

Universidade do Minho

Escola de Engenharia

Débora Francisca Baptista Castro

**Desinfetante multi-superfícies de
longa duração: avaliação da
eficácia e durabilidade**

Dissertação de Mestrado

Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

Ramo Tecnologia Química e Alimentar

Trabalho efetuado sob a orientação:

Doutora Isabel Carvalho

Professora Doutora Mariana Henriques

DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença [abaixo](#) indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.

Licença concedida aos utilizadores deste trabalho



Atribuição
CC BY

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Agradecimentos

Antes de iniciar a defesa da minha dissertação de mestrado, gostaria de demonstrar o meu profundo agradecimento a todos aqueles que diretamente ou indiretamente contribuíram para que a concretização desta jornada da minha vida fosse possível.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer aos meus pais por todo o apoio incondicional e por serem a base que me permite crescer, à minha irmã, por ser um exemplo a seguir e pelo papel essencial que sempre teve em toda a minha vida pessoal e formação académica, ao meu cunhado, por sempre transmitir a alegria e o apoio necessário e ao meu namorado, por me apoiar e acreditar em mim todos os dias.

Em segundo lugar, mas não menos importante, gostaria de agradecer às minhas orientadoras a professora Doutora Mariana Henriques, pela orientação e por toda a disponibilidade e apoio prestado ao longo do desenvolvimento desta dissertação, à Doutora Isabel Carvalho, por sempre ter estado presente desde o início da investigação e que sem a sua ajuda e orientação constante seria muito mais difícil de realizar e à supervisora na empresa *Success Gadget*, a Doutora Isabel Ferreri, pela oportunidade e pela disponibilidade em prestar-me todos os esclarecimentos e os ensinamentos necessários para o desenvolvimento da dissertação.

Devo ainda, demonstrar o meu agradecimento especial à empresa *Success Gadget* pela oportunidade da realização do estágio curricular e ainda ao Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, que em conjunto permitiram as condições necessárias à realização da dissertação.

Por fim, a todos os outros familiares e amigos, aos presentes na empresa e no Centro de Engenharia Biológica, deixo um muito obrigado.

DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

Resumo – Desinfetante multi-superfícies de longa duração: avaliação da eficácia e durabilidade

Nos últimos anos tem-se observado uma crescente preocupação com os hábitos de higiene, saúde e segurança por parte da sociedade. Adicionalmente, as infeções em setores como a saúde e a indústria alimentar, impuseram a necessidade do desenvolvimento de produtos que permitam conferir qualidade e segurança aos serviços e produtos disponíveis. Face a esta procura, a empresa *Success Gadget* desenvolveu um desinfetante antimicrobiano multi-superfícies de longa duração. Assim, este trabalho desenvolvido na referida empresa teve como objetivo principal a avaliação deste produto, quer em termos de composição, quer em termos de atividade antimicrobiana contra vários microrganismos e aplicada em diferentes superfícies.

Numa primeira fase deste projeto, foram estudados os componentes da formulação e a estabilidade da mesma, quando submetida a ensaios de estabilidade acelerada. Relativamente aos componentes da formulação confirma-se a atividade antibacteriana por parte das substâncias ativas da formulação, o peróxido de hidrogénio e o etanol, para as três bactérias em estudo, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*. Quanto à formulação em estudo, mostrou-se estável quando submetida a uma temperatura de 54 °C durante 14 dias, sendo que no final do ensaio a percentagem de peróxido de hidrogénio teórico se encontra dentro do intervalo obtido experimentalmente. Quanto ao parâmetro da densidade este não sofreu alterações e no parâmetro do pH as alterações que ocorreram já eram esperadas.

Na segunda fase do projeto, analisou-se a atividade antibacteriana de superfícies porosas, tendo sido testadas duas amostras têxteis, com diferentes características. O produto em estudo apresentou atividade antibacteriana para as duas amostras têxteis para tempos de desinfeção até 7 dias de aplicação, para *S. aureus*, *K. pneumoniae* e *E. coli*.

A análise da atividade antibacteriana em superfícies não porosas, correspondendo à terceira fase do projeto, sendo testadas amostras de alumínio. O desinfetante apresenta atividade antibacteriana até 48 h para *S. aureus*, no caso da *K. pneumoniae* apresenta atividade antibacteriana até 7 dias e, por último, para *E. coli* não apresenta atividade antibacteriana.

A última fase da dissertação contemplou a análise da atividade antimicrobiana em superfícies do quotidiano, sendo que ocorreu total inibição fúngica e uma diminuição notória de colonização bacteriana após 7 dias de aplicação de desinfetante.

Em conclusão, o desinfetante em estudo é um produto promissor no que toca à inibição de microrganismos em superfícies com características diferentes entre si.

Palavras-chave: desinfetante, peróxido de hidrogénio, etanol, atividade antimicrobiana

Abstract – Long term multi-surface disinfectant: evaluation of efficiency and durability

In recent years there has been a growing concern with hygiene, health and safety habits on part of society. Additionally, infections in sectors such as health and food industry have imposed the need to develop products that allow the assessment of quality and safety in the services and products available. Due to the demand, the company *Success Gadget* created an long term multi-surface disinfectant. Therefore the work developed by the company, had the main goal to be the evaluation of the product in composition and in antimicrobial activity against the several microorganisms and applied in different surfaces.

In the first phase of the project, the components of the formulation and their stability were studied, been submitted to accelerated stability tests. Regarding the components of the formulation, the antibacterial activity of the active substances in the formulation, hydrogen peroxide and ethanol, is confirmed for the three bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*) under study, it was stable when subjected to a temperature of 54 °C for 14 days, and at the end of the test the theoretical percentage of hydrogen peroxide is within the range obtained experimentally. As for the density parameter, it did not undergo changes and the pH parameter, the changes that occurred were already expected.

In the second stage of the project, the antibacterial activity of porous surface was analysed, two textile samples with different characteristics were tested. The product under study showed antibacterial activity for both textile samples for disinfection times up to 7 days of application, for *S. aureus*, *K. pneumoniae* and *E. coli*.

On the analysis of antibacterial activity on non-porous surface, the third phase of the project, aluminium samples were tested. The disinfectant had antibacterial activity up to 48 h for *S. aureus*, in the case of *K. pneumoniae* it had antibacterial activity up to 7 days and, finally, for *E. coli* it had no antibacterial activity.

The last phase of the work included the analysis of antimicrobial activity on everyday surfaces, with total fungal inhibition and notable decrease in bacteria colonization after 7 days of disinfectant application.

In conclusion, the disinfectant under study is a promising product in terms of inhibiting microorganisms on surfaces with different characteristics.

