + 5,049\sqrt{\gamma_s^-} &= 36,4(1 + \cos \theta_w) - 15,55(1 + \cos \theta_B) \\ 6,293\sqrt{\gamma_s^+} + 1,510\sqrt{\gamma_s^-} &= 29(1 + \cos \theta_F) - 20,806(1 + \cos \theta_B) \end{aligned} \quad (\text{Sistema 1})$$

Trata-se de um sistema de 3 equações com 3 incógnitas, de fácil resolução, que permite obter os valores de  $\gamma_s^{LW}$ ,  $\gamma_s^+$ ,  $\gamma_s^-$ .

A tensão superficial,  $\gamma_s^{tot}$ , de acordo com van Oss *et al.*(1988) resulta da soma de duas componentes ( $\gamma_s^{LW}$  e  $\gamma_s^{AB}$ ), ou seja:

$$\gamma_s^{tot} = \gamma_s^{LW} + \gamma_s^{AB} \quad (\text{Eq. 8})$$

$\gamma_s^{LW}$  é a componente apolar (interacção de Lifshitz-van der Waals), cujo valor resulta da resolução do sistema 1;  $\gamma_s^{AB}$  é a componente polar (interacção de ácido base de Lewis) e é determinada por:

$$\gamma_s^{AB} = 2\sqrt{\gamma_s^+ \gamma_s^-} \quad (\text{Eq. 9})$$

em que  $\gamma_s^+$  representa o parâmetro da tensão superficial devida à capacidade da substância aceitar electrões e  $\gamma_s^-$  corresponde à tensão superficial devida à capacidade de ceder electrões.

O medidor de ângulos de contacto utilizado foi o OCA 15 PLUS, DATAPHYSICS. O método aplicado para a leitura dos ângulos de contacto foi o método da gota séssil (Busscher, 1984), à temperatura ambiente (aproximadamente 20-22 °C).

As medições dos ângulos de contacto formados foram realizadas com recurso a um sistema de análise de imagem (G2/G40) instalado no aparelho. Neste sistema, as imagens foram transmitidas através de uma câmara de vídeo para um computador onde foram processadas. As placas de aço inox e silicone foram sujeitas a uma lavagem inicial com detergente comercial, e lavadas, posteriormente, várias vezes com água destilada e colocadas a secar numa estufa a 40°C. Para a medição dos ângulos de contacto das placas condicionadas, estas foram também, inicialmente, limpas com detergente comercial, lavadas abundantemente com água destilada e condicionadas de acordo com o método referido no ponto 3.3.2, antes de serem secas na estufa. Após secagem, as placas foram colocadas sobre o suporte do medidor de ângulos de contacto e com auxílio de uma seringa foi deixada cair uma gota de 2  $\mu\text{L}$  de cada um dos líquidos na superfície do material a testar. É de referir que, para cada

material de suporte, foram feitas três réplicas por líquido de medição, tendo-se efectuado entre 20 a 30 medições.

### 3.5.5.2 *Determinação da hidrofobicidade de materiais sólidos*

A hidrofobicidade é um parâmetro fundamental na interpretação do fenómeno da adesão de microrganismos a superfícies em ambientes aquáticos. Pretendeu-se, com base na determinação deste parâmetro, prever o carácter hidrofóbico e hidrofílico das superfícies de adesão em estudo.

Para a determinação da hidrofobicidade de materiais, a maioria dos métodos existentes não permite a determinação de um valor quantitativo de hidrofobicidade e simplesmente comparam se as superfícies ou microrganismos são mais ou menos hidrofóbicas.

Existem diversas técnicas que permitem avaliar o carácter hidrofóbico ou hidrofílico das superfícies. O método universalmente usado para determinar a hidrofobicidade de materiais é a medição de ângulos de contacto. A medição dos ângulos de contacto, formado por um líquido sobre uma superfície sólida, permite avaliar a molhabilidade dessa superfície. Se esse líquido é a água, o ângulo de contacto está directamente relacionado com a hidrofobicidade da superfície.

Segundo Valcarce *et al.* (2002), quando os ângulos de contacto formados pela água ( $\theta_w$ ) sobre uma superfície são superiores a  $65^\circ$ , a superfície é hidrofóbica enquanto que se derem valores inferiores, a superfície é considerada hidrofílica. Já para van Oss e Giese (1995), quando os ângulos de contacto formados pela água ( $\theta_w$ ) sobre uma superfície são inferiores a  $50^\circ$ , a superfície é hidrofílica, para valores superiores, trata-se de uma superfície hidrofóbica. Segundo estes últimos autores, o cálculo da hidrofobicidade permite quantificar a hidrofobicidade de uma superfície através das componentes das tensões superficiais do sólido e da água.

De acordo com este critério, a hidrofobicidade é definida em termos de energia livre de interacção entre as moléculas de uma superfície (s) imersa em água (w), ( $\Delta G_{sws}^{tot}$ ). Quando a energia livre global de interacção entre as moléculas de um sólido (s) imersa em água é atractiva ( $\Delta G_{sws}^{tot}$  é negativo), significa que as moléculas do sólido têm menor afinidade para a água do que entre si. Uma superfície hidrofóbica apresenta valores de  $\Delta G_{sws}^{tot}$  negativos. Quando a energia livre global de interacção entre as moléculas de um sólido (s) imerso em água é suficientemente repulsiva ( $\Delta G_{sws}^{tot}$  é positivo), a superfície do sólido é considerada

hidrofílica. Quanto maior for o valor absoluto de  $\Delta G_{sws}^{tot}$  mais hidrofóbica (valores negativos) ou mais hidrofílica (valores positivos) é a superfície (van Oss e Giese, 1995).

A energia livre global de interacção,  $\Delta G_{sws}^{tot}$ , entre as moléculas da superfície (s) imersa em água (w) é calculada pelo somatório das componentes apolar ( $\Delta G_{sws}^{LW}$  - que corresponde às interacções electrodinâmicas ou interacções de Lifshitz-van der Waals) e polar ( $\Delta G_{sws}^{AB}$  - que corresponde às interacções ácido-base de Lewis) da energia livre de interacção.

$$\Delta G_{sws}^{tot} = \Delta G_{sws}^{LW} + \Delta G_{sws}^{AB} \quad (\text{Eq. 10})$$

Sendo  $\Delta G_{sws}^{LW}$  e  $\Delta G_{sws}^{AB}$ , as componentes apolar e polar respectivamente, de energia livre de interacção, entre a superfície (s) e a água (w).

A componente apolar é determinada por:

$$\Delta G_{sws}^{LW} = -2 \left( \sqrt{\gamma_s^{LW}} - \sqrt{\gamma_w^{LW}} \right)^2 \quad (\text{Eq. 11})$$

O  $\gamma_s^{LW}$  representa a componente apolar da tensão superficial da superfície e  $\gamma_w^{LW}$  a da água.

A componente polar calcula-se do seguinte modo:

$$\Delta G_{sws}^{AB} = -4 \left[ \sqrt{\gamma_s^+ \gamma_w^-} + \sqrt{\gamma_s^- \gamma_w^+} - \sqrt{\gamma_s^+ \gamma_s^-} - \sqrt{\gamma_s^- \gamma_s^+} \right] \quad (\text{Eq. 12})$$

Sendo  $\gamma_s^+ \gamma_s^-$  e  $\gamma_w^+ \gamma_w^-$  os parâmetros dador (+) e aceitador (-) das componentes polares da tensão superficial para a superfície (s) e para a água (w) respectivamente.

O valor das componentes apolar e polar da tensão superficial da água encontram-se tabelados à temperatura ambiente e são os seguintes:

$\gamma_w^{LW} = 21,8 \text{ mJ/m}^2$  e  $\gamma_w^{AB} = 51,2 \text{ mJ/m}^2$  (em que  $\gamma_w^+ = \gamma_w^- = 25,5 \text{ mJ/m}^2$ ), determinados à temperatura ambiente (van Oss *et al.*, 1988).

### 3.5.5.3 Aspectos termodinâmicos gerais da adesão inicial ou energia livre interfacial de adesão

Para ocorrer o contacto entre uma célula microbiana e uma superfície numa solução aquosa, é necessário que o filme líquido que reveste estas duas superfícies seja removido. Assim, a interface bactéria/líquido e a interface superfície de adesão/líquido são substituídas por uma nova interface, isto é, célula microbiana/superfície de adesão.

Segundo Absolom *et al* (1983), a interacção entre a célula microbiana e a superfície sólida só é possível, de um ponto de vista termodinâmico, quando conduz a uma redução da energia livre interfacial do sistema ( $\Delta G < 0$ ).

A energia livre de interacção entre duas superfícies, 1 (célula microbiana) e 2 (material de suporte) imersa num líquido 3 é dada pela equação de Dupré (van Oss, 1991).

$$\Delta G_{132} = \gamma_{12} - \gamma_{13} - \gamma_{23} \quad (\text{Eq. 13})$$

em que  $\gamma_{12}$  é a tensão interfacial entre as superfícies 1 e 2,  $\gamma_{13}$  é a tensão interfacial entre as superfícies 1 e 3 e  $\gamma_{23}$  é a tensão interfacial entre as superfícies 2 e 3.

Actualmente, a maioria dos autores aceita a teoria de van Oss *et al.* (1988), segundo a qual a tensão superficial corresponde ao somatório da componente apolar das interacções de Lifshitz-van der Waals (LW) e a componente polar devida às interacções do tipo aceitador/dador de electrões, também designada por interacções de ácido-base de Lewis.

Sendo assim, para uma substância (índice “i”), a tensão superficial total é dada pela seguinte expressão:

$$\gamma_i^{tot} = \gamma_i^{LW} + \gamma_i^{AB} \quad (\text{Eq. 14})$$

Já que as componentes apolar (LW) e polar (AB) das tensões superficiais são aditivas, a equação de Dupré pode ser reformulada de modo a obter a energia livre interfacial de adesão ( $\Delta G_{132}^{ad}$ ).

$$\Delta G_{132}^{ad} = \Delta G_{132}^{LW} + \Delta G_{132}^{AB} \quad (\text{Eq. 15})$$

Como já referido, para ocorrer adesão terá de haver uma diminuição da energia livre global ( $\Delta G_{132}^{ad} < 0$ ). No entanto, segundo vários estudos realizados, nem sempre este critério é verificado, apesar de ocorrer adesão, ou seja, constatou-se que ocorria adesão apesar de  $\Delta G_{132}^{ad} > 0$ .

Portanto, este critério termodinâmico não pode ser generalizado, no entanto, poderá ajudar a interpretar uma tendência de adesão de uma estirpe a diferentes suportes.

### 3.5.6 Microscopia electrónica de varrimento

A microscopia electrónica de varrimento (SEM) permite a observação com grande pormenor da estrutura superficial do biofilme (Pereira, 2001). A grande desvantagem desta técnica reside nos métodos de preparação das amostras, que, na maior parte dos casos, não permitem a observação tal qual das mesmas. Por outro lado, o seu poder de resolução nem sempre é suficiente, nomeadamente quando se pretende observar estruturas extracelulares que possam estar envolvidas na adesão (Azeredo, 1998).

Antes de se proceder à observação por SEM, o biofilme formado nas superfícies de adesão (placas de aço inox e silicone) foi desidratado através da sua imersão em soluções de etanol absoluto de concentração crescente até 100 % (10 %, 25 %, 40 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 %), permanecendo cerca de 15 min em cada solução. Seguidamente, as placas com biofilme foram transferidas para um excicador para secagem completa (2 a 3 dias aproximadamente). Após esta etapa, as amostras foram examinadas num microscópio electrónico de varrimento entre 10 KV e 15 KV. As observações foram documentadas através da aquisição de registos fotográficos.

A técnica de microscopia electrónica de varrimento foi utilizada neste trabalho para averiguar possíveis modificações da estrutura superficial dos biofilmes de *Pseudomonas fluorescens* (Figura 3.7) na adesão às placas de aço e silicone previamente tratadas ou não com surfactante.

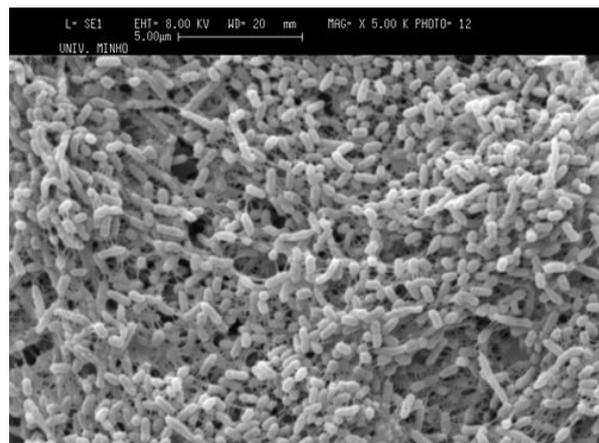


Figura 3.7- Fotografia da bactéria *Pseudomonas fluorescens* obtidas por microscopia electrónica de varrimento

## 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

### 3.6.1 Distribuição $t$ 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 entre os resultados dos parâmetros de estudo (Influência do [BAC] e [BSA] na actividade respiratória da *Pseudomonas fluorescens*) com os verificados nos ensaios de controlo, podiam ser considerados estatisticamente significativos. Para tal, recorreu-se à distribuição  $t$  de Student para comparação das médias obtidas em conjuntos de determinações. Os resultados experimentais que apresentam as diferenças entre os pares de valores com níveis de confiança superiores a 95 %, foram considerados como estatisticamente significativos.

Sempre que a análise dos resultados experimentais considerou que os valores eram significativamente diferentes ou iguais, entre si ou em relação a um valor de referência, recorreu-se a análise estatística de rejeição de dados experimentais (Belo, 1995). Esta análise estatística foi baseada na distribuição de  $t$  de Student, em que para  $n$  resultados experimentais em que um dos quais difere apreciavelmente dos restantes, esse valor discrepante ( $x$ ) pode ser rejeitado, com níveis de confiança de 95 % e para  $(n - 1)$  graus de liberdade, se:

$$|(x - \mu) / S_x| > t_{0,95} \quad (\text{Eq. 16})$$

Considerando que  $S_x$  é o desvio padrão e  $\mu$  a média dos resultados não discrepantes.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

Neste capítulo são apresentados os resultados da aplicação do surfactante cloreto de benzalcónio (BAC) a suspensões bacterianas e a biofilmes formados sobre superfícies de aço inox e de silicone, assim como a aplicação de BSA a suspensões bacterianas de *P. fluorescens*.

Os resultados estão subdivididos em 4 secções principais. Na primeira secção, são apresentados os resultados decorrentes da acção do BAC na actividade respiratória das células *Pseudomonas fluorescens* desenvolvidas em suspensão. Na segunda secção, estão reunidos os resultados da acção do efeito da proteína BSA na actividade respiratória das células *Pseudomonas fluorescens* em suspensão bem como na eficiência da acção antimicrobiana do BAC sobre essas culturas bacterianas. Os resultados da acção do BAC na actividade respiratória das células *Pseudomonas fluorescens* desenvolvidas em biofilmes sobre placas de aço inox e silicone apresentam-se na terceira secção. Na quarta secção, apresentam-se os resultados da influência do BAC nas propriedades superficiais do aço e silicone, nomeadamente tensão superficial, hidrofobicidade e energia livre de adesão. Nesta secção, são também apresentados os resultados dos ensaios da estabilidade física dos biofilmes após tratamento com cloreto de benzalcónio, assim como, a caracterização bioquímica dos biofilmes.

---

## 4.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO BAC EM CULTURAS DE *Pseudomonas fluorescens* EM SUSPENSÃO

A eficiência de um produto antimicrobiano depende de vários factores, dos quais a concentração de produto usada e o tempo de contacto do produto com as bactérias, serão os factores que exigem ensaios experimentais mais exaustivos, de forma a encontrar-se a dose de surfactante e o tempo de exposição adequados. Sendo assim, no presente trabalho, realizaram-se ensaios experimentais de investigação da acção antimicrobiana do BAC em culturas suspensas de *P. fluorescens*, testando-se várias concentrações do surfactante e vários tempos de contacto.

Na fase inicial do trabalho experimental, constatou-se que as bactérias *P. fluorescens* nem sempre apresentavam o mesmo comportamento, nomeadamente, no valor da sua actividade respiratória inicial, mesmo quando crescidas nas mesmas condições operatórias. Consequentemente, a resposta das bactérias face às variações em estudo podia vir afectada dessa diferença inicial. Esta constatação esteve na base da decisão de se realizar ensaios de controlo em todas as experiências realizadas. Esses ensaios de controlo consistiam em avaliar a actividade respiratória das bactérias das culturas em suspensão na ausência de BAC e na ausência da BSA.

### 4.1.1 Efeito do tempo de contacto na acção antimicrobiana do BAC

Antes da determinação do efeito do tempo de contacto na eficácia antimicrobiana do BAC, procurou-se conhecer se a actividade respiratória das *P. fluorescens* variava ao longo do tempo especificado para os ensaios. Para tal, numa fase inicial, realizaram-se ensaios de avaliação da actividade respiratória de culturas em suspensão de *Pseudomonas fluorescens* ao longo do tempo (5 min, 15 min, 30 min, 45 min e 60 min). A actividade respiratória das bactérias foi quantificada através da determinação da taxa de consumo de oxigénio necessário para degradar glicose (ponto 3.5.2). A Figura 4.1 evidencia que a actividade respiratória das *Pseudomonas fluorescens* mantém-se praticamente constante ao longo do tempo testado. As variações observadas não apresentam significado estatístico ( $P > 0,05$ ). Este resultado era esperado pois o período testado (1 h) não representa um tempo suficiente grande para que as bactérias percam a actividade (a capacidade de oxidar a glucose, mesmo quando mantidas na

ausência de fontes externas de carbono. Pereira *et al.* (2002) verificaram, até, que as culturas em suspensão de *P. fluorescens* mantidas em tampão fosfato preservavam a sua actividade respiratória por períodos de 7 h.

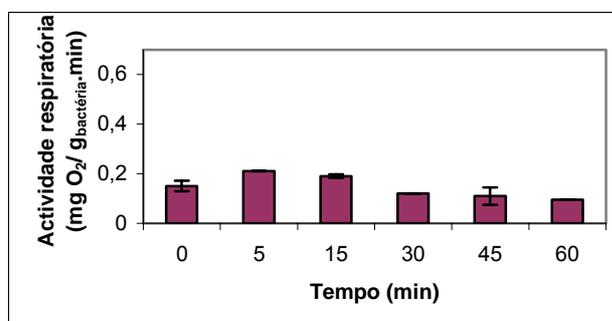


Figura 4.1- Actividade respiratória das culturas em suspensão da bactéria *Pseudomonas fluorescens*, ao longo do tempo.

O efeito do tempo de contacto do BAC com as suspensões bacterianas na sua respectiva acção antimicrobiana, quando aplicado numa concentração de 0,0625 mM, pode ser observado na Figura 4.2. Neste gráfico, o valor da actividade respiratória correspondente ao tempo “0” (zero) é somente da suspensão bacteriana determinado imediatamente antes da adição do BAC (teste de controlo).

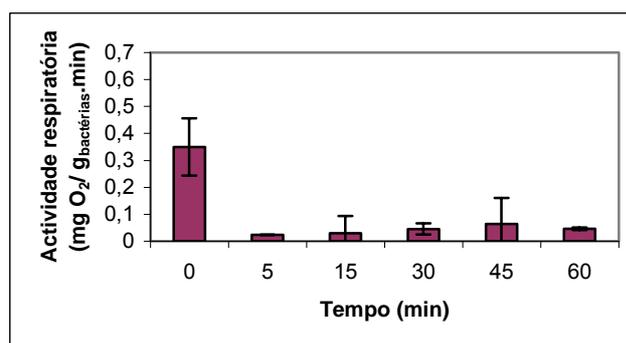


Figura 4.2 - Efeito do tempo de contacto na acção do cloreto de benzalcónio sobre a actividade respiratória das bactérias, quando aplicado numa concentração de 0,0625 mM. O tempo “0” refere-se ao teste de controlo, isto é, sem adição de BAC.

Esta figura permite constatar que a aplicação de 0,0625 mM de BAC provoca uma redução drástica da actividade respiratória das *P. fluorescens*, não se tendo, no entanto, verificado anulação total da actividade bacteriana.