Keywords: disinfectant, hydrogen peroxide, ethanol, antimicrobial activity

Índice

<i>Licença concedida aos utilizadores deste trabalho</i>	ii
Agradecimentos.....	iii
Resumo – Desinfetante multi-superfícies de longa duração: avaliação da eficácia e durabilidade .	v
Abstract – Long term multi-surface disinfectant: evaluation of efficiency and durability	vi
Índice.....	vii
Lista de Abreviaturas e Siglas	x
Índice de Figuras.....	xi
Índice de Tabelas	xii
CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Organização da dissertação.....	1
1.2. Enquadramento	1
1.3. A empresa	2
1.4. Objetivos.....	2
CAPÍTULO 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Superfícies.....	4
2.1.1. Superfícies Porosas	4
2.1.2. Superfícies Não Porosas	6
2.2. Colonização Bacteriana de Superfícies.....	8
2.2.1. Superfícies Alimentares	8
2.2.2. Superfícies Hospitalares	9
2.3. Desinfetante.....	9
2.3.1. Enquadramento Legal.....	10
2.3.2. Características do Desinfetante	12
2.3.3. O Desinfetante - Care Us.....	13
2.3.4. Peróxido de Hidrogénio.....	13

2.3.5.	Etanol.....	16
2.4.	Técnicas de avaliação da atividade antimicrobiana.....	18
2.4.1.	Determinação qualitativa da atividade antibacteriana.....	18
2.4.2.	Determinação quantitativa da atividade antibacteriana em superfícies porosas .	19
2.4.3.	Determinação quantitativa da atividade antibacteriana em amostras não porosas	19
2.4.4.	Determinação da atividade antimicrobiana em superfícies do quotidiano	20
2.4.5.	Microrganismos em estudo.....	20
2.5.	Técnicas de caracterização da formulação.....	23
2.5.1.	Determinação da estabilidade da formulação	23
2.5.2.	Titulação	24
CAPÍTULO 3. METODOLOGIA		26
3.1.	Quantificação do princípio ativo – Peróxido de Hidrogénio.....	26
3.1.1.	Titulação do meio líquido por iodometria	26
3.1.2.	Titulação do material têxtil por iodometria	27
3.2.	Ensaio de estabilidade acelerada	27
3.2.1.	Determinação da densidade	28
3.2.2.	Determinação do pH.....	28
3.3.	Avaliação da Atividade Antimicrobiana	29
3.3.1.	Microrganismos e condições de crescimento.....	29
3.3.2.	Determinação das retas de calibração.....	29
3.3.3.	Testes de difusão em agar	30
3.3.4.	Teste de disco – difusão em agar.....	30
3.3.5.	Avaliação da atividade antibacteriana em materiais porosos	31
3.3.6.	Avaliação da atividade antibacteriana nas amostras não porosas	34
3.3.7.	Avaliação da atividade antimicrobiana em superfícies do quotidiano	36
CAPÍTULO 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO		38

4.1.	Formulação.....	38
4.1.1.	Quantificação do Peróxido de Hidrogénio na formulação.....	38
4.1.2.	Análise dos componentes da formulação	38
4.2.	Ensaio de estabilidade acelerada	39
4.3.	Quantificação de peróxido de hidrogénio nas amostras têxteis.....	42
4.4.	Avaliação da atividade antibacteriana em superfícies porosas	44
4.4.1.	Determinação do tipo de tratamento a aplicar nas amostras porosas.....	44
4.4.2.	Determinação qualitativa da atividade antibacteriana das amostras porosas	45
4.4.3.	Determinação quantitativa da atividade antibacteriana das amostras porosas ...	47
4.4.4.	Determinação da atividade antibacteriana das amostras não porosas	49
4.4.5.	Determinação da atividade antibacteriana em superfícies do quotidiano	52
CAPÍTULO 5. Conclusão e proposta de trabalho futuro		54
Bibliografia		56
ANEXOS		62
Anexo A. Composição dos meios de cultura e reagentes.....		62
Anexo B. Retas de calibração		63
Anexo B.1. Reta de calibração de <i>S. aureus</i> ATCC 6538		63
Anexo B.2. Reta de calibração de <i>K. pneumoniae</i> ATCC 11296.....		63
Anexo B.3. Reta de calibração de <i>E. coli</i> CECT 434.....		64

Lista de Abreviaturas e Siglas

ACEM – Autoridade Competente do Estado-Membro

ASTM – American Society of Testing and Materials

CAGR – Taxa de Crescimento Anual Composta

ECHA – European Chemicals Agency

EUCAST – European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

ISO – International Organization of Standardization

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

OMS – Organização Mundial de Saúde

PT – Product Type

RPB – Relatório de Produtos Biocidas

Índice de Figuras

<i>Figura 1 - (a) estrutura química e (b) esquema molecular do peróxido de hidrogénio (Wikipedia, 2021).</i>	13
<i>Figura 2 - (a) estrutura química e (b) esquema molecular do etanol (Wikipedia, 2021).</i>	16
<i>Figura 3 - Disco de difusão em agar com peróxido de hidrogénio com atividade antibacteriana, para S. aureus.</i>	18
<i>Figura 4 - Cultura de S. aureus em Trypic Soy Agar.</i>	21
<i>Figura 5 - Cultura de K. pneumoniae em Trypic Soy Agar.</i>	22
<i>Figura 6 – Cultura de E. coli em Trypic Soy Agar.</i>	23
<i>Figura 7 - Titulação iodométrica para quantificação de peróxido de hidrogénio.</i>	26
<i>Figura 8 - Edge® Medidor de pH - HI2020.</i>	28
<i>Figura 9 - Amostras têxteis utilizadas nos ensaios de atividade antibacteriana; 1.a.-amostra 1 face a testar; 1.b.-amostra 1 face inversa; 2.a.-amostra 2 face a testar; 2.b.-amostra 2 face inversa.</i>	32
<i>Figura 10 - Esquema de diluição em placa de 96 poços.</i>	33
<i>Figura 11 - Esquema da prateleira utilizada para os ensaios de atividade antimicrobiana em superfícies.</i>	36
<i>Figura 12 - Teste do disco, de difusão em agar, para os componentes líquidos da formulação.</i>	39
<i>Figura 13 - Teste do disco, de difusão em agar, para as três bactérias em estudo.</i>	41
<i>Figura 14 - Quantificação de peróxido de hidrogénio, por iodometria, em função do tempo de aplicação de desinfetante.</i>	43
<i>Figura 15 - Lg do número de células viáveis em função da variável de tratamento a aplicar nas amostras têxteis, para S. aureus com um tempo de aplicação de desinfetante de 2 h.</i>	45
<i>Figura 16 - Teste de difusão em agar, para a amostra 1 com o desinfetante em estudo, para tempos de aplicação de 2 h e 24 h, para S. aureus, do lado esquerdo, e K. pneumoniae, do lado direito.</i>	46
<i>Figura 17 - Teste de difusão em agar, para a amostra 2 com o desinfetante em estudo, para tempos de aplicação de 2 h e 24 h, para S. aureus, do lado esquerdo, e K. pneumoniae, do lado direito.</i>	46
<i>Figura 18 - Resultados do ensaio realizado em superfície do quotidiano.</i>	52
<i>Figura A.1 -- Reta de calibração da concentração celular, em UFC/mL de S. aureus ATCC 6538 em função da sua densidade ótica, a 620 nm.</i>	63
<i>Figura A.2 -- Reta de calibração da concentração celular, em UFC/mL de K. pneumoniae ATCC 11296 em função da sua densidade ótica, a 620 nm.</i>	63
<i>Figura A.3 -- Reta de calibração da concentração celular, em UFC/mL de E. coli CECT 434 em função da sua densidade ótica, a 620 nm.</i>	64