Para uma avaliação mais quantitativa da eficácia deste surfactante, a redução da actividade bacteriana, para cada tempo de contacto com o BAC, foi expressa em percentagem (Tabela 4.1), tomando-se como referência o valor da actividade respiratória obtida no teste de controlo, isto é, no teste realizado na ausência de BAC (tempo “0” no gráfico da Figura 4.2), de acordo com a equação 4 (ponto 3.5.2).

Tabela 4.1 - Percentagem de redução da actividade respiratória da bactéria *Pseudomonas fluorescens* resultante da aplicação de 0,0625 mM de BAC, ao longo do tempo.

Redução da actividade respiratória (%)					
Tempo (min.)	5	15	30	45	60
	93,1	91,4	87	81,7	86,7

A análise conjunta da Figura 4.2 e da Tabela 4.1 permite constatar que a aplicação de 0,0625 mM de BAC reduz substancialmente a actividade respiratória das *Pseudomonas fluorescens*. Esta redução parece ser mais significativa (>90% de redução) para os menores tempos de contacto do BAC com as bactérias. Constata-se ainda, que à medida que o tempo passa, a percentagem de redução da actividade mantém-se mais ou menos constante ( $P > 0,05$ ). Portanto, pode concluir-se que a acção do BAC na actividade respiratória desta bactéria é imediata e praticamente independente do tempo de contacto. A actividade antimicrobiana do surfactante é uma consequência directa das suas propriedades químicas (capacidade de redução da tensão superficial, formação de agregados iónicos, etc.). Consequentemente, os surfactantes podem degradar ou solubilizar as membranas das células, conduzindo a perdas do potencial de membrana, alteração da permeabilidade celular e perda de constituintes celulares e iões (Ishikawa *et al.*, 2002; Sakagami *et al.*, 1989; Tabata *et al.*, 2003; Tattawasart *et al.*, 2000). Em resultado destas alterações, pode ocorrer a inibição metabólica das células, ou perturbação do seu crescimento e lise celular (Kanazawa *et al.*, 1995). Em relação ao BAC, não é ainda muito claro qual o seu modo de actuação nas bactérias, especialmente nas deste estudo (*P. fluorescens*). No entanto, esse seu modo de acção manifesta-se rapidamente, isto é, nos primeiros 10 minutos de contacto deste com as bactérias.

É de salientar, contudo, que para todos os tempos de contacto estudados, não se conseguiu a inactivação total da actividade respiratória (redução completa). Esta constatação evidencia que a conjugação da aplicação de 0,0625 mM de BAC com qualquer um dos tempos de contacto da gama estudada não será a melhor combinação de aplicação do BAC quando se pretende inactivar totalmente a bactéria *P. fluorescens*.

#### 4.1.2 Efeito da concentração de BAC na actividade respiratória das bactérias

O efeito antimicrobiano de várias concentrações de BAC em suspensões bacterianas de *Pseudomonas fluorescens* foi determinado pela avaliação da actividade respiratória específica das bactérias após o contacto com diferentes concentrações de BAC (Figura 4.3). A influência do BAC na actividade respiratória das bactérias *Pseudomonas fluorescens* foi avaliada após 30 minutos de contacto entre o surfactante e a cultura bacteriana (tal como descrito no ponto 3.4.1). A redução da actividade bacteriana, em termos de percentagem em relação ao teste de controlo (actividade respiratória da suspensão bacteriana correspondente ao tempo “0” determinada imediatamente antes da adição do BAC), foi também calculada e é apresentada na Tabela 4.2.

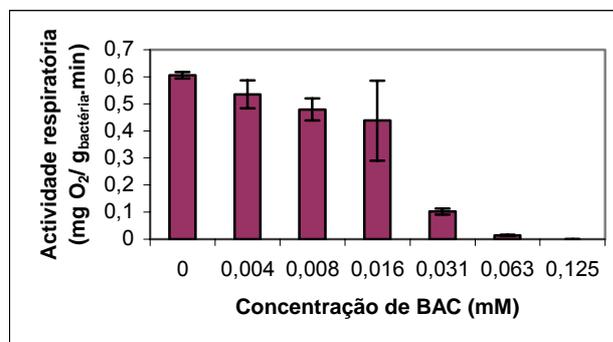


Figura 4.3 - Efeito da concentração de BAC na actividade respiratória da bactéria *Pseudomonas fluorescens*, após um tempo de contacto de 30 minutos. O “0” refere-se ao teste de controlo, isto é, sem adição de BAC.

Tabela 4.2 - Percentagem de redução da actividade respiratória da bactéria *Pseudomonas fluorescens* obtida com a aplicação de BAC, durante 30 minutos.

Redução da actividade respiratória (%)						
BAC (mM)	0,00391	0,00781	0,0156	0,0313	0,0625	0,125
	12,0	21,0	28,0	83,0	98,0	100,0

A partir da observação da Figura 4.3 constata-se que, à medida que se aumenta a concentração de BAC aplicada às culturas bacterianas, há uma diminuição da actividade respiratória da *Pseudomonas fluorescens*. No entanto, essa diminuição é pouco significativa para concentrações de BAC inferiores ou iguais a 0,0156 mM, e bastante mais acentuada para concentrações superiores. A Figura mostra, ainda, que a actividade respiratória da bactéria só é anulada para concentrações de BAC superiores a 0,0625 mM. Os valores da Tabela 4.2 reforçam isso mesmo, pois à medida que se aumenta a concentração de BAC aplicada às

suspensões bacterianas, aumenta a percentagem de redução da actividade respiratória das bactérias. A redução da actividade é, de facto, mais significativa (>80%) para valores de concentração de BAC maiores ou iguais a 0,0313 mM, atingindo-se a inactivação total (100% de redução) para a concentração de 0,125 mM de BAC. Pode-se então dizer, que na gama de concentrações testadas, a concentração mínima bactericida (MBC) do BAC para a *P. fluorescens* é de 0,125 mM. Paulus (1993) refere que a concentração mínima de inibição (MIC) de BAC, para esta bactéria, é de aproximadamente, 0,3 mM. Este valor é superior ao MBC observado nos ensaios realizados. Refira-se, no entanto, que ainda que por vezes os conceitos de MIC e MBC sejam usados indistintamente, estes obtêm-se com condições operatórias diferentes. Para a obtenção da MIC os microrganismos contactam desde o início do seu crescimento (inoculação) com o agente antimicrobiano, enquanto que para obtenção do MBC o microrganismo é inicialmente desenvolvido e só depois sujeito à agressão do produto antimicrobiano. Sendo assim, pode-se dizer que quando os microrganismos se desenvolvem na presença de BAC ficam menos sensíveis ao seu carácter tóxico.

A interpretação dos resultados da Figura 4.3 e da Tabela 4.2 evidencia que a conjugação de um tempo de contacto de 30 minutos com a aplicação de uma concentração de BAC de 0,125 mM causa a inactivação total da *P. fluorescens*. Pode-se, então, concluir que, na situação em estudo, a eficácia do BAC é maximizada com a implementação simultânea dos valores referidos (isto é, 0,0125 mM durante 30 minutos).

Os resultados da Tabela 4.2 e da Figura 4.3, evidenciaram, claramente, que o BAC, à semelhança de outros surfactantes compostos por quaternários de amónio (McDonnell e Russell, 1999; Kanazawa *et al.*, 1995; Tattawasart, *et al.*, 2000; Rodríguez, *et al.*, 2004), tem uma acção antimicrobiana muito significativa. De uma maneira geral, essa acção antimicrobiana causa perturbações na parede e membrana das células, que pode conduzir à lise celular ou à perda dos componentes celulares (McDonnell e Russell, 1999; Tattawasart, *et al.*, 2000; Campanac *et al.*, 2002). No presente estudo procurou-se conhecer algumas das consequências da acção antimicrobiana do BAC, responsável pela inactivação das células. Para tal, determinou-se o conteúdo em ATP das suspensões bacterianas antes e após o contacto com o BAC. Estes resultados são apresentados de seguida.

#### 4.1.3 Determinação do conteúdo em ATP de uma suspensão bacteriana antes e após aplicação de BAC

Os organismos possuem ATP como fonte de energia e quando ocorrem perturbações ao nível celular, em consequência da aplicação de, por exemplo, surfactantes ocorre a ruptura das membranas e há libertação de ATP para o meio extracelular. Neste trabalho determinou-se o conteúdo em ATP para avaliar esse fenómeno em resultado da adição de diferentes concentrações de BAC a culturas de *Pseudomonas fluorescens*.

Os resultados obtidos mostram que o BAC promoveu uma perturbação na integridade celular uma vez que houve libertação de ATP para o meio, como se pode observar pelas Figura 4.4 e Figura 4.5 seguintes.

A Figura 4.4 mostra que o BAC não interfere com o método de determinação do ATP, pois os valores determinados são bastante baixos e da mesma ordem de grandeza do observado na ausência de BAC.

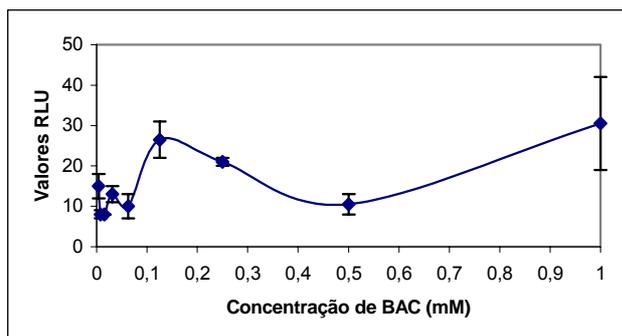


Figura 4.4- Conteúdo em ATP de soluções de BAC preparada com tampão fosfato. O “0” refere-se ao teste de controlo, isto é, sem adição de BAC.

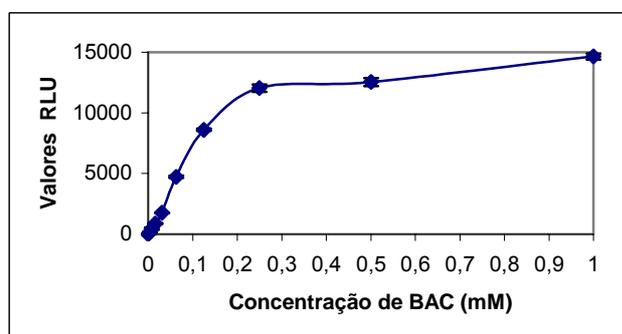


Figura 4.5- Conteúdo em ATP de suspensões bacterianas tratadas com diferentes concentrações de BAC. O “0” refere-se ao teste de controlo, isto é, sem adição de BAC.

Os resultados apresentados na Figura 4.5 decorrentes do tratamento com surfactante após 30 minutos de contacto com as células, indicam que para todas as concentrações testadas, os produtos intracelulares foram libertados para o meio quando as células foram expostas ao surfactante. O ATP aumentou no meio de cultura à medida que se aumentou a concentração de BAC aplicada. Contudo, quando foram aplicadas concentrações de BAC superiores a 0,2 mM, os valores de RLU mantiveram-se aproximadamente constantes, tendendo para um patamar de estabilidade. Isto permite concluir que até 0,2 mM de BAC houve a ruptura das membranas externas das células e, por consequência, libertação do conteúdo intracelular. Acima desse valor, as células já estariam totalmente desintegradas e todo o material intracelular libertado.

A observação da Figura 4.4, que evidencia os valores de RLU observados no ensaio de controlo, reforça os resultados da Figura 4.5. De facto, no ensaio de controlo os valores de RLU resultantes da aplicação de BAC são da mesma grandeza do valor observado na ausência do surfactante (Concentração “0”). A variação dos valores de RLU é, consequentemente, insignificante, provando que o BAC não interfere com o método usado na determinação do ATP.

De acordo com vários autores (Gilbert *et al.*, 2003; Ishikawa *et al.*, 2002; Sakagami *et al.*, 1989; Stewart, *et al.*, 2001; Tabata *et al.*, 2003), os surfactantes podem danificar a estrutura membranar pela interacção com componentes celulares, em particular as proteínas e os lípidos, podendo ocorrer a extracção de proteínas da membrana celular. A porção hidrófoba penetra nas membranas e o grupo polar catiónico associa-se com os fosfatos dos fosfolípidos, provocando alterações nas ditas membranas, que se reflecte na perda da semipermeabilidade e na saída dos componentes intracelulares. Nesta situação, o surfactante pode entrar no interior celular, exercendo, então, um efeito secundário de desnaturação das proteínas. Sendo assim, a partir dos ensaios realizados pode-se dizer que o BAC danificou a estrutura membranar da *P. fluorescens* por reacção com as proteínas causando, então, rupturas na célula por onde o material intracelular se foi libertando gradualmente, aumentando assim a concentração de ATP do meio de cultura (Figura 4.5). Nas condições operatórias realizadas, pode-se até dizer, que foi com a aplicação de 0,125 mM de BAC que se consegue a ruptura membranar das células na sua totalidade. Estes dados corroboram os resultados da Figura 4.3, pois a inactivação da *P. fluorescens* só é significativa para concentrações maiores ou iguais a 0,0313 mM, concentração esta à qual começa a ocorrer a libertação significativa do ATP para o meio.

## **4.2 AVALIAÇÃO DA INTERFERÊNCIA DA BSA NA ACTIVIDADE RESPIRATÓRIA DE *Pseudomonas fluorescens* E NA EFICIÊNCIA ANTIMICROBIANA DO BAC**

O objectivo deste estudo foi, inicialmente, verificar se a presença de matéria orgânica, neste caso a proteína albumina de soro bovino (BSA), na suspensão bacteriana, interferia na actividade respiratória das bactérias *Pseudomonas fluorescens*.

Foi também objectivo averiguar a possibilidade da BSA, só pela sua presença nas culturas bacterianas de *Pseudomonas fluorescens*, alterar a eficácia antimicrobiana do surfactante, tal como sugere a Norma Europeia EN 1276 (1997).

### **4.2.1 Efeito da BSA na actividade respiratória das culturas em suspensão de *Pseudomonas fluorescens***

O objectivo deste ensaio foi investigar se a presença da proteína BSA nas suspensões bacterianas de *Pseudomonas fluorescens* podia, por si só, interferir com a actividade respiratória dessas bactérias. Consequentemente, foram simuladas condições sujas que, de acordo com a norma europeia EN 1276 (1997), se obtêm pela adição, por exemplo, de uma solução de albumina de soro bovino à suspensão celular de forma a obter uma concentração final de BSA de 3 g/L.

Assim, prepararam-se suspensões bacterianas, às quais foi adicionado 3 g/L de BSA, tendo-se avaliado a actividade respiratória das bactérias ao longo do tempo (Figura 4.6).

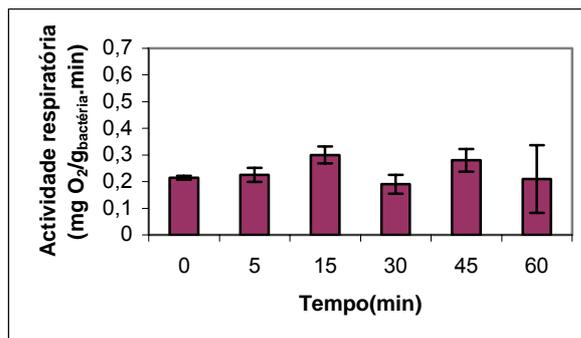


Figura 4.6- Influência de 3 g/L de BSA (Bovine Serum Albumine) na actividade respiratória da bactéria *Pseudomonas fluorescens*, ao longo do tempo. O tempo “0” refere-se ao teste de controlo, isto é, à actividade respiratória bacteriana obtida sem adição de BSA.

A Figura 4.6 mostra que a actividade respiratória das bactérias parece aumentar ligeiramente com a adição de BSA, aumento esse, contudo, não muito consistente ao longo do tempo. No entanto, se se tomar como referência os valores de actividade respiratória obtidos nos ensaios efectuados na ausência de BSA (Figura 4.1), verifica-se que, para os mesmos tempos de contacto, a actividade respiratória das suspensões bacterianas contendo BSA é sempre superior à observada no ensaio sem adição da proteína. Note-se que a comparação da Figura 4.6 com a Figura 4.1 só foi feita porque ambos os testes de controlo apresentaram valores similares.

Conclui-se, portanto, que a presença de BSA nas suspensões bacterianas, parece estimular a actividade respiratória das *P. fluorescens*. Refira-se, no entanto, que o aumento da actividade respiratória decorrente da presença de BSA não é muito significativa.

#### 4.2.2 Efeito da BSA no desempenho antimicrobiano do surfactante

Com o objectivo de investigar se a presença de BSA nas várias suspensões bacterianas de *Pseudomonas fluorescens* alterava o desempenho antimicrobiano do surfactante (BAC) foram realizados novos testes de determinação da actividade respiratória das bactérias em que as suspensões celulares continham, desta vez, 3 g/L de BSA. Para tal, a cada suspensão bacteriana foi adicionado inicialmente 3 g/L de BSA, tendo-se, posteriormente, aplicado várias concentrações de BAC durante 30 min.

Os resultados dos ensaios, para as várias concentrações de BAC testadas, podem ser observados na Figura 4.7.

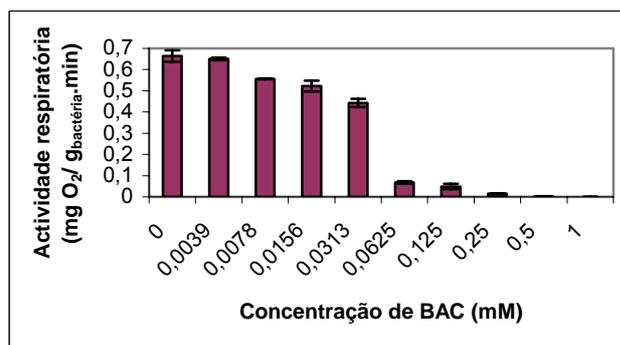


Figura 4.7- Efeito da concentração de BAC na actividade respiratória da *Pseudomonas fluorescens* após um tempo de contacto de 30 min, na presença de 3 g/L de BSA. O “0” refere-se ao teste de controlo, isto é, à actividade respiratória obtida sem adição de BAC mas na presença da BSA.

A quantificação do efeito do BAC, pode ser observado na Tabela 4.3 onde se expressa, em percentagem, a redução da actividade respiratória das suspensões bacterianas contendo BSA devida à presença de BAC. Para o cálculo das percentagens de redução tomou-se como referência o valor de actividade respiratória obtido no ensaio efectuado na ausência de BAC mas na presença de BSA (teste de controlo).

Tabela 4.3 - Redução da actividade respiratória da bactéria *Pseudomonas fluorescens* obtida para concentrações crescentes de BAC durante 30 minutos de contacto na presença de 3 g/L de BSA

Redução da actividade respiratória (%)									
BAC (mM)	0,00391	0,00781	0,0156	0,0313	0,0625	0,125	0,25	0,5	1
	21,1	16,3	21,4	33,4	89,8	92,7	97,8	99,7	100

Da análise da Figura 4.7 constata-se que a actividade respiratória das bactérias diminuiu quando se adicionou o BAC, diminuição essa mais notória para concentrações superiores a 0,0313 mM. No entanto, a actividade respiratória da *P. fluorescens* só se anulou quando concentrações de BAC maiores que 0,5 mM foram aplicadas.

A comparação da Figura 4.7 com a Figura 4.3, e respectivas Tabela 4.3 e Tabela 4.2, mostra que o efeito antimicrobiano do BAC foi significativamente reduzido quando a BSA foi introduzida nas suspensões bacterianas. Constata-se que, na presença da BSA, é necessário, de uma maneira geral, maior concentração de BAC para se alcançar as mesmas percentagens de inactivação. De facto, a redução total da actividade respiratória bacteriana, para os ensaios sem BSA, ocorreu para a concentração de 0,125 mM de BAC, enquanto que

para os ensaios com BSA, a inactivação só ocorreu para 1 mM, isto é, para uma concentração, aproximadamente, 8 vezes maior. Pode-se, então, dizer que, em condições sujas (neste estudo simuladas com a adição de 3 g/L de BSA, segundo a norma EN 1276) ocorreu interacção do BAC com a proteína, que teve como efeito visível a diminuição do efeito antimicrobiano do surfactante. Essa diminuição justifica-se pois, ao reagir com a BSA, menor quantidade de BAC ficou disponível para reagir com as células. Resultados semelhantes foram obtidos por Simões *et al* (2003 a) mas com a aplicação de biocidas.

Perante estes resultados, pode-se concluir que a eficácia antimicrobiana do BAC é significativamente reduzida quando existe BSA nas suspensões bacterianas. Parte dessa redução pode decorrer do facto das bactérias, quando em presença da proteína, apresentarem maior actividade respiratória (Figura 4.6). No entanto, esta constatação não parece ser, por si só, suficiente para explicar a menor susceptibilidade das bactérias ao BAC quando em presença da BSA. De facto, Ayliffe (2000) sugere que as proteínas podem formar uma camada protectora em torno da célula microbiana, camada essa responsável pela limitação da acção tóxica de agentes antimicrobianos. Outros autores (McDonnell e Russell (1999) e Paulus (1993)) atribuem, também, a essa camada protectora à volta das células bacterianas induzida pela BSA a responsabilidade da menor eficiência antimicrobiana de compostos quaternários de amónia. A formação de uma barreira protectora à volta da célula formada pela matéria orgânica (neste caso, BSA) interfere com a acção antimicrobiana do surfactante pois limita a acessibilidade deste às bactérias. Sabe-se que os compostos quaternários de amónia (QAC's) danificam a membrana externa das bactérias Gram negativas, promovendo a libertação dos constituintes intracelulares (Campanac, *et al.*, 2002; McDonnell e Russell, 1999; Tabata, *et al.*, 2003). No entanto, se a BSA está presente, esta vai actuar como uma barreira a essa ruptura das membranas reforçando, deste modo, a integridade celular (Fraud *et al.*, 2001).

Estas constatações resultantes deste estudo são de extrema importância, uma vez que em situações reais (instrumentos médicos, superfícies industriais, etc.) é frequente a existência de matéria orgânica. Consequentemente, a existência de substâncias potencialmente interferentes com os agentes antimicrobianos é um facto, que não se pode descurar sob pena da sua omissão causar resultados desastrosos quando os procedimentos de limpeza e desinfecção são implementados.

### 4.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO BAC EM BIOFILMES DE *Pseudomonas fluorescens* FORMADOS EM SUPERFÍCIES DE AÇO INOX E SILICONE

O objectivo dos ensaios realizados compreendeu a avaliação do efeito do surfactante, cloreto de benzalcónio, em biofilmes formados pela *Pseudomonas fluorescens*. Simultaneamente, também se procurou determinar se o tratamento prévio com BAC das superfícies de adesão afectava a formação e actividade respiratória dos biofilmes, posteriormente, formados nessas superfícies.

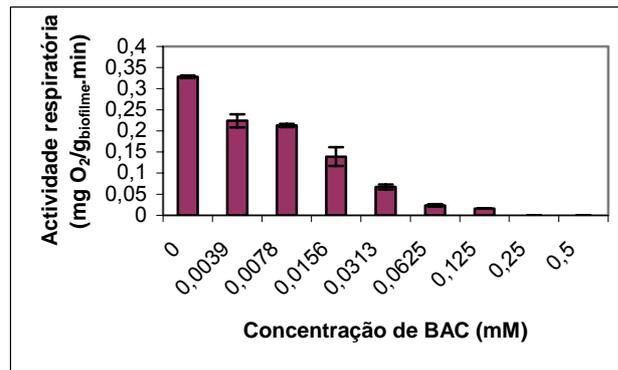
#### 4.3.1 Efeito da aplicação de BAC a biofilmes

Neste ponto são apresentados os resultados decorrentes da aplicação de BAC a biofilmes formados em superfícies de aço e silicone.

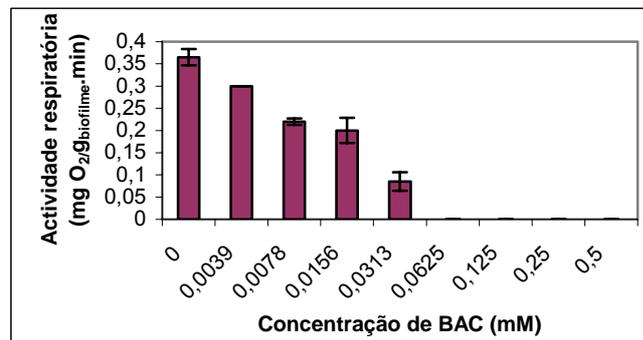
Para o estudo do comportamento dos biofilmes face à agressão com BAC foi necessário promover a formação de biofilmes bacterianos sobre as superfícies em estudo. A formação de biofilme foi promovida colocando as placas de aço inox e silicone no interior do reactor biológico contendo uma cultura contínua de *Pseudomonas fluorescens*, em condições hidrodinâmicas controladas, que operou durante 5 dias, como descrito no ponto 3.4.2.

O efeito do surfactante nos biofilmes foi avaliado pela determinação da actividade respiratória e da massa de biofilme.

Nas figuras seguintes apresenta-se a actividade respiratória dos biofilmes de *Pseudomonas fluorescens* aderidos às placas de aço inox (Figura 4.8-a) e de silicone (Figura 4.8-b), bem como, as massas de biofilme determinadas (Figura 4.9-a e Figura 4.9-b).

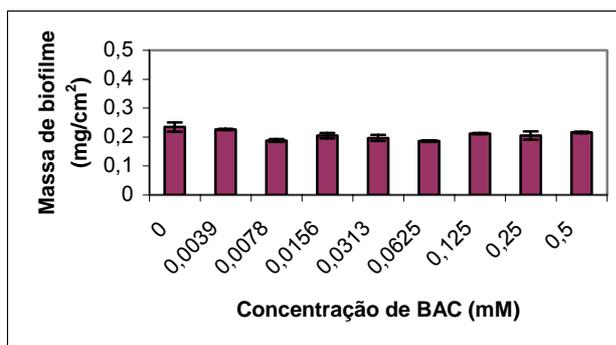


(a)

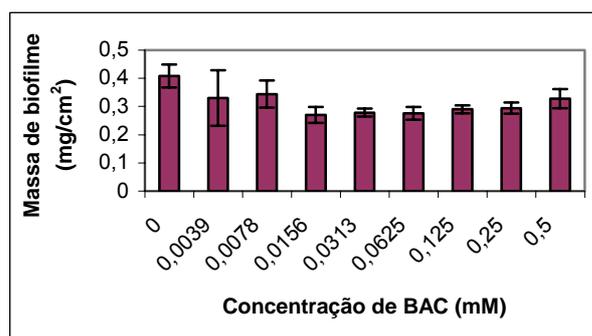


(b)

Figura 4.8- Actividade respiratória de biofilmes de *Pseudomonas fluorescens* formados em placas de aço (a) e em placas de silicone (b) antes e após a aplicação de concentrações crescentes de BAC



(a)



(b)

Figura 4.9 - Massa de biofilme formado em placas de aço (a) e em placas de silicone (b) antes e após a aplicação de várias concentrações de BAC

A Figura 4.8 mostra que a aplicação de BAC provocou a redução da actividade respiratória das bactérias incluídas nos biofilmes, quer estes se tenham formado sobre o aço inox, quer sobre o silicone. Essa redução torna-se mais significativa com o aumento da concentração de BAC aplicada, sendo a concentração de 0,0313 mM de BAC aquela que leva a reduções mais significativas tanto nos biofilmes formados em aço como nos formados em silicone (Tabela 4.4). A inactivação total dos biofilmes formados sobre o aço ocorreu para concentrações de BAC iguais ou superiores a 0,25 mM. Para a inactivação total dos biofilmes formados em silicone foi necessário uma menor quantidade de BAC, isto é, cerca de 0,0625 mM de BAC. Verifica-se, então, que foi necessário uma concentração de BAC cerca de 4 vezes maior para a inactivação total dos biofilmes em aço do que em biofilmes formados em silicone. Esta constatação parece indicar que os biofilmes de *P. fluorescens* formados em silicone tornam-se mais sensíveis à acção de BAC.

A comparação dos ensaios em suspensão (Figura 4.3) com os ensaios com biofilme (Figura 4.8) mostra que, quer para as células em suspensão, quer para as células dos biofilmes, parece não haver uma resposta imediata à acção antimicrobiana do BAC, isto é, só a partir de concentrações superiores a 0,0313 mM é que se registaram reduções de actividade

significativas. Constatou-se, também, que para inactivar as células em biofilmes formados em placas de aço (Figura 4.8-a) foi necessário o dobro da concentração de BAC usada para inactivar as células em suspensão. Contrariamente, a inactivação dos biofilmes formados em silicone (Figura 4.8-b) ocorreu para uma concentração de BAC duas vezes inferior à concentração de inactivação das células em suspensão. Alguns autores (Campanac *et al.*, 2002; Simões *et al.*, 2005), ao estudarem a eficiência biocida de surfactantes, constataram que é mais fácil inactivar os microrganismos quando estes estão dispersos numa fase líquida do que quando estão constituídos num biofilme. Muitos factores contribuem para a maior resistência dos microrganismos quando estes estão constituídos em biofilme (Costerton *et al.*, 1995; Heinzl, 1998; Luppens *et al.*, 2002; Morton *et al.*, 1998; Pereira e Vieira, 2001). De entre esses factores, a matriz polimérica dos biofilmes parece desempenhar um papel importante uma vez que protege os microrganismos da acção de agentes agressivos (Christensen e Characklis, 1990; Luppens, *et al.*, 2002; Stewart, *et al.*, 2001). No entanto, há autores (Bown e Gilbert, 1993) que referem que, dependendo das circunstâncias, a presença da matriz poderá ter um papel insignificante na menor susceptibilidade dos biofilmes aos agentes antimicrobianos. Nos ensaios realizados, a menor susceptibilidade da bactéria *P. fluorescens* ao BAC foi verificada quando esta, de facto, desenvolveu um biofilme sobre o aço. No entanto, essa menor susceptibilidade ao surfactante não se evidenciou quando a mesma bactéria desenvolveu biofilmes sobre o silicone. Pode-se, então, dizer que o silicone induziu o desenvolvimento de um biofilme bastante mais sensível à acção tóxica do BAC, não só quando comparado com os biofilmes desenvolvidos sobre o aço, mas sobretudo quando comparado com as bactérias em suspensão. No caso dos biofilmes formados sobre o silicone, a protecção conferida pela matriz polimérica dos biofilmes às bactérias não parece ter sido significativa. Estas constatações evidenciam o papel preponderante do tipo de material das superfícies de adesão nas características dos biofilmes aí desenvolvidos, alertando também, para a necessidade de se fazerem os estudos de avaliação da eficácia de agentes antimicrobianos em biofilmes desenvolvidos em superfícies cujo tipo de material seja o mais representativo da situação real onde esses agentes serão aplicados.

Quanto à massa de biofilme acumulado sobre as superfícies de adesão, a Figura 4.9 mostra que foi nas placas de silicone que se observou maior quantidade de biomassa. A Figura 4.9 também evidencia que a aplicação de BAC parece não causar remoção significativa da biomassa depositada sobre as placas, quer de aço, quer de silicone, ainda que as maiores remoções sejam observadas nos biofilmes formados sobre o silicone. Os valores de massa de biofilme observados após tratamento com as várias concentrações de surfactante são

similares entre si e da mesma ordem de grandeza dos valores observados antes da aplicação de BAC. Pode-se, portanto, referir que, nas condições estudadas, o BAC não é eficiente em termos de remoção de biofilme das superfícies de aço e silicone.

O cruzamento dos dados da Figura 4.8 e da Figura 4.9 mostra que, apesar de ser nas placas de silicone que se acumula maior quantidade de biofilme, este apresenta valores de actividade similares aos observados nos biofilmes formados sobre as placas de aço. Esta constatação reforça, novamente, o papel da superfície de adesão nas características do biofilme. Pode-se pois dizer, que o silicone conduz a um desenvolvimento de biofilme com características diferentes dos biofilmes formados sobre o aço. Os biofilmes formados sobre o silicone apresentaram maior quantidade de biomassa, biomassa esta, no entanto, mais fácil de remover e inactivar. Estas características poderão ser devidas ao facto do biofilme, em termos de composição bioquímica, poder ter menos células e mais polímeros extracelulares ou então, serem devidas a modificações fenotípicas, induzidas pelo silicone, que condicionaram a actividade respiratória das bactérias *P. fluorescens*.

Para uma melhor caracterização da acção do BAC sobre os biofilmes, construíram-se as Tabela 4.4 e Tabela 4.5 que mostram, respectivamente, as percentagens de redução de actividade respiratória e de massa de biofilme obtidas com a aplicação das várias concentrações de BAC.

Tabela 4.4 - Redução da actividade respiratória de biofilme formado em placas de aço e silicone obtida para concentrações crescentes de BAC durante 30 minutos de contacto

		Redução da actividade respiratória (%)								
BAC (mM)		0,00391	0,00781	0,0156	0,0313	0,0625	0,125	0,25	0,5	1
Placas	Aço inox	31,7	35	57,6	79,5	92,8	95	100	100	100
	Silicone	17,8	39,7	45,2	76,7	100	100	100	100	-

A observação da Tabela 4.4 mostra que, nas condições estudadas, a concentração mínima de inibição do biofilme (BIC) de *P. fluorescens* quando formado sobre superfícies de aço inox é de 0,25 mM. A MBC dos biofilmes desenvolvido sobre o silicone é de 0,0625 mM. Ou seja, pode-se então dizer, que os biofilmes quando desenvolvidos sobre o silicone apresentam uma maior susceptibilidade ao surfactante. Note-se que, a determinação da BIC correspondeu à menor concentração de BAC para a qual não foi detectada nenhum indício de actividade respiratória das bactérias dos biofilmes.

Tabela 4.5 - Redução da massa de biofilme formado em placas de aço e silicone obtida para concentrações crescentes de BAC durante 30 minutos de contacto

Redução da massa de biofilme (%)										
BAC (mM)		0,00391	0,00781	0,0156	0,0313	0,0625	0,125	0,25	0,5	1
Placas	Aço inox	3,83	20	12,8	16,2	21	10	13	8,1	13
	Silicone	19,1	15,7	33,8	31,8	32,4	28,9	27,9	19,6	-

A Tabela 4.5 mostra que, de facto, a redução de massa causada pela aplicação de BAC é pouco significativa. Refira-se, no entanto, que apesar de ter sido no silicone que se formou maior quantidade de biofilme, foi também neste material que ocorreu a maior redução de massa quando se aplicou o surfactante.

Com os resultados obtidos pode-se concluir, então, que a acção antimicrobiana do BAC é mais significativa na inactivação dos biofilmes (Tabela 4.4) do que na remoção de biomassa (Tabela 4.5). Pode-se especular, então, que o BAC não tem capacidade para enfraquecer a matriz polimérica dos biofilmes e, conseqüentemente causar o desprendimento do biofilme das superfícies de adesão. Estes resultados contrariam, de certo modo, a prática geral de usar surfactantes, em combinação com biocidas, como forma de promover a remoção de biofilmes (Paulus, 1993). Sendo assim, os resultados obtidos, para além de serem importantes na caracterização da acção antimicrobiana do BAC, são também indicadores de potencial ineficácia do BAC quando aplicado em ambientes reais pois, de acordo com alguns autores (Chen e Stewart, 2000 e Simões *et al*, 2003) mais importante do que inactivar células dos biofilmes é promover a sua remoção. A existência de biofilmes, totalmente ou parcialmente inactivados, mas aderidos às superfícies continua a ser um sério problema nos sistemas industriais, pois estes podem constituir uma fonte de carbono adicional para outros microrganismos, bem como, funcionar como superfícies privilegiadas para conseqüente adesão microbiana. Conclusões similares foram tiradas por outros autores, Simões *et al* (2003) mas com estudos realizados com biocidas à base de aldeído, onde se constatou que apesar do biocida levar à redução da actividade dos biofilmes, não era eficiente na remoção dos biofilmes aderidos às superfícies.

#### 4.3.2 Efeito da aplicação de BAC na estrutura superficial dos biofilmes

Em conseqüência da aplicação de um agente antimicrobiano, a estrutura da matriz polimérica dos biofilmes pode ser afectada (já que funciona como uma barreira protectora às

agressões externas) em resultado da interacção com esse produto antimicrobiano (Donlan *et al.*, 2002; Gilbert *et al.*, 2003). Consequentemente, a estrutura superficial do biofilme pode ser, também, alterada (Allison, 2003). Sendo assim, as possíveis alterações da estrutura superficial do biofilme, face ao tratamento com BAC, foram investigadas por microscopia electrónica de varrimento (SEM).

Nas figuras seguintes podem-se observar algumas microfotografias de imagens obtidas por SEM de biofilmes formados sobre placas de aço e sobre placas de silicone, biofilmes estes formados durante cinco dias.

Na Figura 4.10 pode ser observado o aspecto da superfície das placas de aço e silicone limpas, isto é, antes de serem introduzidas no reactor biológico para formação de biofilme.

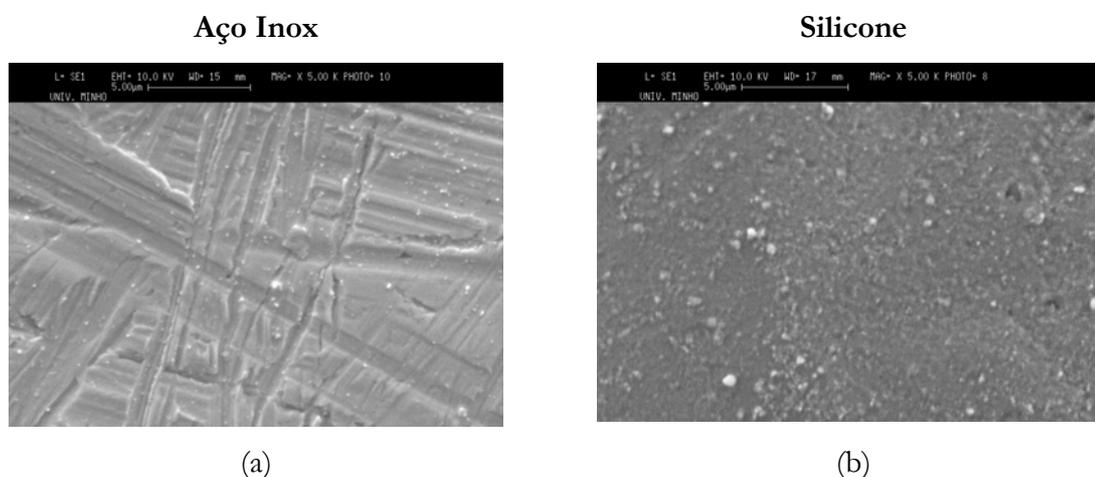


Figura 4.10- Microfotografias de imagens obtidas por SEM da estrutura superficial do aço inox (a) e do silicone (b)

Estas imagens evidenciam a diferente morfologia superficial dos materiais aço e silicone. O aço (Figura 4.10- a) possui uma estrutura mais rugosa enquanto que a superfície do silicone é mais lisa, i.e., menos rugosa, apesar de evidenciar um aspecto mais granuloso, que pode advir, em parte, de uma deficiente limpeza ou do próprio manuseamento de preparação para a observação em SEM.

O aspecto do biofilme bacteriano formado nas placas de aço e silicone, antes e após a aplicação de 0,0625 mM de BAC pode ser observado na Figura 4.11.