Índice de Tabelas

<i>Tabela 1 - Fatores analisados no ensaio de estabilidade acelerada em função do tempo de ensaio.....</i>	<i>40</i>
<i>Tabela 2 - Valores de atividade antibacteriana para cada tempo de aplicação em estudo, para as amostras têxteis inoculadas com S. aureus, K. pneumoniae e E. coli.....</i>	<i>48</i>
<i>Tabela 3 - Valores de atividade antibacteriana para cada tempo de aplicação em estudo, para as amostras de alumínio inoculadas com S. aureus, K. pneumoniae e E. coli.....</i>	<i>50</i>
<i>Tabela A. 1 - Meio TSA</i>	<i>62</i>
<i>Tabela A.2 - Meio TSB</i>	<i>62</i>
<i>Tabela A. 3 - PBS 1X</i>	<i>62</i>
<i>Tabela A.4 - Meio TSB com Polisorbato 80</i>	<i>62</i>

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO

1.1. Organização da dissertação

Esta dissertação está dividida em cinco capítulos.

No presente capítulo, é realizado um enquadramento geral com o tema a desenvolver, assim como uma breve descrição sobre a empresa que permitiu o desenvolvimento desta dissertação e por último são descritos os objetivos principais a responder, que foram seguidos ao longo da investigação.

O capítulo 2 inclui uma revisão bibliográfica dos vários temas abordados ao longo da dissertação, como a descrição de superfícies porosas e não porosas, da colonização microbiana e dos desinfetantes.

O capítulo 3 descreve toda a metodologia utilizada ao longo do trabalho experimental. Os resultados obtidos foram analisados e discutidos no capítulo 4.

Por último, o capítulo 5 estabelece as conclusões da dissertação e aborda alguns pontos a melhorar em trabalhos futuros.

1.2. Enquadramento

As necessidades e os hábitos de higiene têm sofrido alterações ao longo dos anos, por imposição da sociedade. Estas necessidades tornaram-se ainda mais acentuadas devido ao aparecimento da pandemia provocada por SARS-Cov-2. Esta pandemia estimulou um aumento na procura de produtos de limpeza e desinfetantes devido à crescente preocupação sobre higiene, saúde e segurança. Para além disso, o crescimento do mercado de desinfetantes é também atribuído ao aumento do aparecimento de infeções adquiridas em ambiente hospitalar e à implementação de regulamentação favorável ao uso de desinfetantes de superfície, quer na indústria da saúde, mas também noutros setores da indústria, como a alimentar (Markets and Markets, 2020).

O aumento da consciencialização dos consumidores sobre a higiene e os cuidados de saúde preventivos impulsiona o mercado de desinfetantes. O mercado global de desinfetantes de superfície está projetado para atingir 3,6 mil milhões de dólares em 2025, face aos 3,1 mil milhões de dólares em 2020, demonstrando assim uma taxa de crescimento anual composta (CAGR) de 3,0 % (Markets and Markets, 2020).

Economias emergentes como o caso da Índia, Brasil, China e África do Sul oferecem oportunidades de elevada e significativa importância no mercado de desinfetantes de superfície.

Isto deve-se à necessidade de melhores serviços de saúde, visto que estas economias apresentam um rápido envelhecimento populacional e um elevado volume de habitantes a recorrer aos serviços de saúde (Markets and Markets, 2020).

A maior participação do mercado em 2020 provém da América do Norte, esta grande participação é justificada pelo aumento da incidência de infeções adquiridas em ambiente hospitalar, envelhecimento da população e investimento na melhoria das infraestruturas no campo da saúde (Markets and Markets, 2020).

Os desinfetantes podem ser aplicados em várias situações e locais, como superfícies, dispositivos, produtos e alimentos. A desinfeção tem como objetivo a redução/eliminação do número de microrganismos viáveis onde foi aplicado o desinfetante (McDonnell, 2014).

A evolução dos desinfetantes acompanhará a evolução da sociedade prevendo-se que a sua produção continue a aumentar exponencialmente nos próximos tempos.

1.3. A empresa

A empresa *Success Gadget*, sediada em Barcelos, é uma empresa pioneira em Portugal, no desenvolvimento de têxteis biofuncionais usando a nanotecnologia na produção de vestuário funcional e inteligente, oferecendo um desempenho e conforto inigualáveis. O seu foco centra-se em dois produtos principais: soluções para repelência de insetos de longa duração e soluções antimicrobianas. Os produtos/formulações são pensados para uso doméstico ou profissional, podendo ser utilizados numa ampla gama de setores, como a saúde ou a construção, podendo os componentes ativos estarem presentes no vestuário, calçado ou em tintas, vernizes e argamassas.

A empresa *Success Gadget* garante soluções avançadas de proteção e conservação para têxteis e outras superfícies por meio de uma tecnologia baseada em nanotecnologia exclusiva e patenteada: Sil2U®. Esta tecnologia consegue garantir permanência durante oitenta lavagens, sendo uma grande mais-valia quando comparada com a resistência de outros produtos do mercado, com o mesmo efeito. Isto deve-se a um sistema inovador que fixa as partículas aos substratos funcionalizados, tornando-os resistentes ao longo da sua vida útil e respetivos ciclos de lavagem.

1.4. Objetivos

A pertinência da realização desta investigação prende-se na importância da produção de um desinfetante multi-superfícies de longa duração com atividade antimicrobiana. Assim, o ponto

principal desta investigação visa a obtenção da maior durabilidade da atividade antimicrobiana que o desinfetante de longa duração consegue garantir, assegurando sempre a maior eficácia.

O objetivo da presente investigação centra-se no estudo da eficácia e durabilidade do efeito antimicrobiano de um desinfetante multi-superfícies de longa duração.