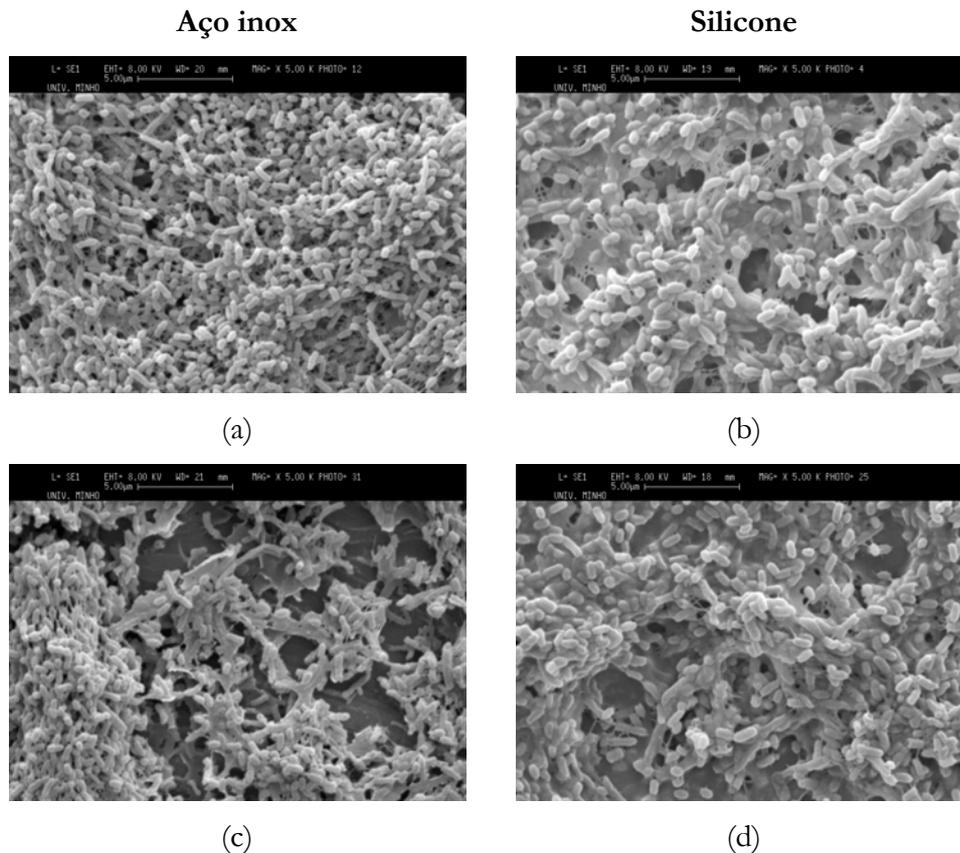


Figura 4.11- Microfotografias de imagens obtidas por SEM da estrutura superficial do biofilme de *P. fluorescens* formado sobre aço inox e do silicone, antes [(a) e (b)] e após [(c) e (d)] a aplicação de 0,0625 mM de BAC.

Pela observação da Figura 4.11, constata-se que o biofilme de *P. fluorescens* formado nas superfícies de aço inox, quando comparado com biofilme formado sobre o silicone, parece apresentar maior quantidade de células e menor quantidade de polímeros extracelulares (EPS). De facto, a matriz polimérica do biofilme é bastante mais evidente nos biofilmes formados no silicone. Estas observações reforçam a hipótese de justificação, anteriormente avançada, de que a actividade respiratória observada nos biofilmes formados sobre o aço inox (da mesma ordem de grandeza da observada nos biofilmes formados sobre o silicone, apesar de possuírem menor massa), se deva a um maior número de células presentes nesses biofilmes. Estas observações, também, parecem justificar a maior facilidade de inactivação do biofilmes formados sobre o silicone, pois estes, parecem apresentar menor quantidade de células. Sendo assim, ao apresentarem menor número de células maior será a disponibilidade de BAC para cada célula desses biofilmes, exercendo-se, assim, um efeito tóxico mais acentuado. Por outro lado, estas observações, que mostram uma matriz polimérica evidente

nos biofilmes formados sobre o silicone, também ajudam a justificar a existência de maior quantidade de massa de biofilme depositado sobre silicone.

A observação mais pormenorizada da Figura 4.11 parece indicar que as bactéria integrantes dos biofilmes formados no aço são mais pequenas que as bactérias formadas sobre o silicone. Esta alteração morfológica continua a ser evidente mesmo quando os biofilmes foram tratados com o BAC. O mecanismo que dita tal alteração não é claro. Fica, no entanto, reforçado o papel da superfície da adesão, não só nas características metabólicas, mas também na morfologia dos biofilmes sobre eles desenvolvidos.

#### 4.4 INFLUÊNCIA DO BAC NAS PROPRIEDADES SUPERFICIAIS DO AÇO E SILICONE

Neste ponto apresentam-se os resultados referentes à determinação de algumas propriedades superficiais, nomeadamente, a tensão superficial e a hidrofobicidade.

##### 4.4.1 Ângulos de contacto, tensões superficiais e hidrofobicidade das superfícies de aço inox e silicone

O ângulo de contacto formado pela água sobre uma superfície tem sido considerado, numa primeira abordagem, uma medida indirecta de hidrofobicidade das superfícies.

Na Tabela 4.6 são apresentados os valores médios dos ângulos de contacto obtidos com água sobre superfícies de aço inox e silicone antes e após condicionamento com BAC.

Tabela 4.6 - Valores médios dos ângulos de contacto ( $\pm$  desvio padrão) determinados à temperatura ambiente (20°C) com água ( $\theta_w$ ), sobre superfícies de aço inox e silicone antes e após condicionamento com BAC

Ângulos de contacto $\theta$ (°)		
Condicionamento (mM)	$\theta_w$	
	Aço inox	Silicone
Sem	54,0 $\pm$ 5,71	114,1 $\pm$ 1,70
0,00196	72,2 $\pm$ 4,34	114,3 $\pm$ 0,98
0,00391	70,7 $\pm$ 3,70	112,7 $\pm$ 0,55
0,00781	67,5 $\pm$ 3,76	114,8 $\pm$ 2,82
0,0156	75,2 $\pm$ 8,93	113,0 $\pm$ 1,27
0,0625	82,9 $\pm$ 6,50	115,05 $\pm$ 1,82
0,125	76,5 $\pm$ 3,74	114,4 $\pm$ 2,25
0,25	71,8 $\pm$ 5,30	113,7 $\pm$ 1,04

Tabela 4.7 - Valores médios do ângulo de contacto ( $\pm$  desvio padrão) determinados à temperatura ambiente (20°C) com água ( $\theta_w$ ), sobre superfícies de células *P. fluorescens* na ausência de surfactante

	Ângulos de contacto $\theta$ (°)
	$\theta_w$
Células	25 $\pm$ 2

Os valores da Tabela 4.6 mostram que a gota de água formou sempre ângulos maiores sobre a superfície de silicone do que sobre o aço inox. Os ângulos de contacto formados pela água sobre as superfícies de aço inox e silicone sem condicionamento, são de grandeza diferente. De facto, o ângulo de contacto formado sobre o aço foi de cerca de 50°, enquanto que o ângulo formado sobre o silicone foi aproximadamente o dobro ( $\theta_w \sim 110^\circ$ ). Segundo Valcarce *et al.* (2002), quando os ângulos de contacto formados pela água sobre uma superfície são superiores a 65°, essa superfície é considerada hidrofóbica. Consequentemente, o aço inox, como apresentou um valor inferior a 65° (54°) pode ser considerado um material hidrofílico. No entanto, o condicionamento das superfícies de aço com BAC causou uma mudança da hidrofobicidade do material. Isto é, o valor do ângulo de contacto formado pela água sobre o aço condicionado foi mais elevado do que o observado sobre o aço não condicionado e superior a 65°. Assim, pode-se dizer que o condicionamento da superfície de aço inox com o BAC faz com que o aço adquira um carácter mais hidrofóbico. Ressalve-se, no entanto, que segundo outros autores (van Oss e Giese (1995)) a superfície do aço inox, estando ou não condicionada com BAC, já seria considerada uma superfície hidrofóbica, pois os valores de ângulos de contacto obtidos foram maiores que 50°.

No caso do silicone, os ângulos obtidos são sempre mais elevados do que os observados com o aço e sempre maiores que 50°, não se obtendo grandes variações de hidrofobicidade com o aumento da concentração de BAC usada no condicionamento. Constata-se, assim, que o silicone apresenta sempre um carácter hidrofóbico e mais elevado do que o aço inox.

Para se poder determinar a tensão superficial de um sólido, é necessário conhecer as componentes polares e apolares e seus respectivos parâmetros. Para tal, é necessário determinar-se o ângulo de contacto formado por três líquidos de polaridades diferentes. Usou-se, então, como apolar, o  $\alpha$ -bromonaftaleno, a água e a formamida como líquidos polares. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 4.8.

Tabela 4.8 - Valores das componentes apolar ( $\gamma_s^{LW}$ ), polar ( $\gamma_s^{AB}$ ) e respectivos parâmetros ( $\gamma_s^+ e \gamma_s^-$ ) da tensão superficial ( $\gamma_s^{tot}$ ), das superfícies de aço inox e silicone, antes e após condicionamento com BAC

Condicionamento (mM)	Tensão superficial (mJ/m <sup>2</sup> )									
	$\gamma_s^{LW}$		$\gamma_s^+$		$\gamma_s^-$		$\gamma_s^{AB}$		$\gamma_s^{tot}$	
	Aço	Silic	Aço	Silic	Aço	Silic	Aço	Silic	Aço	Silic
Sem	32,4	20,6	3,2	0,1	19,3	0	15,7	0,1	48,1	20,7
<b>0,00196</b>	41,3	21,2	0,5	2,2	7,6	2,2	4,0	4,4	45,3	25,6
<b>0,00391</b>	40,9	19,5	1,1	1,4	7,0	2,3	5,5	3,5	46,4	23,0
<b>0,00781</b>	41,9	21,3	0,1	0,5	18,5	0,4	2,7	0,9	44,6	22,1
<b>0,0156</b>	37,4	22,0	1,1	0,3	5,5	0,4	4,9	0,7	42,3	22,7
<b>0,0625</b>	34,0	20,8	0,6	1,6	3,6	1,5	3,1	3,1	37,1	23,9
<b>0,125</b>	30,6	21,2	0,5	1,0	9,5	1,0	4,3	2,0	34,9	23,2
<b>0,25</b>	39,2	21,1	0,4	1,5	9,5	1,7	3,7	3,2	42,9	24,1

Silic - silicone

Os valores das componentes da tensão superficial foram obtidos através da equação 4 (Young-Good-Girifalco-Fowkes), usando os valores de tensão superficial dos líquidos utilizados (Tabela 3.5).

Giese *et al.* (1996) referem que os materiais hidrofóbicos apresentam, em geral,  $\gamma_s^+ < 28$  mJ/m<sup>2</sup>, enquanto os hidrofílicos têm um  $\gamma_s^- > 28$  mJ/m<sup>2</sup>. Segundo este critério e analisando-se a tabela acima, verifica-se que para todas as condições, os valores de  $\gamma_s^+$  são sempre  $< 28$  mJ/m<sup>2</sup>, pelo que se pode concluir que os materiais testados são ambos hidrofóbicos.

De acordo com van Oss e Giese (1995), é possível quantificar a hidrofobicidade da superfície de um material utilizando as componentes das tensões superficiais do sólido e da água. A hidrofobicidade é assim, expressa em termos de energia de interação hidrofóbica ( $\Delta G_{sws}^{tot}$ ) e define o grau de interação entre as moléculas de um material (índice “s”) imerso em água (índice “w”).

Na Tabela 4.9 apresentam-se os valores da energia livre de interação, entre as moléculas do material (índice “s”) imerso em água (índice “w”) (hidrofobicidade -  $\Delta G_{sws}^{tot}$ ), dos diferentes materiais, antes e após condicionamento com BAC.

Tabela 4.9 - Valores da energia livre de interação (grau de hidrofobicidade -  $\Delta G_{sws}^{tot}$ ) da superfície das placas de aço inox e silicone antes e após condicionamento com BAC

Condicionamento (mM)	Grau de hidrofobicidade	
	Aço inox	Silicone
Antes Condicionamento	-10,6544	-92,341
0,00196	-45,9934	-51,005
0,00391	-44,5183	-55,1235
0,00781	-20,7441	-77,0628
0,0156	-47,396	-79,8713
0,0625	-56,1595	-57,7552
0,125	-35,7036	-65,541
0,25	-40,1866	-57,4097

Tabela 4.10 - Valor energia livre de interação (grau de hidrofobicidade -  $\Delta G_{sws}^{tot}$ ) da superfície das células *P. fluorescens*, na ausência de surfactante

	Hidrofobicidade (mJ/m <sup>2</sup> )
Células	+ 25,0

Pela análise dos valores de energia livre de interação (que define o grau de hidrofobicidade) obtidos, depreende-se que a superfície do aço sob efeito do condicionamento com BAC apresenta valores de  $\Delta G_{sws}^{tot}$  ainda mais negativos do que quando não condicionado. Segundo van Oss e Giese (1995) quanto mais negativo for o valor de  $\Delta G_{sws}^{tot}$  mais hidrofóbico é o material. Sendo assim, o aço pode ser considerado inequivocamente um material hidrofóbico, carácter hidrofóbico este que se acentua com o condicionamento com BAC. No caso do silicone, mesmo sem condicionamento, o valor de  $\Delta G_{sws}^{tot}$  era negativo ( $\sim 92^\circ$ ) e consideravelmente superior, em termos absolutos, ao valor determinado para o aço inox, mesmo após o condicionamento deste. O valor negativo de  $\Delta G_{sws}^{tot}$  é indicador do carácter declaradamente hidrofóbico do silicone. No entanto, o condicionamento da superfície do silicone causa uma diminuição (em valor absoluto) do valor de  $\Delta G_{sws}^{tot}$ , ou seja, o silicone passa a apresentar um carácter menos hidrofóbico, mas ainda assim, superior ao registado com o aço inox.

Conclui-se, assim, pela análise dos valores de hidrofobicidade obtidos (Tabela 4.9) e segundo o critério de van Oss e Giese (1995), que ambas as superfícies quando tratadas com BAC continuaram com valores de hidrofobicidade negativos ( $\Delta G_{sws}^{tot} < 0$ ), indicadores de que são superfícies hidrofóbicas. Refira-se, no entanto, que o silicone, quando comparado com o aço, é a superfície que apresenta um carácter mais hidrofóbico.

Como já referido anteriormente, o ângulo de contacto formado pela água sobre uma superfície tem sido considerado, numa primeira abordagem, uma medida indirecta de hidrofobicidade das superfícies. Sendo assim, a indicação fornecida pelo  $\Delta G_{sws}^{tot}$ , reforçam os resultados obtidos na determinaram dos ângulos de contacto ( $\theta_w$ ).

Na tabela seguinte, apresenta-se a energia livre de adesão, em meio aquoso, entre a bactéria *Pseudomonas fluorescens* e as duas superfícies de adesão (aço inox e silicone).

Tabela 4.11 - Valores da energia livre de adesão ( $\Delta G_{bws}^{ad}$ ) da bactéria *Pseudomonas fluorescens* ao aço inox e silicone

Condicionamento (mM)	Energia livre de adesão	
	Aço inox	Silicone
Sem	9,33019	-8,7299
0,00196	3,662298	-6,3201
0,00391	1,70924	-4,617
0,00781	14,5617	-8,0887
0,0156	0,112718	-7,5695
0,0625	-1,43197	-6,91041
0,125	6,2396	-7,1926
0,25	6,2315	-6,3034

Sob o ponto de vista termodinâmico, a adesão é favorecida quando ocorre uma diminuição da energia livre de adesão na interface bactéria (b)/água (w)/substrato (s), o que significa  $\Delta G_{bws}^{ad} < 0$ . Segundo este critério teórico e de acordo com a Tabela 4.11, a adesão, ocorreria preferencialmente nas superfícies de silicone, pois estas são aquelas que apresentam valores negativos de energia livre de adesão. Nos ensaios práticos realizados, a maior quantidade de biofilme foi observada, de facto, nas placas de silicone, confirmando-se, assim, que quanto mais negativo for o valor de  $\Delta G_{bws}^{ad}$  ( $\Delta G_{bws}^{ad} = -8,73$ , no caso do silicone e

( $\Delta G_{bws}^{ad} = 9,33$ , no caso do aço) mais favorecida será a adesão das bactérias *Pseudomonas fluorescens* a esse material.

O condicionamento das placas não parece alterar a energia disponível para a interacção entre o silicone e as bactérias, pois os valores são próximos, o que poderia indicar que a massa de biofilme aderida seria semelhante. No entanto, a massa de biofilme aumenta com o condicionamento, o que indica que a  $\Delta G_{bws}^{ad}$ , por si só, não explica os resultados obtidos. Refira-se também que a teoria termodinâmica prevê a adesão inicial e a quantificação da massa de biofilme foi feita ao fim de 5 dias de formação. Nesta situação, as indicações dadas pela termodinâmica poderão deixar de ser significativas, pois os biofilmes para além de células são constituídos por outras substâncias (EPS) não previstas na determinação da adesão inicial.

No entanto, com o condicionamento das placas, a  $\Delta G_{bws}^{ad}$  entre o silicone e as bactérias é sempre mais negativa do que a observada entre o aço e as bactérias, reforçando os maiores valores de massa aderida observados, sempre, nas placas de silicone.

Como já foi referido por outros autores (Pereira *et al.*, 2000), esta discordância entre a teoria e a experiência prática laboratorial revela as limitações da própria teoria termodinâmica. A energia livre de adesão ( $\Delta G_{bws}^{ad}$ ) permite prever a possibilidade de se estabelecer uma nova interface superfície/bactéria. No entanto, esta não considera alguns tipos de interacção que se estabelecem entre superfícies e células e que podem ter um grande impacto no processo de adesão, como por exemplo, as interacções que decorrem do condicionamento das superfícies. Para além disso, o condicionamento das placas é feito com um produto químico. Consequentemente, as interacções químicas que se estabelecem após o condicionamento são diferentes das existentes com as superfícies limpas. Estas interacções químicas podem sobrepor-se às interacções previstas pela teoria termodinâmica.

Um aspecto que não é contemplado pela energia livre de adesão e que pode, também, estar na base desta discrepância entre a teoria e prática relaciona-se com o facto de ocorrer uma interacção entre superfícies e o meio líquido envolvente que poderá alterar as propriedades destes suportes, nomeadamente, a hidrofobicidade. Este aspecto não é considerado quando se determinam os ângulos de contacto e consequentemente as tensões superficiais. Aliás, a medição dos ângulos de contacto é efectuada recorrendo a líquidos com características bem definidas, como por exemplo, a água. Mas, na realidade, a fase líquida que estava em contacto com os materiais de adesão era meio de cultura, cujas características são diferentes das da água. Este facto poderá igualmente condicionar os resultados obtidos, cujos

processos de cálculo consideram como meio líquido a água e não o meio de cultura realmente utilizado.

#### 4.4.2 Influência do condicionamento das placas de aço inox e silicone na formação e actividade dos biofilmes

Nestes ensaios procurou-se avaliar se o tratamento prévio das placas de aço inox e silicone com diferentes concentrações de BAC afectava a formação dos biofilmes bem como a actividade respiratória. Este pré-tratamento das placas, denominado de condicionamento, consistiu basicamente no contacto preliminar das placas, antes da formação de biofilme, com o surfactante. Este condicionamento efectuou-se por imersão, durante 30 min, das superfícies em soluções de BAC de diferentes concentrações de 0,0625 mM; 0,125 mM; 0,25 mM e 0,5 mM (ponto 3.3.2). O objectivo era investigar se a concentração de BAC usada no condicionamento das placas tinha algum efeito na formação e remoção de biofilme. Depois de serem condicionadas, as placas foram colocadas em suportes adequados, introduzidas no reactor biológico para se proceder à formação de biofilme, tal como descrito no ponto 3.4.2.

Os resultados da actividade respiratória dos biofilmes formados nas placas condicionadas estão reunidos na Figura 4.12.

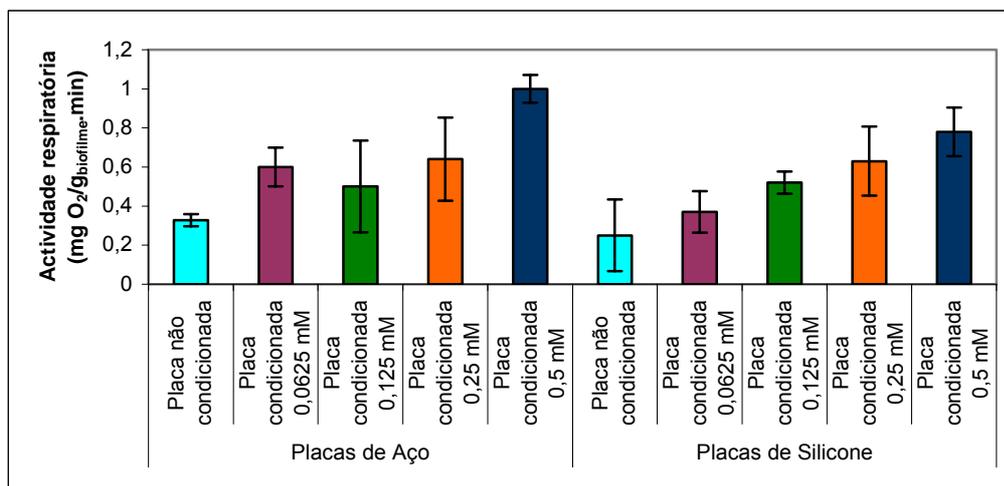


Figura 4.12- Actividade respiratória de biofilme formados em placas de aço e silicone previamente condicionadas

A Figura 4.12 mostra que o condicionamento das placas, quer de aço, quer de silicone, causa um aumento evidente da actividade respiratória dos biofilmes posteriormente formados sobre essas superfícies. A Figura 4.12, também, mostra que, de uma maneira geral, a

actividade respiratória dos biofilmes formados nas placas de aço e silicone aumenta à medida que aumenta a concentração de BAC usada no prévio condicionamento das superfícies. Refira-se, no entanto, que essa tendência crescente é mais robusta nos biofilmes formados sobre as placas de silicone. Nos biofilmes formados nas placas de aço condicionada parece haver uma tendência de aumento da actividade respiratória que não é tão consistente como nos biofilmes formados em placas de silicone

Os resultados relativos à quantidade de massa de biofilme depositada nas superfícies de adesão condicionadas (Figura 4.13) mostram que, novamente, houve maior acumulação de massa de biofilme em placas de silicone do que em placas de aço inox. O condicionamento das placas de aço conduz à formação de biofilmes cuja massa é maior (para as menores concentrações de BAC usadas no condicionamento) ou similar (para as concentrações de BAC de 0,25 mM e 0,5 mM) à observada no aço não condicionado. Consequentemente, não se pode definir uma tendência clara acerca da acção do pré-condicionamento das placas de aço na acumulação do biofilme. Em relação às placas de silicone, já é mais evidente uma tendência crescente da acumulação de biofilme pois, à medida que se condicionam as placas com concentrações mais elevadas de BAC, a massa de biofilme aderida parece gradualmente aumentar.

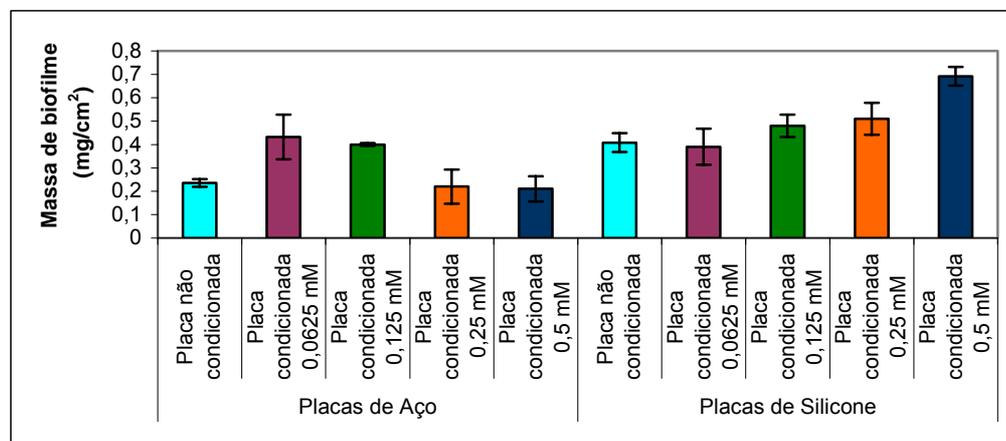


Figura 4.13- Massa de biofilme aderida a placas de aço inox e silicone previamente condicionadas

Com estes resultados (Figura 4.13), pode-se concluir que o condicionamento prévio das placas, quer de aço quer de silicone, parece favorecer a acumulação de biofilme e não prejudicar, como à partida podia ser esperado, já que o BAC é um produto com propriedades surfactantes. Aliás, Meylheuc *et al.* (2001) mostrou que a adsorção prévia de um

biosurfactante a uma superfície de aço inox causou uma redução significativa da adesão da *L. monocytogenes* a essa superfície.

A observação simultânea das Figura 4.12 e Figura 4.13 volta a evidenciar que, tal como verificado nos ensaios sem condicionamento das placas, os biofilmes formados em aço apresentaram actividade respiratória similar e, até, mais elevada à observada nos biofilmes formados sobre o silicone, apesar de possuírem menor massa acumulada.

A observação da estrutura superficial do biofilme formado sobre placas previamente condicionadas com BAC (Figura 4.14) evidencia, novamente, que é sobre o silicone que há maior quantidade de biofilme depositada. A Figura 4.14 mostra, também, que as células bacterianas dos biofilmes formados sobre o silicone condicionado parecem apresentar maior tamanho, e que a matriz polimérica é mais evidente. Conclui-se, então, que o padrão de formação de biofilme, já observado nas placas de aço e silicone não condicionadas (Figura 4.11), não se alterou com o condicionamento das superfícies.

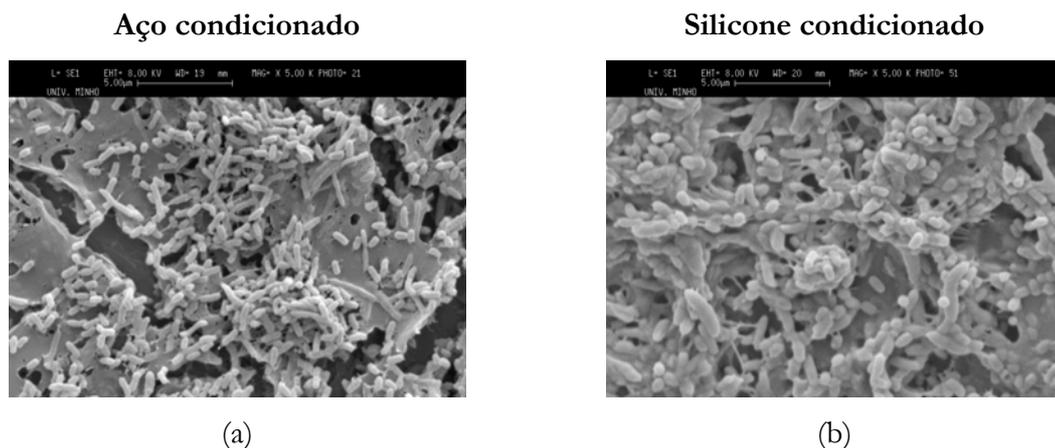


Figura 4.14- Microfotografias de imagens obtidas por SEM da estrutura superficial do biofilme de *P. fluorescens* formado sobre aço inox (a) e silicone (b) condicionados.

#### 4.4.3 Efeito da aplicação de BAC a biofilmes formados em placas de aço inox e silicone previamente condicionadas

Neste ponto são apresentados os resultados obtidos acerca da influência da aplicação de concentrações crescentes de BAC a biofilmes, formados em placas de aço inox e silicone previamente condicionadas com BAC. Para tal, após condicionamento das superfícies de adesão (ponto 3.3.2) e promoção do desenvolvimento do biofilme sobre essas placas, procedeu-se à aplicação de concentrações de BAC, tal como descrito no ponto 3.4.2. Ou seja,

os biofilmes formados nas placas condicionadas foram sujeitos, durante 30 minutos, a concentrações de BAC crescentes (1,96E-3 mM; 0,00391 mM; 0,00781 mM e 0,0625 mM).

Para se visualizar o efeito da aplicação de BAC aos biofilmes bacterianos (formados nas placas condicionadas), construíram-se gráficos da actividade respiratória das bactérias constituídas nesses biofilmes (Figura 4.15), bem como da massa de biofilme acumulada (Figura 4.17), em função da concentração de BAC aplicada, para cada concentração de BAC utilizada no condicionamento das placas (os controlos referem-se ao ensaio da actividade respiratória dos biofilmes sem aplicação posterior de BAC).

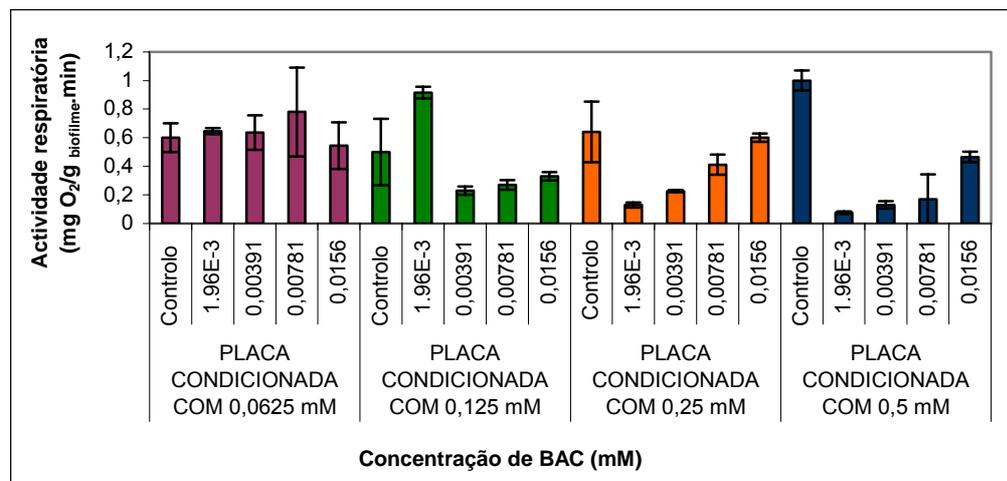


Figura 4.15- Actividade respiratória dos biofilmes formados em placas de aço previamente condicionadas, antes (controlo) e após a aplicação de concentrações crescentes de BAC .

A observação da Figura 4.15 mostra que a aplicação de BAC aos biofilmes formados nas placas de aço condicionadas conduziu a resultados diferentes consoante a concentração de BAC utilizada no condicionamento do aço. Para biofilmes formados em placas de aço inox condicionadas com 0,0625 mM de BAC, a aplicação posterior de BAC aos biofilmes não causou redução da actividade respiratória, pois os valores da actividade dos biofilmes observados após a aplicação das várias concentrações de BAC são muito similares. Já com as placas condicionadas com 0,125 mM, a tendência observada é substancialmente diferente. Com efeito, excepto para a concentração de 1,96E-3 mM, a aplicação de BAC aos biofilmes causou a diminuição da sua actividade respiratória. Quando o aço foi condicionado com 0,25 mM e 0,5 mM, a aplicação de BAC aos biofilmes provocou, em todas as situações, uma redução significativa da actividade respiratória dos biofilmes. Refira-se, no entanto, que essa redução diminui quando a concentração de BAC aplicada aos biofilmes aumenta. De uma

maneira geral, a figura parece indicar haver uma redução mais acentuada da actividade respiratória quando as concentrações de BAC aplicadas são mais baixas ainda que, em nenhuma das situações estudadas se tenha observado a redução total da actividade dos biofilmes. Com a aplicação de concentrações mais elevadas de BAC volta a haver um aumento da actividade dos biofilmes.

Para melhor se visualizar o efeito causada pela aplicação de BAC aos biofilmes formados em placas de aço previamente condicionadas, calculou-se a percentagem de variação da actividade respiratória dos biofilmes, com base nos valores obtidos nos ensaios de controlo (ensaios com placas condicionadas mas sem aplicação posterior de BAC). Estes resultados são apresentados na Tabela 4.12.

Tabela 4.12 - Variação da actividade respiratória de biofilme formado em placas de aço obtida para concentrações crescentes de BAC.

Concentração de BAC de condicionamento (mM)	Variação da actividade respiratória (%)			
	Concentração de BAC aplicada (mM)			
	1,96E-3	0,00391	0,00781	0,0156
<b>0,0625</b>	+7,5	+5,83	+30	-9,2
<b>0,125</b>	+83	-54	-46	-34
<b>0,25</b>	-80	-64,7	-36	-6,25
<b>0,5</b>	-92,39	-87	-83	-53,5

(+) Aumento da Actividade Respiratória      (-) Diminuição da Actividade Respiratória

A observação da Tabela 4.12 reforça que, à medida que aumenta a concentração de BAC utilizada no condicionamento das placas de aço inox, a redução da actividade respiratória dos biofilmes, causada pela aplicação posterior de cada uma das concentrações de BAC, torna-se, de uma maneira geral, mais significativa. Para cada uma das concentrações de BAC aplicadas aos biofilmes, o pré-condicionamento das placas parece induzir a formação de um biofilme mais sensível à acção antimicrobiana do BAC. Novamente, a mesma tabela também mostra que, à excepção da concentração de condicionamento de 0,0625 mM, para as restantes concentrações de BAC usadas no condicionamento das placas de aço, a redução da actividade respiratória dos biofilmes diminui consideravelmente à medida que a concentração de BAC aplicada aos biofilmes aumenta.

Na tentativa de explicação destes resultados, construiu-se, para comparação com a Figura 4.15, a Figura 4.16 que reúne os valores de actividade respiratória observados nos

biofilmes desenvolvidos em placas de aço não condicionadas, face à aplicação de concentrações de BAC iguais às aplicadas aos biofilmes formados nas placas de aço condicionadas.

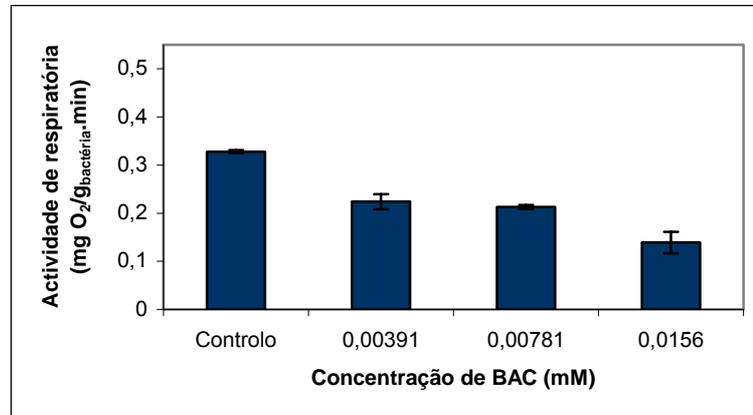


Figura 4.16- Actividade respiratória dos biofilmes formados em placas de aço inox, antes (controlo) e após a aplicação de concentrações crescentes de BAC

Esta figura mostra, tal como já referido anteriormente (sub-secção 4.3.1), que a actividade respiratória dos biofilmes diminui gradualmente com o aumento da concentração de BAC aplicada. Comparando estes resultados com os resultados expressos na Figura 4.15, pode-se inequivocamente afirmar que o condicionamento das superfícies de aço inverte a tendência decrescente da actividade respiratória dos biofilmes em função do aumento da concentração de BAC aplicada. Estes resultados indicam que o condicionamento prévio das placas de aço induz nos biofilmes um comportamento diferente face à agressão antimicrobiana causada pelo BAC. Ou seja, o condicionamento do aço, particularmente quando efectuado com concentrações de BAC mais elevadas, para além de provocar o aumento da actividade respiratória dos biofilmes, parece também fomentar nos biofilmes um aumento da resistência destes ao tratamento posterior com o surfactante, resistência essa que se torna mais evidente quando altas concentrações de BAC são aplicadas aos biofilmes. Estudos realizados sobre a resistência de bactérias a surfactantes catiónicos (Akimitsu, *et al.*, 1999; Mereguetti, *et al.*, 1999; Sakagami *et al.*; 1989) como o cloreto de benzalcónio já foi observado, e sugeriram que o aumento dos componentes das membranas celulares, como os fosfolípidos, ácidos gordos, suprimem a adsorção de moléculas de cloreto de benzalcónio para as células.

Os resultados referentes à massa de biofilme formado em placas de aço previamente condicionadas, antes (controlo) e após a aplicação de concentrações crescentes de BAC estão resumidos na Figura 4.17.

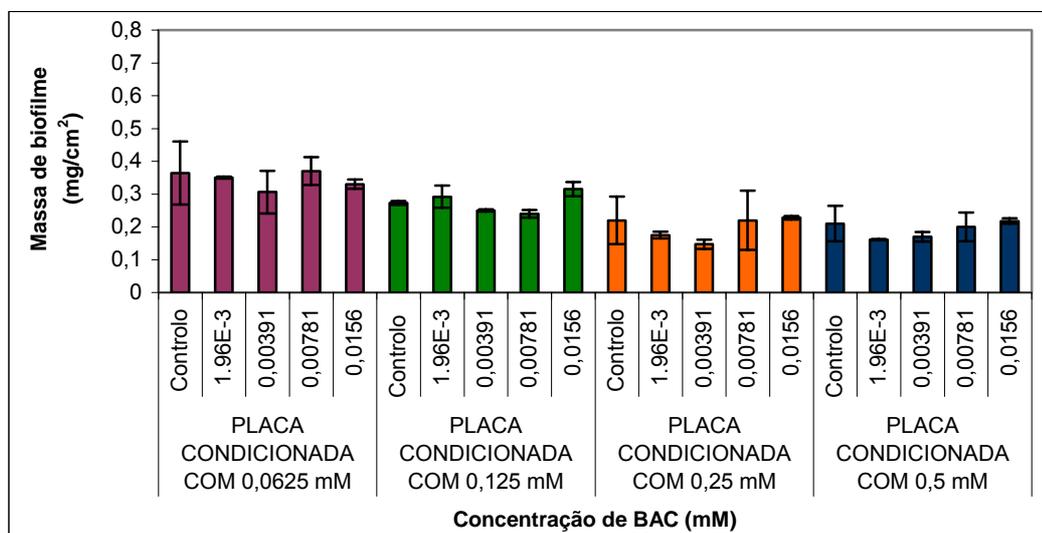


Figura 4.17- Massa de biofilme formada, em placas de aço previamente condicionadas, antes (controlo) e após a aplicação de concentrações crescentes de BAC

A Figura 4.17, evidencia que, existe uma maior quantidade da massa de biofilme formado em placas condicionadas com 0,0625 mM e 0,125 mM do que quando formado sobre as placas condicionadas com 0,25 mM e 0,5 mM. A figura mostra, também, que a aplicação posterior de concentrações crescentes de surfactante, não parece causar nenhuma variação significativa na quantidade de massa de biofilme formado nas placas condicionadas. Esta ineficácia do BAC na remoção de biofilme já tinha sido detectada nos ensaios realizados com o aço não condicionado (Figura 4.9-a).

As constatações acima referidas, são reforçadas pela Tabela 4.13 que reúne, em percentagem, a variação de massa observada nos biofilmes após a aplicação do BAC calculada com base na biomassa quantificada no teste de controlo.

Tabela 4.13 - Variação da quantidade de biofilme, formado em placas de aço condicionadas, obtida em resultado da aplicação de concentrações crescentes de BAC

Concentração de BAC de condicionamento (mM)	Variação da a massa de biofilme (%)			
	Concentração de BAC aplicada (mM)			
	1,96E-3	0,00391	0,00781	0,0156
0,0625	-3,85	-15,9	+1,65	-9,34
0,125	+7	-8,4	-12,1	+15,4
0,25	-20,45	-33,2	0	+3,64
0,5	-23,3	-19	-4,8	+3,8

(+) Aumento da massa de biofilme (-) Diminuição da massa de biofilme

A observação da Tabela 4.13 evidencia que, à medida que aumenta a concentração de BAC utilizada no condicionamento das placas de aço inox, a redução da massa de biofilme, de um modo geral, parece aumentar. Quando o BAC é aplicado posteriormente aos biofilmes, a variação da quantidade de massa de biofilme parece ser insignificante.

O estudo realizado com biofilmes formados em placas de aço condicionadas foi repetido mas utilizando-se, desta vez, placas de silicone condicionadas como superfície de adesão e formação dos biofilmes. Os resultados obtidos da actividade respiratória e formação de massa são apresentados respectivamente nas Figura 4.18 e Figura 4.20.