No âmbito deste estudo, destacam-se algumas etapas principais:

- verificação da estabilidade do produto em estudo, ao tempo de armazenamento em prateleira;
- verificação da atividade antibacteriana, quando o desinfetante é aplicado em superfícies porosas, como amostras têxteis;
- verificação da atividade antibacteriana, quando o desinfetante é aplicado em superfícies não porosas, como amostras de alumínio;
- verificação da atividade antimicrobiana, quando o desinfetante é aplicado em superfícies do quotidiano do ser humano, como estantes e superfícies.

CAPÍTULO 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Superfícies

Uma superfície corresponde ao limite externo ou superior de um objeto ou corpo. As superfícies podem ser classificadas tendo em conta a sua porosidade, em superfícies porosas e em superfícies não porosas.

2.1.1. Superfícies Porosas

Uma superfície porosa pode ser definida como uma superfície com espaços vazios, isto é, espaço não ocupado pela estrutura principal de átomos que constituem a estrutura da superfície. Estes espaços vazios são designados por poros e permitem que matéria externa penetre na superfície (Culp, 2015).

Os materiais porosos podem ser classificados tendo em conta o tamanho do poro, a morfologia dos poros e a composição. No que toca ao número de poros ou porosidade varia consoante o material poroso que se está a utilizar. Com base no seu número de poros, os materiais porosos podem ser classificados como baixa porosidade, média porosidade ou alta porosidade (Liu & Chen, 2014).

Segundo as diretrizes de 1985, da International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), os materiais porosos podem ser descritos como microporoso, mesoporoso e macroporoso sendo que apresentam diâmetros médios de poro inferior a dois nanómetros, entre 2 a 50 nm e superiores a 50 nm, respetivamente. Os materiais nanoporosos, atualmente, estão a ser uma fonte de estudo e são referentes a materiais com diâmetros de poros inferiores a 100 nm (Culp, 2015).

Existe uma grande variedade de materiais porosos, mas todos eles apresentam características comuns como baixa densidade relativa, grande área de superfície específica, alta resistência específica, baixa condutividade térmica e boa adsorção de energia quando comparado com a versão densa dos mesmos materiais (Liu & Chen, 2014).

Os têxteis como roupa, carpetes e cortinas assim como a madeira não tratada são alguns exemplos de superfícies porosas.

O tecido têxtil é definido como uma estrutura idêntica a um plano bidimensional feito de materiais têxteis. O tecido têxtil apresenta razoável resistência, alongamento, flexibilidade, entre

outras características, é utilizado para diferentes aplicações, mas normalmente para vestuário (Ray, 2012).

No que toca, aos materiais têxteis estes são formados recorrendo a uma série de técnicas como a tecelagem, o tricô, o croché, a prensagem de fibras, que tem como objetivo a junção de fibras individuais de modo a produzir a estrutura bidimensional ou tridimensional característica dos tecidos têxteis (Qin, 2016).

A fibra é a unidade básica da matéria fibrosa em produtos têxteis. A fibra pode ser classificada tendo em conta a sua forma de obtenção, em fibras sintéticas ou artificiais e em fibras naturais (Misnon et al, 2014).

As fibras sintéticas ou artificiais são produzidas quimicamente, geralmente por processos de polimerização com recurso a uma máquina de extrusão, denominada fireira. As fibras sintéticas podem ainda ser classificadas com base nas suas propriedades mecânicas e físicas em desempenho baixo, desempenho médio e desempenho alto (Misnon et al, 2014).

As fibras naturais, extraídas da própria natureza, podem ser de origem mineral, vegetal ou animal. As fibras minerais são pouco usadas no vestuário, mas usadas em áreas como a construção e indústria automóvel. A fibra vegetal provém das plantas e têm sido das fibras mais investigadas, como o caso das fibras desenvolvidas de laranja e de leite de côco. Por último, as fibras animais são obtidas dos pêlos dos animais ou produzidas por eles, como o caso dos fios de seda e as teias de aranha. O algodão e a lã são as fibras naturais mais conhecidas e extremamente utilizadas para a produção de vestuário (Misnon et al, 2014).

A madeira é um outro exemplo de uma superfície porosa uma vez que possui um arranjo específico de células de lignocelulose em direções paralelas e perpendiculares. Estes arranjos deixam espaços abertos na superfície em forma de poros. O tamanho, a frequência e a disposição dos poros variam consoante as diferentes espécies de madeira. Os poros da madeira são capazes de reter microrganismos e tornam a desinfeção da superfície difícil devido à dificuldade de garantir o contacto entre os microrganismos e o desinfetante (Munir et al, 2019).

A porosidade da madeira varia consoante o plano de corte da mesma. Quanto maior a quantidade e a profundidade de poros, maior a retenção de microrganismos dentro da madeira. Em cortes transversais, as bactérias e os esporos conseguem entrar mais profundamente, representando um menor risco de recontaminação. As placas de madeira cortadas

longitudinalmente apresentam maior facilidade de limpeza devido às aberturas menos profundas e mais largas na superfície (Munir et al, 2019).

2.1.2. Superfícies Não Porosas

Uma superfície não porosa é uma superfície que não contém poros, ou seja, corresponde a um sólido compacto. O termo não poroso significa que qualquer tipo de líquido e ar não consegue penetrar na superfície, permanecendo apenas na superfície.

O vidro, os plásticos e os metais processados são exemplos de superfícies não porosas. As superfícies não porosas podem ser divididas em duas categorias: lisas e ásperas. Nas superfícies lisas não porosas estão incluídos o vidro e as superfícies pintadas ou envernizadas, enquanto as superfícies ásperas não porosas são referentes a superfícies texturizadas, como o vinil (Writer, 2020).

As superfícies plásticas oferecem inúmeras propriedades, como leveza, resiliência, resistência à corrosão, cor, transparência e facilidade de processamento, o que os torna bastante competitivos face a outras superfícies em muitas aplicações. Apresentam ainda, elevada versatilidade, baixo custo e a abundância de recursos plásticos, incentivando a sua utilização em produtos utilizados diariamente. Estas superfícies plásticas são produzidas com diferentes composições poliméricas e natureza física, permitindo assim uma ampla gama de propriedades em níveis macro, micro e nano moleculares (Shrivastava, 2018).

Para que as superfícies plásticas sejam aplicadas aos produtos selecionados estas devem ser testadas. Os padrões de teste universais são estabelecidos por organizações como a American Society of Testing and Materials (ASTM), a International Organization for Standardization (ISO) e o Underwriter Laboratories. Normalmente, há correlações diretas entre estes padrões, no entanto, nem todos concordam totalmente quanto aos procedimentos e condições, o que resulta em resultados ligeiramente diferentes (Shrivastava, 2018).