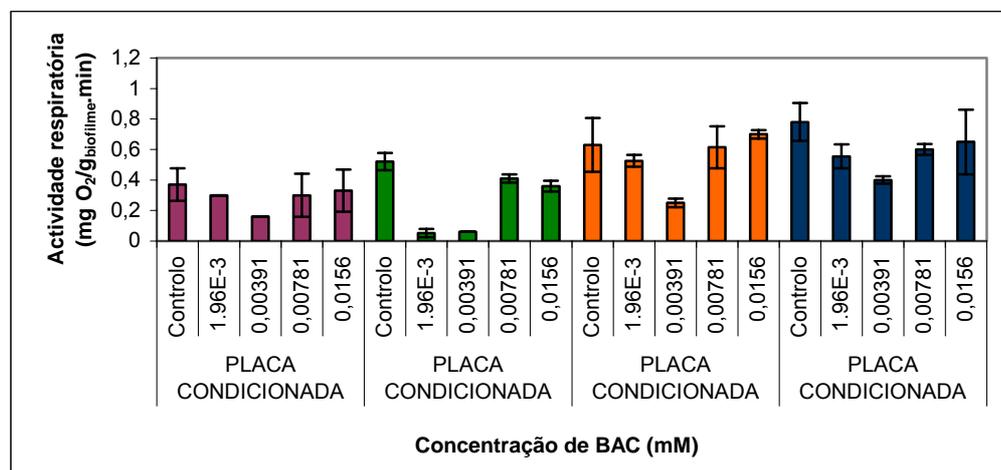


Figura 4.18- Actividade respiratória dos biofilmes formados em placas de silicone previamente condicionadas, antes (controlo) e após a aplicação de concentrações crescentes de BAC .

A Figura 4.18 mostra claramente que o condicionamento das placas de silicone aumenta a actividade bacteriana. Esta constatação já tinha sido evidente na Figura 4.12. A

aplicação de concentrações crescentes de BAC aos biofilmes formados nas placas de silicone condicionadas conduziram a resultados diferentes consoante a concentração de BAC utilizada previamente no condicionamento do silicone. De uma maneira geral, para cada concentração de BAC usada no condicionamento é notório, mais uma vez, que só ocorre redução da actividade respiratória ou esta é mais significativa, para as menores concentrações de BAC aplicadas no tratamento ( $1,96E-3$  mM e  $0,00391$  mM). Com as maiores concentrações de BAC aplicadas no tratamento dos biofilmes ( $0,00781$  mM e  $0,0156$  mM), o decréscimo de actividade respiratória observado é menos acentuado que o observado com as menores concentrações. Refira-se, até, que para estas concentrações de BAC a redução da actividade respiratória atenua-se ou, até, é mesmo inexistente. Parece que o condicionamento desenvolve nos biofilmes uma certa insensibilidade ao BAC, insensibilidade esta mais significativa quando são aplicadas concentrações mais elevadas de BAC. A este facto não deve ser alheio o facto do condicionamento ter sido feito com concentrações de BAC mais elevadas do que as usadas no tratamento posterior.

Para melhor se visualizar o efeito causada pela aplicação de BAC aos biofilmes formados em placas de silicone previamente condicionadas, calculou-se a percentagem de variação da actividade respiratória dos biofilmes, com base nos valores obtidos no ensaio de controlo. Estes resultados são apresentados na Tabela 4.14.

Tabela 4.14 - Variação da actividade respiratória de biofilme formado em placas de silicone obtida para concentrações crescentes de BAC.

Concentração de BAC de condicionamento (mM)	Variação da actividade respiratória (%)			
	Concentração de BAC aplicada (mM)			
	1,96E-3	0,00391	0,00781	0,0156
0,0625	-18,9	-56,8	-18,9	-10,8
0,125	-89,8	-88,5	-21,15	-30,8
0,25	-16,7	-60,3	-2,4	+11,1
0,5	-28,8	-48,7	-23,1	-16,7

(+) Aumento da actividade do biofilme      (-) Diminuição da actividade do biofilme

A observação da Tabela 4.14 evidencia que, para cada concentração de BAC usada no tratamento, o aumento da concentração de BAC usada no condicionamento não parece causar diferenças muito acentuadas. Pode-se até dizer que, à excepção de 89,8 % e 88,5 %, as percentagens de redução da actividade bacteriana são, de uma maneira geral, de ordem de

grandeza similar (contrariamente ao que acontece com os biofilmes formados em placas de aço inox).

Na tentativa da explicação destes resultados, construiu-se, para comparação com a Figura 4.18, a Figura 4.19 que reúne os valores de actividade respiratória obtidos para os biofilmes desenvolvidos em placas de silicone não condicionadas, face à aplicação de concentrações de BAC iguais às aplicadas aos biofilmes formados nas placas de silicone condicionadas.

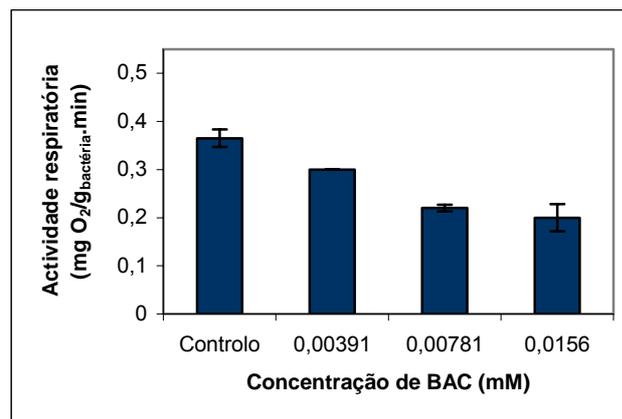


Figura 4.19- Actividade respiratória dos biofilmes formados em placas de silicone não condicionadas, antes (controlo) e após a aplicação de concentrações crescentes de BAC

A Figura 4.19 mostra que o aumento da concentração de BAC usada no tratamento dos biofilmes formados em silicone não condicionado provoca redução gradual da actividade respiratória. Comparando estes resultados com os resultados expressos na Figura 4.18, pode-se afirmar que o condicionamento das superfícies de silicone interfere com a acção antimicrobiana do BAC, quando este é posteriormente utilizado no tratamento dos biofilmes, pois a redução da actividade deixa de ser consistente. De facto, as reduções de actividade mais significativas são obtidas só para as menores concentrações de BAC de tratamento. Para as concentrações mais elevadas a redução da actividade é pouco significativa ou mesmo inexistente. Estes resultados indicam que o condicionamento prévio das placas de silicone induz nos biofilmes um comportamento diferente face à agressão antimicrobiana causada pelo BAC. Ou seja, o condicionamento do silicone, particularmente quando efectuado com concentrações de BAC mais elevadas, para além de provocar o aumento da actividade respiratória dos biofilmes, parece fomentar nos biofilmes um aumento da resistência destes ao tratamento com BAC, resistência essa que se torna mais evidente quando altas concentrações de BAC são aplicadas aos biofilmes.

Os resultados referentes à massa de biofilme formado em placas de silicone estão resumidos na Figura 4.20.

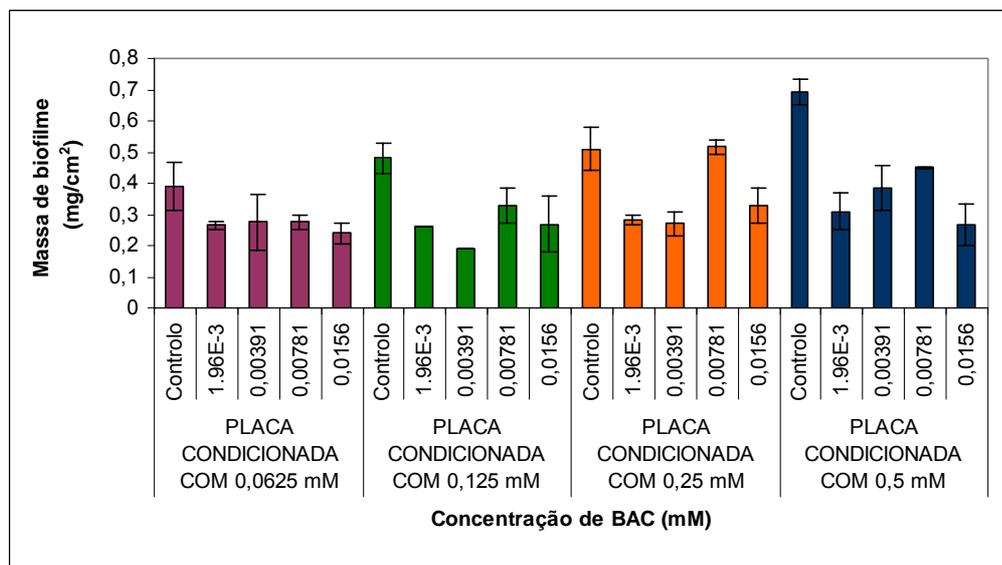


Figura 4.20- Massa de biofilme formada, em placas de silicone previamente condicionadas, antes (controlo) e após a aplicação de concentrações crescentes de BAC

Esta figura mostra que o condicionamento das placas de silicone aumenta a massa de biofilme acumulada. No entanto, esse mesmo condicionamento torna os biofilmes mais sensíveis à posterior aplicação do BAC, já que a aplicação do surfactante causa uma redução da biomassa aderida, redução essa, no entanto, independente da concentração de BAC aplicada.

Para melhor se visualizar o efeito causado pela aplicação de BAC aos biofilmes formados em placas de silicone previamente condicionadas, calculou-se a percentagem de variação da quantidade da massa de biofilme, com base nos valores obtidos no teste de controlo. Estes resultados são apresentados na Tabela 4.15.

Tabela 4.15 - Redução da quantidade da massa de biofilme formado em placas de silicone obtida para concentrações crescentes de BAC.

Concentração de BAC de condicionamento (mM)	Redução da massa de biofilme (%)			
	Concentração de BAC aplicada (mM)			
	1,96E-3	0,00391	0,00781	0,0156
0,0625	32	29,12	29,23	38,5
0,125	45,83	60	31,7	44,2
0,25	44,7	47	2	35,7
0,5	55,2	44,5	35	61,6

A Tabela 4.15 confirma que, para cada concentração de BAC usada no tratamento dos biofilmes, o aumento da concentração de BAC de condicionamento provoca, de uma maneira geral, o aumento da quantidade de biomassa removida da superfície do silicone. No entanto, para cada concentração de BAC de condicionamento, o aumento da concentração de BAC utilizada no tratamento dos biofilmes não parece induzir maior remoção de biomassa.

Na tentativa de explicar estes resultados, e para comparação com a Figura 4.20, construiu-se a Figura 4.21 que reúne os valores de biomassa obtidos, para os biofilmes desenvolvidos em placas de silicone não condicionadas, face à aplicação de concentrações de BAC iguais às aplicadas aos biofilmes formados no silicone condicionado.

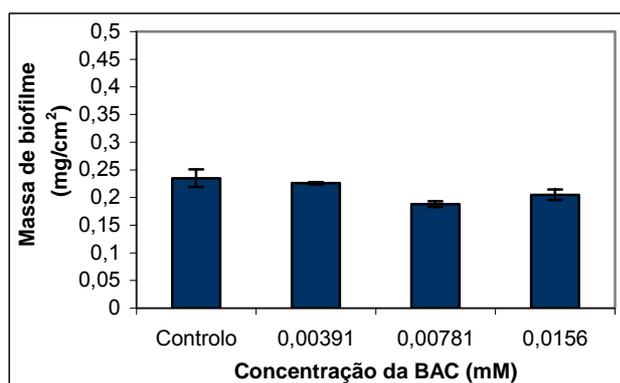


Figura 4.21- Massa de biofilme formada, em placas de silicone não condicionadas, antes (controlo) e após a aplicação de concentrações crescentes de BAC

A Figura 4.21 mostra que os biofilmes formados sobre silicone não condicionado parecem não sofrer perda de biomassa em resultado da aplicação de BAC, contrariamente ao observado com os biofilmes formados em silicone previamente condicionado (Figura 4.20).

Os resultados apresentados nesta sub-secção indicam que a aplicação de BAC a biofilmes de *P. fluorescens* formados em placas de aço e em placas de silicone, previamente condicionadas com o mesmo surfactante, interfere com a actividade respiratória das bactérias dos biofilmes, mas não com a quantidade de massa de biofilme acumulado nas placas. Sendo assim, no sentido de se investigar a possível existência de alterações morfológicas do biofilme que apoiem os resultados obtidos, a estrutura superficial desses biofilmes foi observada por SEM. A Figura 4.22 apresenta algumas microfotografias de biofilmes desenvolvidos em placas previamente condicionadas com 0,0625 mM de BAC.

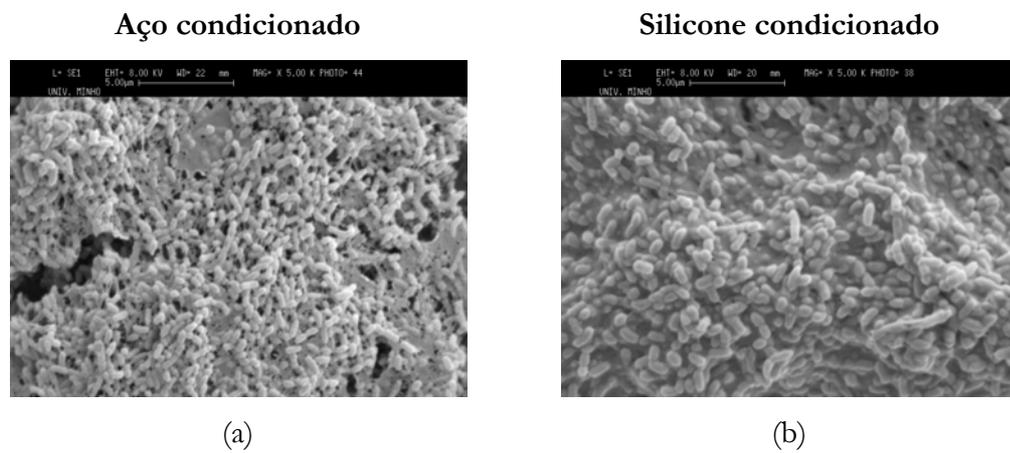


Figura 4.22- Microfotografias de imagens obtidas por SEM da estrutura superficial do biofilme de *P. fluorescens* formado sobre aço inox (a) e do silicone (b) condicionado, após a aplicação de 0,0625 mM de BAC

Por comparação com a Figura 4.15 e Figura 4.22 parece mostrar que após tratamento com 0,0625 mM de BAC, a estrutura superficial dos biofilmes formados sobre as placas condicionadas parece alterar-se, pois parece haver mais biomassa aderida, quer sobre as placas de aço, quer sobre as placas de silicone. A matriz polimérica continua a ser mais evidente nos biofilmes formados sobre o silicone, ainda que comece também a denotar-se nos biofilmes formados no aço condicionado após tratamento com BAC. É notório, mais uma vez, que as células constituídas nos biofilmes formados sobre o aço são menores do que as desenvolvidas nos biofilmes sobre o silicone. Estas observações estão de acordo com os resultados, apresentados na Figura 4.13, relativos à variação da quantidade de massa de biofilme decorrente do condicionamento das superfícies de adesão.

Os resultados constantes nesta sub-secção indiciam que o pré-condicionamento com BAC das superfícies usadas para a formação de biofilme induz uma menor sensibilidade desses biofilmes, quando após 5 dias de formação, são sujeitos ao tratamento com

surfactante. Na fase inicial de adesão, o pré-contacto das células com BAC, adsorvido nas superfícies de adesão em consequência do condicionamento, parece desencadear nelas mecanismos de protecção que se vão manifestar quando o biofilme está desenvolvido e está a ser sujeito a tratamento com o BAC. Estes mecanismos manifestam-se pelo aumento do metabolismo exógeno (aumento da actividade respiratória) e pela diminuição da sensibilidade à agressão do BAC. Estes comportamentos são mais evidentes quando a concentração de BAC usada no tratamento dos biofilmes se aproxima da ordem de grandeza das concentrações de BAC usadas no condicionamento das superfícies. Parece que, em consequência do condicionamento, as bactérias ficam “sinalizadas” para concentrações de BAC elevadas, só manifestando resistência mais evidente quando a concentração de BAC usada no tratamento aumenta.

Pode-se então sugerir, face aos resultados obtidos, que o pré-contacto das *P. fluorescens* com o BAC, durante a primeira fase de formação de biofilme, induz nas bactérias uma resistência à agressão tóxica do BAC. Esta forma de resistência pode ser, essencialmente, de dois tipos: intrínseca ou adquirida (Heinzel, 1998; Russel, 1995; Tabata *et al.*, 2003; Tattawasart *et al.*, 2000). A resistência intrínseca é uma propriedade natural dos microrganismos ou então é uma propriedade resultante de uma adaptação fisiológica destes. A resistência adquirida surge em resultado da alteração genética ou da mutação dos microrganismos. No presente estudo, nada se pode concluir quanto ao tipo de resistência que está na base dos resultados obtidos. Seria necessário fazer estudos de proteómica afim de indagar se as bactérias sofreram alterações fenotípicas e/ou genotípicas ou, então, simples alterações morfológicas. No entanto, independentemente do tipo, o desenvolvimento de resistência por parte das bactérias representa já, por si, uma dificuldade acrescida no controlo dos biofilmes em ambiente real, podendo até ser um factor bastante problemático, pois estes microrganismos resistentes aos surfactantes poderão ser mais difíceis de inactivar com outros agentes antimicrobianos (Loughlin *et al.*, 2002; Tabata *et al.*, 2003; Tattawasart *et al.*, 1999).

#### 4.4.4 Caracterização bioquímica dos biofilmes

No decorrer do trabalho experimental, alguns dos resultados obtidos levantaram a possibilidade da existência de diferenças na composição bioquímica dos biofilmes formados em aço e silicone, com e sem condicionamento. Nessa perspectiva, foram desenvolvidos biofilmes sobre placas de aço e silicone (de acordo com o ponto 3.4.2) para se proceder à sua caracterização em termos do seu teor em proteínas e polissacarídeos. Para a quantificação das

proteínas (extra e intracelulares) e dos polissacarídeos (extra e intracelulares) submeteram-se, previamente, os biofilmes a um processo de extracção da matriz polimérica, de acordo com o ponto 3.5.4. Do processo de extracção resultaram duas fracções, a fracção celular e a fracção extracelular correspondente à matriz polimérica. Posteriormente, foi quantificado o conteúdo em proteínas e polissacarídeos das duas fracções. Os valores obtidos estão reunidos na Tabela 4.17.

A título de exemplo, na Tabela 4.16, estão reunidas algumas características dos biofilmes, formados sobre o aço e o silicone, que voltam a indicar que o comportamento dos biofilmes é alterado consoante a superfície onde foram desenvolvidos. Verifica-se que a massa de biofilme formado sobre as placas de aço inox é sempre menor que a observada no silicone, e que o condicionamento das superfícies parece só alterar a massa de biofilme acumulada na superfície metálica. Quanto à actividade respiratória, os biofilmes formados sobre o silicone apresentam valores similares independentemente da superfície estar ou não condicionada com o surfactante. Em relação ao aço inox, o condicionamento deste induz um aumento significativo da actividade respiratória dos biofilmes.

Tabela 4.16 – Valores da actividade respiratória e de massa acumulada de biofilmes formados em diferentes suportes de adesão (aço inox e silicone)

Suporte de adesão	Condicionamento com 0,0625 mM de BAC	Massa de biofilme (mg/cm <sup>2</sup> )	Actividade respiratória (mg O <sub>2</sub> /g <sub>biofilme</sub> ·min)
<b>Aço</b>	<b>Não</b>	0,235±0,016	0,328±0,003
	<b>Sim</b>	0,364±0,096	0,60±0,100
<b>Silicone</b>	<b>Não</b>	0,408±0,041	0,365±0,183
	<b>Sim</b>	0,390±0,078	0,370±0,106

Verifica-se que a massa de biofilme formado sobre as placas de aço inox é sempre menor que a observada no silicone, e que o condicionamento das superfícies parece só alterar a massa de biofilme acumulada na superfície metálica. Quanto à actividade respiratória, os biofilmes formados sobre o silicone apresentam valores similares independentemente da superfície estar ou não condicionada com o surfactante. Em relação ao aço inox, o condicionamento deste induz um aumento significativo da actividade respiratória dos biofilmes.