As características físicas dos materiais plásticos afetam o manuseamento diário e o desempenho dos mesmos. Uma propriedade física importante é a densidade, sendo definida como a massa por unidade de volume dos materiais plásticos. Em engenharia é usada para estimar as relações resistência/massa e custo/massa. A densidade aparente é a medida do volume do material, ou seja, a massa do volume das matérias-primas de plástico adquiridas ao fornecedor. A densidade sólida corresponde à densidade do plástico na sua forma moldada, quer como filmes,

folhas, perfis ou peças moldadas. A densidade de fusão deve-se ao facto dos materiais plásticos se expandirem durante o aquecimento provocando um aumento no volume. O tamanho da partícula desempenha um papel significativo no manuseamento, processamento e desempenhos das matérias-primas e superfícies plásticas (Shrivastava, 2018).

As propriedades mecânicas são usadas para prever o desempenho dos produtos plásticos quando estes sofrem forças de tração, compressão, flexão e torção. Consoante as aplicações dos materiais plásticos são executados diferentes testes para medir as propriedades mecânicas (Shrivastava, 2018).

Um outro exemplo de superfícies não porosas, são as superfícies de aço inoxidável. Estas correspondem a um conjunto de ligas à base de ferro que contém no mínimo 11 % de cromo. Esta é uma percentagem importante uma vez que é necessário criar uma camada de óxido rico em cromo para evitar a ferrugem na superfície. Dependendo da aplicação do aço inoxidável, podem ser adicionados diversos elementos químicos à liga, como o caso do níquel, cobre, titânio, alumínio, entre outros. Os aços inoxidáveis são normalmente classificados em cinco famílias. Quatro dessas famílias são baseadas nas suas estruturas cristalográficas: martensítica, ferrítica, austenítica e austenítica mais ferrítica, denominada duplex. A quinta família é baseada no tipo de tratamento térmico utilizado para produzir certas propriedades, sendo designadas por ligas endurecidas por precipitação ou aços endurecidos por precipitação (Singh, 2012).

O alumínio é um outro exemplo de uma superfície não porosa. O alumínio é um metal branco prateado, sendo o décimo terceiro elemento da tabela periódica. É o metal mais difundido na Terra, chegando a constituir 8 % da massa do núcleo da Terra. Este metal oferece uma combinação rara de propriedades valiosas. É um dos metais mais leves do mundo, chegando a ser três vezes mais leve que o ferro, mas mantendo sempre a sua força. Adicionalmente é extremamente flexível e resistente à corrosão porque a sua superfície está normalmente coberta por uma camada extremamente fina, mas muito forte de um filme de óxido. Não magnetiza, é um ótimo condutor de electricidade e forma ligas com praticamente todos os outros metais (UC RUSAL, 2021).

2.2. Colonização Bacteriana de Superfícies

Para a aplicação de um desinfetante numa determinada superfície é importante ter em conta o tipo de microrganismos que podem contaminar essa mesma superfície e normalmente isso é afetado pelo local onde esta se encontra. Em seguida serão enumerados vários microrganismos patogénicos que se encontram comumente presentes em superfícies na indústria alimentar e na área hospitalar.

2.2.1. Superfícies Alimentares

A bactéria gram negativa *Pseudomonas* é o género mais frequente em superfícies de processamento de alimentos e podem ser provenientes de diferentes zonas do processamento. O segundo género de bactérias gram negativa mais comum são as *Enterobacteriaceae* comumente isoladas da superfície de processamento em vários tipos de indústrias alimentares, principalmente em indústrias de processamento de origem animal tal como a carne proveniente de aves. *Acinetobacter* é o terceiro género de bactérias gram negativas frequentemente encontradas na indústria alimentar de peixes. Existem outras bactérias gram negativas como as *Rahnella* spp. e *Ralstonia* spp. que são isolados normalmente das superfícies de processamento de produtos agrícolas ou como as *Vibrio* spp. que são detetadas nas superfícies de processamento de salmão cultivado em água do mar (Moretro & Langsrud, 2017).

No que concerne às bactérias gram positivas estas são menos comuns que as bactérias gram negativas nas unidades de processamento de alimentos. A presença de bactérias gram positivas é mais comum nas indústrias de processamento de laticínios e de carnes do que em indústrias de processamento de peixe. As bactérias ácidas lácticas são mais frequentes nas indústrias de laticínios e são comuns vários géneros nas superfícies destas indústrias, como *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* e *Aerococcus*. *Aerococcus* spp. também são comuns em superfícies referentes a matadouros de animais. A *Staphylococcus* é um dos géneros gram positivos mais comuns encontrados em ambientes de produção de alimentos. *Bacillus* spp. são comuns no leite cru e em ambientes naturais, como o solo, e por isso facilmente introduzidos no ambiente de processamento de alimentos. *Bacillus cereus* adere às superfícies na forma de esporos, na indústria de laticínios. *Paenibacillus* e *Geobacillus* são outros géneros formadores de esporos comuns em superfícies alimentares (Moretro & Langsrud, 2017).

2.2.2. Superfícies Hospitalares

As infeções adquiridas no hospital ou infeções nosocomiais representam um grande problema de saúde pública, devido à frequência, gravidade, custos económicos e sociais e principalmente devido à dificuldade de controlo. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 8,7 % dos pacientes hospitalares adquirem infeções no hospital. As infeções podem ser de origem endógena – a infeção é proveniente da flora do paciente – ou exógena – proveniente de outros pacientes, da equipa ou do ambiente hospitalar, podendo ser da água, ar ou superfícies (Chaoui et al, 2019).

Os vírus podem contaminar e sobreviver em “ambientes inanimados”. A desinfecção do ambiente é uma parte importante nas estratégias de controlo de infeção por influenza, parainfluenza, vírus entéricos, vírus da hepatite B e coronavírus associado à síndrome respiratória aguda grave (SARS) (Hota, 2004).

As superfícies hospitalares podem ser contaminadas de forma duradoura por *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*, podendo estes microrganismos sobreviver entre três e catorze dias em superfícies secas, respetivamente. Este tipo de microrganismos coincide com os adquiridos pelos pacientes, após estes serem alojados nos quartos de hospital (Hota, 2004).

Os esporos de *Clostridium difficile* são duradouros e resistentes aos métodos de limpeza comuns. As taxas de contaminação causadas por esta bactéria chegam a atingir 58 % sendo que as superfícies e os equipamentos são os mais afetados (Hota, 2004).

Acinetobacter baumannii é uma bactéria gram negativa, causadora de vários surtos de infeções nosocomiais. O organismo pode estar presente em várias superfícies, como os equipamentos médicos, colchões, maçanetas, e ainda em humidificadores de ambiente (Hota, 2004).

Staphylococcus aureus resistente à meticilina (MRSA) é muito comum em hospitais e o principal mecanismo de transmissão é através dos profissionais de saúde. Foi encontrada *S. aureus* em coberturas de colchão e superfícies laminadas de plástico (Hota, 2004).

2.3. Desinfetante

O processo de desinfecção refere-se à redução antimicrobiana do número de microrganismos viáveis a um nível previamente especificado como apropriado para o manuseamento ou uso posterior pretendido. Este processo pode ser usado numa grande

variedade de aplicações, incluindo, superfícies, dispositivos, líquidos, produtos e alimentos (McDonnell, 2014).

A desinfecção, em grande parte dos casos, consegue eliminar os microrganismos no entanto raramente tem capacidade de eliminar esporos bacterianos. Quando se recorre a desinfetantes químicos e se prolonga o seu tempo de exposição, entre três e doze horas, estes mostram eficácia na eliminação de esporos (Rutala et al, 2019).

Os desinfetantes podem ser classificados tendo em conta os microrganismos que conseguem eliminar e a duração à exposição do desinfetante. Para exposições de cerca de 20 min é possível eliminar todos os microrganismos, designando-se por desinfetante de alto nível. Os desinfetantes de baixo nível eliminam a maioria das bactérias vegetativas, alguns fungos e alguns vírus, num período inferior a 10 min. Por último, os desinfetantes de nível intermédio podem ser usados para micobactérias, bactérias vegetativas e a maioria dos vírus e fungos (Rutala et al, 2019).

Quando um desinfetante apresenta no rótulo uma declaração idêntica a “mata 99,9 % dos germes”, isto é apenas uma declaração de marketing. Esta declaração não obriga que o produto mate 99,9 % dos microrganismos, apenas elimina em 99,9 % uma variedade específica, sendo que pode eliminar apenas três a quatro espécies de microrganismos. Legalmente, os desinfetantes devem apresentar no rótulo os microrganismos para os quais o produto foi testado e comprovadamente eficaz, assim como a diluição adequada e as instruções de uso. Por isso, quando o consumidor pretende adquirir um desinfetante é importante que verifique no rótulo se os microrganismos que o desinfetante elimina são os mesmos para os quais o consumidor necessita de proteção (The Hygiene Lab, 2019).

2.3.1. Enquadramento Legal

Os desinfetantes e outras preparações químicas e todas as substâncias consideradas como princípios ativos são regulados por uma entidade designada por *Agência Europeia dos Produtos Químicos* (ECHA), que promove a aplicação da legislação da União Europeia referente a produtos químicos com o objetivo de beneficiar a saúde humana e o ambiente, nunca esquecendo a inovação e a competitividade.

O regulamento relativo aos produtos biocidas, Regulamento (UE) n.º 528/2012 (RPB) é referente à colocação no mercado e utilização de produtos biocidas, que são utilizados para proteção dos seres humanos, animais, materiais ou artigos contra organismos patogénicos, como

parasitas ou bactérias, através da ação de substâncias ativas que estão presentes no produto biocida.

O regulamento tem como objetivos harmonizar o mercado na União Europeia, simplificar a aprovação de substâncias ativas e a autorização de produtos biocidas e introduzir prazos para as avaliações, elaboração de pareceres e tomadas de decisão dos Estados-Membros. Simultaneamente assegura um elevado nível de proteção da saúde humana e do ambiente, fomentando a redução dos ensaios em animais, apelando à utilização de métodos de ensaio alternativos.

Todos os produtos biocidas e as respetivas substâncias ativas contidas no produto biocida têm obrigatoriamente de ser aprovadas pela ECHA.

Os produtos biocidas são classificados em quatro grupos: grupo 1 – desinfetantes, grupo 2 – conservantes, grupo 3 – produtos de controlo de animais prejudiciais e grupo 4 – outros produtos biocidas.

Para estarem presentes num produto biocida, as substâncias ativas necessitam de ser aprovadas antes de ser concedida uma autorização para a sua incorporação o produto.

Inicialmente, as substâncias ativas são avaliadas pela autoridade competente do Estado-Membro responsável pela avaliação, em seguida os resultados dessa avaliação são encaminhados para o Comité dos Produtos Biocidas da ECHA, o qual elabora um parecer no prazo máximo de duzentos e setenta dias. Este parecer é a base da decisão sobre a aprovação concedida pela Comissão Europeia. A aprovação de uma substância ativa é concedida para um determinado número de anos, nunca excedendo os dez anos, sendo renovável.

Antes dos produtos biocidas serem disponibilizados no mercado é obrigatório a obtenção da autorização. Dependendo do produto e do número de países onde se pretende vender o mesmo, há diversos processos alternativos que as empresas podem optar para obterem a autorização do seu produto. Quando se pretende vender o produto num único mercado, a autorização desse país é suficiente, caso a empresa pretenda colocar o produto no mercado em diversos países, pode solicitar o reconhecimento mútuo da autorização do produto – autorização nacional e autorização por reconhecimento mútuo – o titular da autorização pode pedir a renovação à Autoridade Competente do Estado-Membro (ACEM). A autorização da União é referente à solicitação da autorização do produto para toda a União Europeia num único pedido. Por último, a autorização simplificada é utilizada para produtos que cumprem determinados

critérios especificados no Regulamento (UE) n.º 528/2012, por exemplo não conter substâncias que suscitem preocupação.

2.3.2. Características do Desinfetante

Idealmente, o desinfetante deve responder a vários fatores, como um amplo e completo espectro antimicrobiano, agir de forma rápida e persistentemente, ser seguro para o homem e o meio ambiente, ser compatível com o material a tratar, quimicamente estável, económico e fácil de utilizar (Saccucci et al, 2018).

O uso seguro, eficaz e prático de um desinfetante é a consideração de todas as características listadas anteriormente. Um dos aspetos mais importantes a ter em conta é a compatibilidade com superfícies ou produtos a serem tratados. Quando os desinfetantes são aplicados em contacto com a pele estes devem garantir a redução do número e de tipos específicos de microrganismos, mas sem danificar a pele. Isto é particularmente importante em situações em que o desinfetante é aplicado repetidamente. Devido à utilização rotineira do desinfetante por indivíduos ou a sua aplicação em superfícies para uma finalidade específica (por exemplo, um procedimento cirúrgico ou contacto com um produto alimentar) é de elevada importância ter em conta a toxicidade e os riscos associados à mesma. Nos últimos vinte anos, a utilização de vários antimicrobianos foi limitada/restrita e os biocidas que são utilizados, são extremamente regulados devido às consequências ambientais (McDonnell, 2014).