Tabela 4.17 - Composição bioquímica de biofilmes formados nas diferentes superfícies de adesão (aço e silicone)

Suporte de adesão	Condicionamento com 0,0625 mM de BAC	Proteínas (mg/cm <sup>2</sup> )		Polissacarídeos (mg/cm <sup>2</sup> )	
		Intracelular	Extracelular	Intracelular	Extracelular
Aço	Não	0,166±0,016	0,350±0,017	0,077±0,02	0,111±0,03
	Sim	0,044±0,001	0,264±0,002	0,050±0,01	0,071±0,002
Silicone	Não	0,093±0,012	0,167±0,005	0,050±0,007	0,050±0,007
	Sim	0,160±0,009	0,087±0,009	0,051±0,002	0,049±0,008

A análise da Tabela 4.17 revela que os biofilmes formados sobre o aço inox apresentam características distintas consoante as placas de adesão estão ou não condicionadas com o surfactante. O teor em proteínas totais e polissacarídeos totais diminui quando os biofilmes se formam sobre o aço condicionado. Esta constatação não corrobora a maior quantidade de massa de biofilme observada sobre o aço condicionado (Tabela 4.16).

A Tabela 4.17 mostra, também, que o teor em proteínas intracelulares decresce significativamente nos biofilmes formados sobre o aço pré-tratado com BAC. Se se assumir que as proteínas intracelulares são indicadoras da quantidade de células presente nos biofilmes, uma nova discrepância parece surgir nos resultados obtidos, pois os biofilmes formados sobre o aço condicionado apresentam maior actividade respiratória apesar de possuírem menor quantidade de bactérias. Com base nesta constatação pode-se deduzir que as bactérias constituintes dos biofilmes formados sobre o aço condicionado são metabolicamente mais activas.

Em relação aos biofilmes formados sobre o silicone, a Tabela 4.17 mostra que não parece haver alteração do conteúdo em proteínas totais e polissacarídeos totais com o condicionamento das superfícies. No entanto, em relação ao teor em proteínas, o condicionamento parece aumentar a fracção intracelular e diminuir a fracção extracelular. Esta constatação parece indicar que os biofilmes formados sobre o silicone possuem mais bactérias. No entanto, a actividade respiratória observada nestes biofilmes é semelhante à observada nos biofilmes formados no silicone condicionado, o que leva a supor que as bactérias *P. fluorescens* integrantes dos biofilmes formados sobre o silicone condicionado são metabolicamente menos activas.

Comparando a composição bioquímica dos biofilmes formados sobre o silicone e sobre o aço, pode-se referir que, quando as superfícies não estão condicionadas, os biofilmes formados sobre o aço englobariam mais bactérias, pois o teor em proteínas intracelulares, é superior, e apresentariam uma matriz mais evidente, pois o teor em polissacarídeos e proteínas extracelulares, também, é superior. Ambos os biofilmes apresentam, contudo, actividades respiratórias semelhantes. Com o condicionamento das superfícies, a tendência descrita é mantida, ou seja, o teor em proteínas intracelulares é superior nos biofilmes formados sobre o silicone, apesar do teor em polissacarídeos e proteínas extracelulares continuar a ser inferior ao observado nos biofilmes formados sobre o aço.

A informação dada pela composição bioquímica dos biofilmes não apoia, na totalidade, as observações microscópicas obtidas por SEM (Figura 4.11 e Figura 4.14). De facto, a interpretação dos dados relativos à composição bioquímica diria que os biofilmes formados sobre o aço teriam mais células e matriz mais evidente do que os biofilmes formados no silicone. No entanto, a Figura 4.11 evidencia que são os biofilmes formados no silicone que apresentam uma matriz mais bem definida, apesar de parecer que integram menor quantidade de células. Com o condicionamento das superfícies, as características bioquímicas dos biofilmes já se aproximam mais da informação dada pelas imagens da Figura 4.14, pois os biofilmes formados sobre o aço parecem possuir uma menor quantidade de células e uma matriz polimérica muito pouco evidente. Contrariamente, os biofilmes formados sobre o silicone, parecem integrar mais células e possuir uma matriz mais consistente, o que está de acordo com a informação extraída da composição bioquímica destes biofilmes.

Em jeito de conclusão, pode-se referir que os resultados relativos à composição bioquímica dos biofilmes não foram muito clarificadores acerca do efeito do tipo de material de adesão na composição dos biofilmes, bem como, acerca do efeito causado pelo condicionamento com o surfactante. A não concordância de alguns resultados sugere que estudos mais aprofundados devam ser realizados.

#### **4.4.5 Determinação da estabilidade física dos biofilmes após tratamento com cloreto de benzalcónio**

Neste ensaio pretendeu-se conhecer o comportamento dos biofilme de *P. fluorescens*, antes e após tratamento com BAC, face a alterações hidrodinâmica do meio circundante.

Para tal, promoveu-se o desenvolvimento de biofilmes em cilindros de aço inox fixos num dispositivo giratório, cilindros estes introduzidos num reactor biológico (ponto 3.4.3).

Após o desenvolvimento dos biofilmes sobre os cilindros, estes foram tratados com BAC e, seguidamente, sujeitos ao aumento da velocidade de rotação dos cilindros (isto é, 500, 1000 e 2000 rpm). Com a alteração da velocidade de rotação dos cilindros pretendeu-se alterar as condições hidrodinâmica existentes dentro do reactor.

O efeito do aumento da velocidade de rotação nos biofilmes, sem e com diferentes concentrações de BAC (0,125 mM; 0,25 mM; 0,5 mM; 0,9 mM), durante, 30 min foi avaliado pela quantificação da perda de massa de biofilme. Os resultados são apresentados em termos de percentagem de remoção de biofilmes (Figura 4.23)

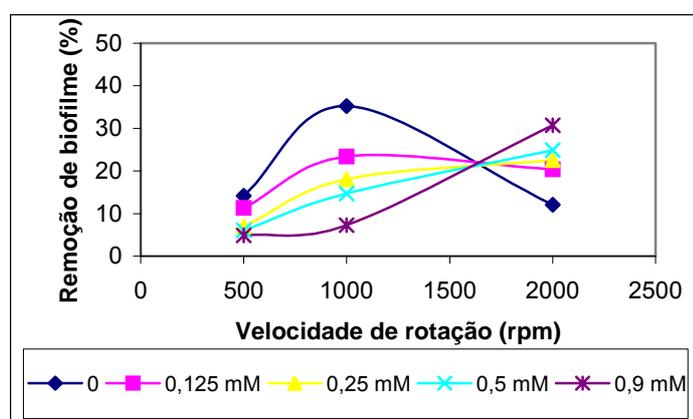


Figura 4.23- Remoção de biofilme causada pela submissão do biofilme a diferentes velocidades de rotação, antes (Concentração "0") e após ser tratado com várias concentrações de BAC.

A Figura 4.23 mostra que a variação da velocidades de rotação provoca, por si só, remoção do biofilme desenvolvido sobre o cilindro e não sujeito com tratamento com BAC (ensaio de controlo). Note-se, no entanto, que quando a velocidade de implementada (500 rpm) foi próxima da velocidade de rotação à qual os biofilmes se formaram, a remoção de biomassa foi relativamente baixa. Só quando se duplicou o valor da velocidade (1000 rpm) é que a remoção do biofilme ocorreu de forma mais significativa. Com 2000 rpm (dobro da velocidade para a qual ocorreu libertação de biofilme), a remoção de biofilme volta a ser pouco significativa. Refira-se, porém, que o biofilme sujeito à velocidade de 2000 rpm correspondia ao biofilme das camadas mais internas, ou seja, o biofilme mais fortemente aderido à superfície do cilindro.

Após tratamento com o BAC, os biofilmes parecem ter aumentado a sua estabilidade pois a remoção de massa conseguida são inferiores à observada com biofilmes não sujeitos à acção do BAC. De facto, com a implementação das menores velocidades de rotação (500 rpm) a remoção conseguida é visivelmente inferior à registada com o biofilme sem

tratamento. Com a implementação da velocidade superior (2000 rpm) a remoção de massa dos biofilmes tratados com BAC já é mais significativa e, até, superior à observada com o biofilme não tratado. No entanto, a remoção de biofilme é equivalente ( $P > 0,10$ ), para a mesma velocidade de rotação, quando se comparam as diferentes concentrações de BAC testadas. A concentração de 0,9 mM de BAC foi a exceção pois foi a essa velocidade onde foram observadas maiores diferenças ( $P < 0,05$ ) na remoção de biofilme em resultado da implementação das diferentes velocidades de rotação.

A observação da Figura 4.23 mostra também que, para a menor velocidade de rotação, o aumento da concentração de BAC promove um decréscimo na remoção de biofilme. Parece que o surfactante tem um efeito de “fixação” do biofilme aos cilindros de aço inox, pois quanto maior é a concentração de BAC mais biofilme fica aderido.

Os resultados sugerem que, depois da aplicação do BAC, os biofilmes podem ficar parcialmente ou totalmente inativados (de acordo com resultados da sub-secção 4.3.1) mas ficarem aderidos às superfícies, o que não é desejável para os sistemas industriais onde a acumulação de biofilme persistente é um problema. Nesta situação deve-se promover a remoção do biofilme combinando métodos químicos com os métodos físicos.

Os resultados obtidos neste estudo, também, revelaram que um sucessivo aumento da velocidade de rotação não promove a remoção total de biofilme da superfície dos cilindros, quer os biofilmes estejam ou não tratados com surfactante. Os biofilmes de *P. fluorescens* formados sobre os cilindros, mesmo sem tratamento com BAC, apresentam já uma estabilidade mecânica considerável. Essa estabilidade ainda aumentou quando os biofilmes foram tratados com o BAC. Estes resultados mostram que após tratamento com BAC e com o aumento da concentração deste não houve remoção total do biofilme das superfícies em consequência da variação das forças hidrodinâmicas. Pode-se, portanto, reforçar que o BAC é mais eficiente na inativação de biofilmes do que remoção deste das superfícies, mesmo com a alteração das forças de corte resultantes da variação significativa da velocidade de rotação.

Estas constatações vão de encontro aos resultados de remoção de massa observados na sub-secção 4.3.1, onde se concluiu que o BAC tem uma capacidade reduzida de remoção de massa das superfícies.

O BAC tem uma qualquer acção que provoca uma maior resistência mecânica do biofilme ao seu desprendimento, ou seja, o BAC parece “fixar” o biofilme à superfície do cilindro.

## **5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES DE TRABALHO**

---

Neste capítulo apresentam-se as conclusões obtidas no âmbito do trabalho experimental. Mencionam-se ainda sugestões para futuros trabalhos.

---

A presente dissertação centrou-se na avaliação do efeito antimicrobiano do surfactante cloreto de benzalcónio (BAC) na actividade respiratória e no conteúdo em ATP de suspensões bacterianas e na actividade respiratória e quantidade de massa de biofilmes de *Pseudomonas fluorescens*. Os biofilmes foram desenvolvidos em superfícies de aço inox e silicone (sujeitas ou não a condicionamento com o mesmo surfactante). O efeito do surfactante foi estudado em função da concentração, do tempo de contacto das bactérias e biofilmes com o surfactante e da presença de uma substância potencialmente interferente, a BSA.

Em resumo, as principais conclusões, resultantes do trabalho experimental realizado no domínio desta dissertação, são as seguintes:

- O aumento da concentração de BAC aplicada à suspensão bacteriana provocou o aumento da redução da actividade respiratória das *P. fluorescens* verificando-se a ausência total (redução completa) da actividade respiratória para elevados valores de surfactante (MBC= 0,125 mM).
- A presença de substâncias orgânicas, BSA, na suspensão bacteriana, influencia a acção antimicrobiana do surfactante, pois doses superiores de BAC (MBC= 1 mM) são necessárias para inactivar as bactérias.
- A aplicação de BAC provocou uma redução da actividade respiratória das bactérias incluídas nos biofilmes, quer estes se tenham formado sobre superfícies de aço inox, quer sobre superfícies de silicone. A redução da actividade dos biofilmes tornou-se mais significativa com o aumento da concentração do surfactante.
- Foi necessário uma concentração de BAC consideravelmente mais elevada para a inactivação dos biofilmes formados sobre as placas de aço inox (BIC= 0,25 mM) do que os formados sobre o silicone (BIC=0,0625 mM).
- Foi necessária uma maior concentração de BAC para inactivar as células dos biofilmes formados em placas de aço do que as células em suspensão. Em silicone, as células dos biofilmes estavam mais sensíveis à acção tóxica do BAC, pois foi necessário uma menor concentração de BAC para as inactivar, em relação à usada para inactivar as células em suspensão.

- O BAC não é eficiente em termos de remoção de massa de biofilme formado nas superfícies de aço e silicone, tendo sido, no entanto, observada uma maior redução da massa dos biofilmes formados sobre o silicone.
- Nas placas de silicone há maior acumulação de massa de biofilme, mas este é mais facilmente removido e inativado.
- O silicone apresentou uma hidrofobicidade maior, assim como, uma energia livre de adesão, o que explica em parte a maior acumulação de massa às superfícies.
- O uso de surfactante no condicionamento das placas, quer de aço inox, quer de silicone, causou um aumento evidente na actividade respiratória dos biofilmes posteriormente formados sobre essas superfícies.
- O condicionamento das placas causou uma maior acumulação de biomassa nas placas de silicone do que em placas de aço inox.
- O condicionamento das placas de aço, quando efectuado com as maiores concentrações de BAC, provocou o aumento da actividade respiratória dos biofilmes, o que pareceu induzir resistência destes ao tratamento posterior com o surfactante.
- O aumento da concentração de BAC utilizada no condicionamento das placas de aço causou, de um modo geral, um aumento da massa de biofilme mas a aplicação posterior de surfactante, não pareceu causar nenhuma variação significativa. na quantidade de massa de biofilme aderida.
- O condicionamento das placas de silicone, para além de provocar o aumento da actividade respiratória dos biofilmes, parece induzir nestes um aumento da resistência destes ao tratamento com BAC.
- Com o aumento da concentração de BAC utilizada no condicionamento das placas de silicone e com concentrações crescentes de BAC usadas no tratamento dos biofilmes ocorreu, de uma maneira geral, um aumento da remoção de biomassa. Mas, para cada concentração de BAC de condicionamento, o aumento da concentração de BAC utilizada no tratamento dos biofilmes não parece induzir maior remoção de biomassa.
- Nos ensaios de determinação da estabilidade física dos biofilmes, o aumento da concentração de BAC usada no tratamento dos biofilmes traduziu-se num aumento da estabilidade mecânica destes face a alteração da velocidade de rotação.

- O BAC é mais eficiente na inactivação do que na remoção dos biofilmes das superfícies, o que não é desejável pois acumulação e persistência em superfícies compromete os procedimentos de limpeza e desinfecção. Esta situação é geradora de problemas graves bem como de acrescidos custos económicos.

De seguida, são apresentadas mais algumas sugestões, cuja concretização exigiria bastante mais trabalho, pelo que poderão constituir, na sua essência, possíveis tópicos para futuros trabalhos de investigação, a concretizar mais a longo prazo.

- Investigar e caracterizar as formas de resistência adoptadas pelos microorganismos quando constituídos em biofilme, face à aplicação do surfactante.
- Alargar o estudo a outros surfactantes, preferencialmente, surfactantes aceitáveis do ponto de vista ambiental.
- Testar novas estratégias de aplicação deste surfactante a biofilmes, no que se refere ao tempo de duração de contacto com as *Pseudomonas fluorescens*.
- Testar novas estratégias de controlo de biofilmes baseada na combinação de mais do que um agente antimicrobiano, como por exemplo: enzimas-surfactantes.

## **6 BIBLIOGRAFIA**

---

Neste capítulo apresentam-se as referências bibliográficas dos artigos e livros consultados para a escrita desta dissertação.

---

- Absolom, D. R.; Lamberti, F. V.; Policova, Z.; Zingg, W.; van Oss, C. J.; Neumann, W. (1983) *Surface thermodynamics of bacterial adhesion*. Applied and Environmental Microbiology, 46, 90-97
- Akimitsu, N.; Hamamoto, H.; Inoue, R.; *et al.* (1999) *Increase in resistance os methicillin resistant Staphylococcus aureus to  $\beta$ -lactams caused by mutations conferring resistance to benzalkonium chlotide, a disinfectant widely udes in hospital*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 43, 3042-3043
- Allison, D. G. (2003) *The Biofilm Matrix*. Biofouling. The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research. 19, 139-150
- Apha, Awwa, WPCF (1989) *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 17<sup>th</sup> edition. Clesceri, L.S., Greenberg, A.E. e Trussel, R.R. eds. American Public Health Association. Washington DC. USA.
- Azeredo, J. C. (1998) Dissertação de Doutoramento: *Adesão de microrganismos e composição da matriz de bioagregados - Desenvolvimento de técnicas e estudo da influência de exopolímeros*. Universidade do Minho. Braga. Portugal.
- Azeredo, J.; Oliveira, R. (2000) *The role of exopolymers produced by Sphingomonas paucimobilis in biofilm formation and composition*. Biofouling. 16, 17-27
- Belo, I. (1995) *Tratamento de dados experimentais*. Universidade do Minho. Engenharia Biológica.
- Bott, T. R. (1993) *Aspects of biofilme formation and destruction*. Corrosion Reviews. 11, 1-24
- Bott, T. R. (1995) *Fouling of Heat Echargers*. Amsterdam. Netherlands: Elsevier Science B. V.
- Boulangue-Petermann, L.; Jullien, C.; Dubois, P. E.; Benezech, T.; Faille, C. (2004) *Influence of surface chemistry on the hygienic status of industrial stainless steel*. Biofouling. 20, 25-33
- Bown, M. R. W.; Gilbert, P. (1993) *Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents*. J. Appl. Bacteriol. S74, 87-97

- Boyd, A., Chakrabarty, A. M. (1994) *Role of alginate lyase in cell detachment of Pseudomonas aeruginosa*. J. Appl. Environ. Microbiol. 60, 2355-2359
- Busscher, H. J. (1984) *Surface free energies and the adhesion of oral bacteria*. PhD Thesis, Universidade de Groningen. Holanda
- Campanac, C.; Pineau, L.; Payard, A.; Baziard-Mouysset, G.; Roques, C. (2002) *Interactions between biocide cationic agents and bacterial biofilms*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 46, 1469-1474
- Campbell, P., Srinivasan, R., Knoell, T., Phipps, D., Ishida, K., Safarik, T., Cormack, H., Ridway, H. (1999) *Quantitative structure-activity relation (QSAR) analysis of surfactants influencing attachment of a Mycobacterium Sp. To cellulose acetate and aromatic polyamide reserve osmosis membrane*. Biotech. Bioeng. 64, 527-544
- Carpentier, B.; Cerf, O. (2003) *Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry*. Journal Appl. Bacteriol. 75, 499-511.
- Carvalho, H. F. (2003) Dissertação de mestrado: *Estudo da eficiência antimicrobiana do Ortóftalaldeído em culturas em suspensão de Pseudomonas fluorescens*. Universidade do Minho. Braga. Portugal.
- Chamberlain, A. H. L. (1992) *The role of adsorbed layers in bacterial adhesion*. In: Melo, L. F., Bott, T. R., Fletcher, M. e Capdeville, B. eds. *Biofilms – Science and Technology*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 59-67
- Characklis, W. G., Wilderer, P. A. (1989) *Structure and Function of Biofilms*. New York: John Wiley & Sons.
- Characklis, W. G., Marshall, K. C. (1990) *Biofilm: A basis for an interdisciplinary approach*. In: Characklis, W. G., Marshall, K. C (eds) *Biofilms*. John Wiley and Sons Inc. New York