O uso de concentrações mais altas ou tempos de exposição mais longos muitas vezes podem causar efeitos indesejáveis, devido ao aumento do risco de danos às superfícies ou restrições práticas no uso do desinfetante. Nestes casos, é necessário repensar a formulação do produto para proporcionar melhorias significativas na atividade antimicrobiana e na compatibilidade com a superfície. A formulação pode ser melhorada utilizando a combinação de ingredientes, incluindo ingredientes antimicrobianos e inertes (McDonnell, 2014).

Na realidade, nenhum produto consegue responder na totalidade aos requisitos pretendidos, por isso as formulações desinfetantes são projetadas para maximizar os efeitos antimicrobianos, aumentar a estabilidade do produto e minimizar quaisquer impactos negativos (McDonnell, 2014).

2.3.3. O Desinfetante - Care Us

O desinfetante desenvolvido pela empresa *Success Gadget* é denominado por *Care Us* e consiste num desinfetante que foi desenvolvido para que seja aplicado em várias superfícies com características diferentes, e que além disso tenha efeitos duradouros.

O produto é composto por substâncias ativas, neste caso o peróxido de hidrogénio e o etanol, excipientes, tais como emulsionantes, agentes de limpeza, fixadores e partículas Sil2u®. A ausência da fórmula na presente dissertação, deve-se ao facto desta se encontrar protegida por sigilo industrial.

Os excipientes, como emulsionantes e ligantes visam garantir a estabilidade do peróxido de hidrogénio, com o objetivo final de garantir a maior durabilidade de produto. Os emulsionantes são uma substância ou um composto que atua como um estabilizador para emulsões, evitando a separação de líquidos que normalmente não se misturam, favorecendo as características físicas de emulsões e suspensões. (Helmenstine, 2020). Por sua vez, os ligantes são uma substância ou um composto com capacidade de aglomerar outras substâncias ou outros compostos, por meio de ligações químicas estáveis, entre o ligante e a molécula alvo.

2.3.4. Peróxido de Hidrogénio

O peróxido de hidrogénio foi produzido pela primeira vez em 1818 por Louis Jacques Thenard. No entanto, apenas em 1894, foi possível o seu isolamento, por destilação a vácuo. No final do século XIX, a fórmula correta do peróxido de hidrogénio foi finalmente descrita (Abdollahi & Hosseini, 2014).

O peróxido de hidrogénio é um composto químico com a fórmula H_2O_2 . A sua fórmula e a estrutura química deste composto são apresentados na Figura 1.

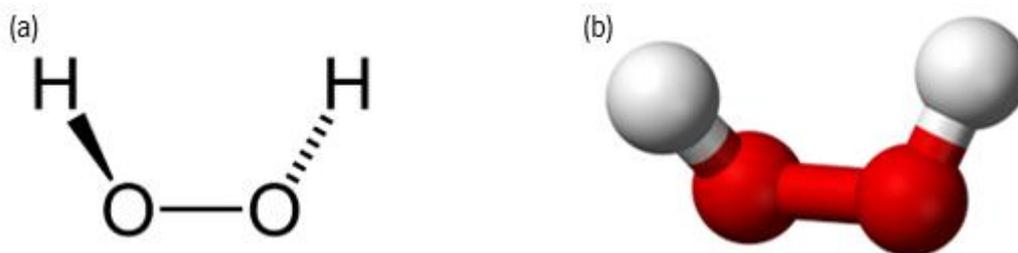


Figura 1 - (a) estrutura química e (b) esquema molecular do peróxido de hidrogénio (Wikipedia, 2021).

O peróxido de hidrogénio é um líquido inodoro e incolor com sabor amargo e ligeiramente mais viscoso que a água. As soluções aquosas altamente concentradas (>65 % em massa) de

peróxido de hidrogénio são solúveis numa ampla variedade de solventes orgânicos. Este composto apresenta aplicações químicas, funções biológicas, usos domésticos e terapêuticos, quer como agente antimicrobiano e oxidante. Pode ainda ser utilizado em aplicações de águas residuais municipais, como substituto da pré-cloração de modo a eliminar os odores provenientes de águas residuais e estações de tratamento. Cerca de 50 % da produção mundial de peróxido de hidrogénio é usado para aplicações industriais, como branqueamento de papel, celulose e têxtil (Abdollahi & Hosseini, 2014).

Como visto anteriormente há três considerações principais a ter em conta na formulação de um desinfetante: a atividade antimicrobiana, a compatibilidade com a superfície ou líquido a ser tratado e a segurança, quer para o consumidor final quer para o meio ambiente. Um composto capaz de responder a todos estes requisitos é o formulado com peróxido de hidrogénio, sendo que a forma como responde depende inteiramente de como é usado. Por exemplo, em concentrações baixas o peróxido de hidrogénio pode parecer relativamente inócuo, mas isso pode mudar drasticamente a concentrações mais elevadas ou se misturado inadvertidamente com outros produtos químicos (McDonnell, 2014).

As principais considerações no uso do peróxido de hidrogénio são a concentração do mesmo, a forma como é usado (em diluição em água, ou noutros produtos químicos ou na forma de gás), o tempo de contacto e a utilização segura do produto durante a sua aplicação (McDonnell, 2014).

O peróxido de hidrogénio é um antimicrobiano de amplo espectro que tem sido amplamente utilizado como antisséptico, desinfetante e agente esterilizante, durante muitos anos. Fornece um equilíbrio único de eficácia antimicrobiana e segurança para uma variedade de aplicações. É um composto de elevada importância no controlo de infeções, ao contrário da maioria dos desinfetantes, uma vez que não é afetado pela adição de matéria orgânica e sais. Face a estas propriedades apresenta um grande potencial de utilização em ambientes hospitalares (McDonnell, 2014) (Rutala et al, 2019) (Thompson, 2012).

O peróxido de hidrogénio quando exposto ao ar, produz o radical livre hidroxilo, ião altamente reativo, que é capaz de penetrar e destruir os lípidos da membrana, o DNA e outros componentes celulares essenciais, levando ao seu colapso. Apresenta ainda a capacidade de matar esporos, devido à remoção das proteínas do seu revestimento, expondo o núcleo ao desinfetante (Rutala et al, 2019) (Thompson, 2012).

Os microrganismos aeróbios e anaeróbios facultativos produzem uma enzima denominada catalase, para proteger as células do peróxido de hidrogénio, decompondo-o em água e oxigénio. Para ultrapassar este mecanismo de defesa dos microrganismos, devem ser utilizadas concentrações superiores de peróxido de hidrogénio para garantir a eficácia da desinfeção (Rutala et al, 2019).