- Christnsen, B. E.; Characklis, W. G. (1990) *Physical and chemical properties of biofilms*. In: Characklis W. G.; Marshall, K. C. (eds) *Biofilms*. John Wiley and Sons Inc. New York. Pp. 93-130
- Cloete, T. E. (2003) *Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds*. International Biodeterioration & Biodegradation. 51, 277-282
- Cloete, T. E.; Jacobs, L.; Brözel, V. S. (1998) *The chemical control of biofouling in industrial water systems*. Biodegradation. 9, 23-37
- Costerton, J. W., Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M. e Marrie, T. J. (1987) *Bacterial biofilms in nature and disease*. Ann. Ver. Microbiol. 41, 435-464
- Costerton, J. W.; Lewandowski, Z.; Caldwell, D. E.; Korber, D. R.; Lappin Scott, H. M. (1995) *Microbial biofilms*. Annu. Rev. Microbiol. 45, 711-745.
- Cunliffe, D.; Smart, C. A.; Alexander, C.; Vulfson, E. N. (1999) *Bacterial adhesion at synthetic surfaces*. Applied and Environmental Microbiology. 65, 4995-5002
- Donlan, R. M.; Costerton, J. W. (2002) *Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms*. Clinical Microbiology Reviews. 15, 167-193
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, A. and Smith, F. (1956) *Colorimetric method for determination of sugars and related substances*. Analytical Chemistry. 28, 350-356
- Elvers, K. E.; Lappin-Scott, H. M. (2000) *Biofilms and biofouling*. Encyclop of Microbiol. 1, 478-485
- Flemming, H. C. (1991) *Biofouling in water treatment*. In: Flemming, H-C e Geesey, G. G. eds. *Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems*. Heidelberg, Springer-Verlag, 47-80
- Flemming, H. C., Schaule, G., Griebe, T., Schmitt, J., Tamachkiarowa, A. (1997) *Biofouling-the Achilles bell of membrane processes*. Desalination. 113, 215-225

- Flemming, H-C., Wingender, J. (1999) *Extracellular polymeric substances (EPS): the biofilme construction material*. In: Weber, J., W. eds. *Biofouling and Materials: COST 520 Workshop*. Bern: EDMZ, 2-18
- Fraud, S.; Maillard, J-Y; Russell, A.D. (2001) *Comparison of the mycobacterial activity of ortho-phthalaldehyde, glutaraldehyde and others dialdehydes by quantitative suspension teste*. J. Hosp. Infect. 48, 214-221
- Gantzer, C. J.; Cunningham, A. B.; Gujer, W.; Gutekunst, B.; Heijnen, J. J.; Lightfoot, E. N.; Odham, G.; Rittmamnn, B. E.; Rosenberg, E.; Stolzenbach, K. D.; Zehnder, A. J. B. (1989) *Exchange Processes at the Fluid- Biofilm Interface*. In: Characklis, W G & Wilderer, P A (eds) *Structure and Function of Biofilms*, pp. 73-89. John Wiley & Sons. Chichester.
- Gardner, W. P., Girard, J. E. (2000). *Analysis of Common Household Cleaner-Disinfectants by Capillary Electrophoresis*. Journal of Chemical Education. 10, 1335-1338.
- Gehrke, T., Telegdi, J., Thierry, D. e Sand, W. (1998) *Importance of extracellular polymeric substances from Thiobacillus ferrooxidans for bleaching*. Applied and Environmental Microbiology. 64, 2743-2747
- Giese, R. F.; Wu, W.; van Oss C. J. (1996) *Surface and electrokinetic properties of clays and other mineral particles, untreated and treated with organic or inorganic cation*. J. Dispersion Sci. Tech. 17 (5), 527-547
- Gilbert, P.; Das, J. R.; Foley, I. (1997) *Biofilms susceptibility to antimicrobials*. Adv. Dent. Res. 11, 160-167
- Gilbert, P.; Das, J. R.; Jones, M. V.; Allison, D. G. (2001) *Assessment of resistance towards biocides following the attachment of micro-organisms to, and growth on, surfaces*. Journal os Applied Microbiology. 91, 248-254
- Gilbert, P.; McBain, A. J. (2003) *Potential Impact of Increased Use of Biocides in Consumer Products on Prevalence os Antibiotic Resistence*. Clinical Microbiology Reviews. 16, 189-208

- Gilbert, P.; McBain, A. J.; Rickard, A. H. (2003) *Formation of microbial biofilm in hygienic situations: a problem of control*. International Biodeterioration & Biodegradation. 51, 245-248
- Gjaltema, A. (1996) Dissertação de Doutorado: *Biofilme Development: Growth versus Detachment*. Delft: Technische Universiteit Delft. Netherlands
- Grant, D. M.; Bott, T. R. (2004) *Biocide dosing strategies for biofilm control*. Conference on heat exchanger fouling and cleaning: fundamental and applications. 42, 310-316
- Grobe, K. J.; Zahller, J.; Stewart, P. S. (2002) *Role of dose concentration in biocide efficacy against Pseudomonas aeruginosa biofilms*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 29, 10-15
- Heinzel, M. (1998) *Phenomena of biocide resistance in microorganisms*. International Biodeterioration & Biodegradation. 41, 225-234
- Horan, N. J. e Eccles C. R. (1986) *Purification and characterization of intracellular polysaccharide from activated sludges*. Water Research. 20, 1427-1432
- Ishikawa, M. Y., Katoh-Kubo K., Tsuchido, T. (2002) *Antibacterial activity of surfactants against Escherichia coli cell is influenced by carbon source and anaerobiosis*. Journal of Applied Microbiology. 93, 302-309
- Ishikawa, S.; Matsumura, Y; Yoshizako, F.; Tsuchido, T. (2002) *Characterization of a cationic surfactant-resistant mutant isolated spontaneously from Escherichia coli*. Journal of Applied Microbiology. 92, 261-268
- Jahn, A.; Nielson, P. H. (1995) *Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from biofilme using a cation exchange resin*. Water Science Technology, 32, 157-164
- Johnston, M. D.; Lambert, R. J. W.; Hanlon, G. W.; Denyer, S. P. (2002) *A rapid method for assessing the suitability of quenching agents for individual biocides as well as combinations*. Journal of Applied Microbiology. 92, 784-789

- Johnson, S. A., Goddard, P. A., Liffie, C., Timmins, B., Rickard, A. H., Robson, G., Handley, P. S. (2002) *Comparative susceptibility of resident and transient hand bacteria to para-chloro-meta-xyleneol and triclosan*. Journal of Applied Microbiology. 93, 336-344
- Kanazawa, A.; Ikeda, T. e Endo, T. (1995) *A novel approach to mode of action of cationic biocides: morphological effect on antibacterial activity*. Journal of Applied Bacteriology. 78, 309-313
- Lambert, R. J.; Joynson, J.; Forbes, B. (2001) *The relationships and susceptibilities of some industrial, laboratory and clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa to some antibiotics and biocides*. Journal of Applied Bacteriology. 91, 972-984
- Lappin-Scott H. M., Bass C. (2001) *Biofilm formation: attachment, growth, and detachment of microbes from surfaces*. Institute Pasteur Euroconference “Hygiene and Health”. Paris. France.
- Lopes, F. A. (1997) Dissertação de Mestrado: *Caracterização e actividade de biofilmes de Pseudomonas fluorescens num reactor “airlift”*. Universidade do Minho. Braga. Portugal
- Lopes, F. A. (2003) Dissertação de Doutoramento: *Interacção de biofilmes sulfato redutoras com superfícies metálicas e poliméricas*. Universidade do Minho. Braga. Portugal
- Lopes, I. A. (2002) Dissertação de Mestrado: *Aplicação de surfactants no controlo da formação de biofilmes de Pseudomonas fluorescens*. Universidade do Minho. Braga. Portugal.
- Loughlin, M. F.; Jones, M. V.; Lambert, P. A. (2002) *Pseudomonas aeruginosa cells adapted to benzalkonium chloride show resistance to other membrane-active agents but not to clinically relevant antibiotics*. J. Antimicrob.Chemother. 49:631–639.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. I. e Randal, R. J. (1951) *Protein measurement with Folin-Henol reagent*. J. Biol. Chem. 193, 265-275
- Lutey, R. W. (1995) *Process cooling water*. In: *Hand book of biocides and preservative*. Use ed. Rossmore, H. W. 50-82. London. Blackie Academic and Professional.
- Marshall, K. C. e Blainey, B. L. (1990) *Role of bacterial adhesion in biofilme formation and biocorrosion*. In: Flemming H-C, Geesey, G. G. (eds) *Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems*. Springer, Heidelberg. 29-45

- Masuda, N.; Sakagawa E.; Ohya S. (1995) *Outer membrane proteins responsible for multiple drug resistance in Pseudomonas aeruginosa*. Antim Agents Chemother. 39, 645-649
- Mattila-Sandholm, T. e Wirtanen, G. (1992) *Biofilm Formation in the Industry: a review*. Food Review International. 8, 573-603
- McBain, A. J.; Ledder, R. G.; Moore, L. E.; Catrenich, C. E.; Gilbert, P. (2004) *Effects of quaternary-ammonium-based formulations on bacterial community dynamics and antimicrobial susceptibility*. Applied and Environmental Microbiology. 70, 3449-3456
- McDonnell, G., Russell, A. D. (1999) *Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance*. Clinic Microbiol. Rev. 12, 147-179
- McFeters, G. A.; Yu, F. P.; Pyle, B. H.; Stewart P. S. (1995) *Physiological methods to study biofilm disinfection*. J. Ind. Microbiol. 15, 333-338
- Melo, L. F.; Bott, T. R.; Fletcher, M.; Capdeville, B. (1992) *Biofilms – Science and Technology*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Melo, L. F. (1994) *Biofilmes e o Controlo da Poluição*. Boletim de Biotecnologia. 48: 16-25, 203-221
- Mereghetti, L.; Quentin, R.; Maequet-van Der Mee, N.; Audurier, A. (2000) *Low sensitivity of Listeria monocytogenes to quaternary ammonium compounds*. Applied and Environmental Microbiology. 66, 5083-5086
- Meylheuc, T.; van Oss, C. J.; Bellon-Fontain, M.-N. (2001) *Adsorption of biosurfactant on solid surfaces and consequences regarding the bioadhesion of Listeria monocytogenes LO 28*. Journal of Applied Microbiology. 91, 822-832
- Morton, L. H. G.; Surman, S. B. (1994) *Biofilms in biodeterioration – a review*. International Biodeterioration & Biodegradation
- Morton, L. H. G.; Greenway, D. L. A.; Gaylarde, C. C.; Surman, S. B. (1998) *Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides*. Int. Biodeterior Biodegr. 41, 247-259

- Neu, T. R. (1996) *Significance of bacterial surface active compounds in interaction of bacteria with interface*. Microbiol. Rev. 60, 151-166
- O'Toole, G.; Kaplan, H. B.; Kolter, R. (2000) *Biofilm formation as microbial development*. Annual Review Microbiology. 54, 49-79.
- Paulus, W. (1993) *Microbicides for the protection of materials - A Handbook*. London, U.K., Chapman e Hall.
- Pereira, M. A.; Alves, M. M.; Azeredo, J.; Mota, M.; e Oliveira, R. (2000) *Influence of physico-chemical properties of porous microcarriers on the adhesion of an anaerobic consortium*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 221, 181-186
- Pereira, M. O. (2001) Dissertação de Doutoramento: *Comparação da eficácia de dois biocidas (carbamato e glutaraldeído) em sistemas de biofilme*. Universidade do Minho. Braga. Portugal.
- Pereira, M. O.; Vieira, M. J. (2001) *Effects of the interactions between glutaraldehyde and the polymeric matrix on the efficacy of the biocide against Pseudomonas fluorescens biofilms*. Biofouling. 17, 93-101
- Pereira, M. O.; Kuehn, M.; Wuertz, S.; Neu, T.; Melo, L. (2002b) *Effects of flow regime on the architecture of a Pseudomonas fluorescens biofilm*. Biotech Bioeng. 78, 164-171
- Pereira, M. O.; Vieira, M. J.; Melo, L. F. (2002) *The Role of Kaolin Particles in the Performance of a Carbamate-Based Biocide for Water Bacterial Control*. Water Environment Research. 74, 235-241.
- Pinheiro, M., M. (1987) Dissertação de Doutoramento: *Sujamento Biológico de superfícies de Transferência de Calor*. Universidade do Minho. Braga. Portugal
- Ratsak, C. H., Maarsen, K. A. e Kooijman, S. A. L. M. (1996) *Effects of protozoa on carbon mineralization in activated sludge*. Review. Wat. Res. 30, 1-12
- Rodríguez, E.; Seguer, J.; Rocobayera, X. e Manresa, A. (2004) *Cellular effects of monohydrochloride of L-arginine, N<sup>o</sup>-lauroyl ethylester (LAE) on exposure to Salmonella*

- typhimurium and Staphylococcus aureus. *Journal of Applied Microbiology*. 96, 903-912.
- Roger Y. Stanier, John L. Ingraham, Mark L. Wheelis, Page R. Painter (1992) *Microbiología 2ª* Edição, Editorial Reverté, S.A. (Barcelona-Bogotá-Buenos Aires- Caracas- México) Barcelona
- Russell, A. D. (1995) *Mechanisms of bacterial resistance to biocides*. *Int. Biodeterior Biodegr.* 36, 247-265
- Russell, A. D.; Tattawasart, U.; Maillard, J-Y; Furr, J. R. (1998) *Possible link between bacterial resistance and use of antibiotics and biocides*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 42, 2151
- Russell, A. D.; McDonnell, G. (2000) *Concentration: a major factor in studying biocidal action*. *Journal of Hospital Infection*. 44, 1-3
- Sakagami, Y.; Yokoyama, H.; Nishimura, H.; Ose, Y.; Tashima, T. (1989) *Mechanism of resistance to benzalkonium chloride by Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*. 55, 2036-2040
- Shotton, D. and White, N. (1989) *Confocal scanning microscopy: three-dimensional biological imaging*. *TIBS*. November, 435-439
- Simões, M.; Pereira, M. O.; Vieira, M. J. (2003a) *Effect of different concentrations of Ortho-phthalaldehyde on biofilms formed by Pseudomonas fluorescens under different flow conditions*. *Biofouling* 19, 287-295
- Simões, M.; Carvalho, H.; Pereira, M. O.; Vieira, M. J. (2003b) *Studies on the behaviour of Pseudomonas fluorescens after ortho-phthalaldehyde treatment*. *Biofouling*. 19, 151-157
- Simões, M.; Pereira, M. O.; Vieira, M. J. (2003) *Monitoring the effects of biocide treatment of Pseudomonas fluorescens formed under different flow regimes*. *Water Science Technology*. 47, 217-223

- Simões, M.; Pereira, M. O.; Vieira, M. J. (2005) *Action of a cationic surfactant on the activity and removal of bacterial biofilmes formed under different flow regimes*. Water Research. 39, 478-486
- Smith, M. J.; Flowers, T. H.; Cowling, M. J.; Duncan, H. J. (2002) *Method for the measurement of the diffusion coefficient of benzalkonium chloride*. Water Research. 36, 1423-1428
- Smith, Alice Lorraine (1985) *Principles of Microbiology*. Tenth Edition, Times Mirror/Mosby College Publishing, (St. Louis, Toronto, Santa Clara) Printed USA
- Stainer R. Y. (1995) *General microbiology*. 5ª edição Prentice-Hall Inc. 404-406
- Stelmack, P. L.; Gray, M. R.; Pickard, A. M. (1999) *Bacterial Adhesion to soil contaminants in the presence of surfactants*. Applied and Environmental Microbiology. 65, 163-168
- Stewart P. S.; Griebe, T.; Srinivasan, R.; Chen, C.-I.; Yu, F. P.; deBeer, D.; McFeters, G. A. (1994) *Comparison of respiratory activity and culturability during monochloramine disinfection of binary population of biofilmes*. Appl. Environ. Microbiol. 60, 1690-1692
- Stewart P. S.; Rayner, J.; Roe, F.; Rees, W. M. (2001) *Biofilm penetration and disinfection efficacy of alkaline hypochlorite and chlorosulfamates*. Journal of Applied Microbiology. 91, 525-532
- Sutherland, I. W. (2001) *Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework*. Microbiology. 147, 3-9
- Tabata, A.; Nagamune, H.; Maeda, T.; Murakami, K.; Miyake, Y.; Kourai, H. (2003) *Correlation between Resistance of Pseudomonas aeruginosa to Quaternary Ammonium Compounds and Expression of Outer Membrane Protein OprR*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 47, 2093-2099
- Tattawasart, U.; Maillard, J. Y.; Furr, J. R.; Russell, A. D. (1999) *Development of resistance to chlorhexidine diacetate and cetylpyridinium chloride in Pseudomonas stutzeri and changes in antibiotic susceptibility*. Journal of Hospital Infection. 42, 219-229
- Tattawasart, U.; Hann, A. C.; Maillard, J. R.; Furr, J. R.; Russell, A. D. (2000) *Cytological changes in chlorhexidine-resistant isolated of Pseudomonas stutzeri*. Journal of antimicrobial Chemotherapy. 45, 145-152

- Tattawasart, U.; Maillard, J. R.; Furr, J. R.; Russell, A. D. (2000) *Outer membrane changes in Pseudomonas stutzeri resistant to chlorhexidine diacetate and cetylpyridinium chloride*. Int. J. Antimicrob. Agents. 16, 233–238
- Teixeira, M. P. (2002) Dissertação de Doutoramento: *Desnitificação por Alcaligenes denitrificans em reatores de discos biológicos fechados*. Universidade do Minho. Braga. Portugal
- To, M. S.; Favrin, S.; Romanova, N.; Griffiths, M. W. (2002) *Postadaptational resistance to benzalkonium chloride and subsequent physional modifications of Listeria monocytogenes*. Applied and Environmental Microbiology. 68, 5258-5264
- Turakhia, M. H.; Characklis, W. G. (1989) *Activity of Pseudomonas aeruginosa in biofilms: Effect of calcium*. Biotech. Bioeng. 33, 406-414.
- Valcarce, M. B.; Busalmen, J. P.; Sánchez, S. R. (2002) *The influence of the surface condition of the adhesion of Pseudomonas fluorescens (ATCC 17552) to copper and aluminium brass*. International. Biodeterioration and Biodegradation. 50, 61-66
- Van Oss, C. J. (1991) *The forces involved in bioadhesion to flat surface and particles- their determination and relative roles*. Biofouling. 4, 25-35
- Van Oss, C. J. (1994) *Interfacial Forces in Aqueous Media*, Marcel Dekker, Inc., New York.
- Van Oss, C. J.; Giese, R. F. (1995) *The hydrophilicity and hydrophobicity of clay minerals*. Clay minerals. 43, 474-477
- Van Oss, C. J.; Good, R. J. e Chaudhury, M. K. (1988) *Additive and nonadditive surface tension components and the interpretation of contact angles*. Langmuir. 4, 884-891
- Vieira, M. J. (1995) Dissertação de Doutoramento: *Estudo da formação de biofilmes 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.; Martins, V. (1993) *Effects of metallic ions on the adhesion of biofilms formed by Pseudomonas fluorescens*. Colloids and Surfaces B. Interfaces. 1, 119-124
- Xavier, J. B.; Picioteanu, C.; Almeida, J. S.; van Loosdrecht, M. C. M. (2003) *Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes*. Boletim de Biotecnologia. 76, 1-12.
- Wilson, D. I. (2004) *Challenges in cleaning: recent developments and future prospects*. Conference on heat exchanger fouling and cleaning: fundamental and applications. 21, 148-157
- Wimpenney, J. W. T., Peters, A. e Scourfield, M. A. (1993) *The Physiology and biochemistry of biofilme*. In: Characklis, W. G. e Wilderer, P. A. eds. *Structure and Function of Biofilms*. Dahlem Workshop, John Wiley and Sons, Inc. 111-127
- Wirtanen, G. (1995) *Biofilm formation and its elimination from food processing equipment*. VTT Publications, Espoo, Finland.
- Wirtanen, G. e Mattila-Sandholm, T. (1992) *Removal of Foodborne Biofilms- Comparison of Surface and Suspension Test*. Food Research Laboratory
- Wirtanen, G. e Mattila-Sandholm, T. (1993) *Epifluorescence Image Analysis and Cultivation of Foodborne Biofilm Bacteria Grow on Stainless Steel Surface*. Journal of Food Protection. 56, 678-683.
- Zottola, E. A., Sasahara, K. C. (1994) *Microbial biofilme in the food processing industry-should they be concerned?* Int. J. Food Microbiol. 23, 125-148