A substância ativa, peróxido de hidrogénio é fabricado como solução aquosa contendo de 35 % a menos de 70 % (em massa) de peróxido de hidrogénio. As moléculas alvo do peróxido de hidrogénio incluem proteínas, ácidos nucleicos e lípidos, as reações químicas podem levar à desativação das funções celulares críticas e à morte celular. Os dados sobre o peróxido de hidrogénio e o produto biocida representativo demonstraram eficácia suficiente contra as espécies-alvo (ECHA, 2015).

Consoante a concentração, o peróxido de hidrogénio pode causar irritação local ou corrosão dos tecidos biológicos. As propriedades físico-químicas da substância ativa e do produto biocida foram avaliadas e são consideradas aceitáveis para a utilização, armazenamento e transporte adequados da substância ativa e dos produtos biocidas. Os efeitos secundários do peróxido de hidrogénio em humanos são limitados aos efeitos locais, no local do primeiro contato com o corpo e à embolia em casos acidentais com altas concentrações (ECHA, 2015).

Os cenários avaliados no que toca ao ambiente foram identificados como seguros, o peróxido de hidrogénio decompõe-se em água e oxigénio em diferentes compartimentos ambientais, isto é, em águas superficiais, solo, lodo ativo e ar. O peróxido de hidrogénio não é considerado uma substância persistente ou muito persistente, nem bioacumulativa ou muito bioacumulativa, nem tóxica. Para além do mais, não apresenta propriedades de desregulação endócrina, esta é uma vantagem muito específica e importante, pois os desreguladores endócrinos são um problema atual sério (ECHA, 2015).

O peróxido de hidrogénio é uma substância ativa autorizada para os PT (Product Type) 01 – higiene humana, PT 02 – desinfetante e algicidas não utilizados para a aplicação direta em humanos e animais, PT 03 – higiene veterinária, PT 04 – área de alimentação e ração, PT 05 – água potável e PT 06 – conservantes para produtos durante o armazenamento e está incluída no artigo 95 do regulamento de produtos biocidas, desde 2014 (ECHA, 2021).

2.3.5. Etanol

O etanol, ou álcool etílico, pertence a um grupo de compostos químicos, os álcoois, moléculas que contêm um grupo hidroxilo, OH, ligado a um átomo de carbono, como apresentado na Figura 2 (Coelho & Goldemberg, 2004).

O etanol é um líquido volátil, inflamável, incolor e com um leve odor característico. É produzido através de processos petroquímicos ou naturalmente pela fermentação de açúcares por leveduras. É um dos compostos orgânicos individuais mais importantes e disponível em quantidades ilimitadas. É um dos compostos mais versáteis, sendo utilizado como antisséptico e desinfetante na área médica e também como agente antimicrobiano em alimentos, contribuindo para o sabor e vida útil típicos dos alimentos alcoólicos fermentados. Além disso, a adição de baixas concentrações de etanol a alimentos embalados pode trazer efeitos benéficos, prolongando a vida útil do produto. O etanol é amplamente utilizado como solvente químico, seja para testes químicos científicos ou em síntese e produção de outros produtos orgânicos compostos (Criddle, 2005) (Engineering ToolBox, 2018).

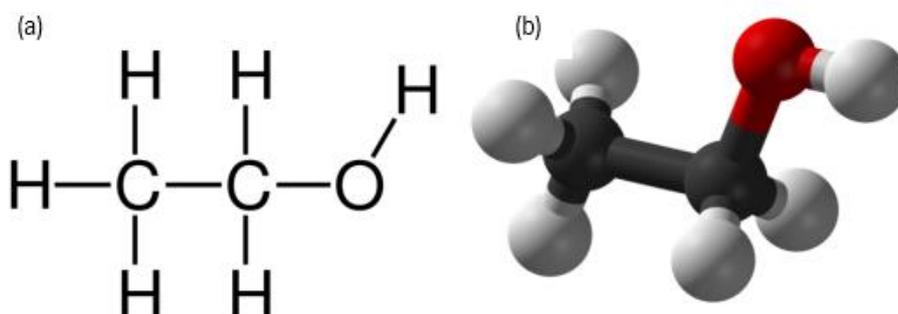


Figura 2 - (a) estrutura química e (b) esquema molecular do etanol (Wikipedia, 2021).

O etanol foi mencionado pela primeira vez na literatura em 1888, para o tratamento antisséptico das mãos. Desde então, o etanol tem sido usado como substância ativa em produtos de desinfetantes, como o único ingrediente ativo numa concentração entre 60 % e 95 %. Desde 1977, a OMS mantém uma lista de medicamentos indispensáveis, atualizada em 2019. Nessa lista, o etanol a 70 % aparece como antisséptico e na forma de desinfetantes à base de álcool a 80 %. O etanol pertence à lista básica de substâncias ativas de cuidados básicos que devem estar disponíveis (Verbund für Angewandte Hygiene (VAH) , 2020).

O mecanismo de atividade antimicrobiana do etanol está relacionado com os danos causados à membrana, associados à desnaturação de proteínas, que levam à perda de integridade

celular. A eficácia bactericida ideal é alcançada para concentrações entre 60 % a 90 %. Na realidade, o etanol absoluto, em que não está presente mais do que 1 % de água, é menos bactericida do que o etanol nas faixas mencionadas. Portanto, a água desempenha um papel fundamental na desnaturação de proteínas. O álcool apresenta atividade bactericida contra bactérias vegetais, mas não contra esporos (Golin et al, 2020).

O alvo viral dos desinfetantes à base de álcool é o envelope viral, que é derivado dos envelopes lipídicos do hospedeiro, o capsídeo da proteína, que contém e protege o material genético e o próprio material genético. Sendo que todos estes componentes são essenciais para o ciclo de vida viral e críticos para a sua capacidade de transmitir a outro hospedeiro, pode-se presumir que alterar a estrutura ou função de qualquer um dos componentes acima mencionados normalmente torna o vírus ineficaz (Golin et al, 2020).

A alta concentração de etanol tem-se mostrado altamente eficaz contra vírus com envelope, portanto, é eficaz contra a maioria dos vírus clinicamente relevantes. A eficácia contra vírus aumenta quando se adicionam ácidos à solução de etanol. A maioria dos desinfetantes à base de etanol continua a ser ineficaz contra os vírus sem envelope (Golin et al, 2020).

A baixas concentrações e quantidades, o etanol é rapidamente metabolizado ou sem danos aparentes. Em concentrações mais elevadas, como resultado de derrames, pode ter efeitos nefastos para o ambiente, devido à sua atividade antimicrobiana. Na natureza, em concentrações reduzidas, é transportado na água e no ar, uma vez que é solúvel em água e é volátil, pode ser transportado por longas distâncias. Representa uma boa fonte de nutrientes e energia para os microrganismos. O etanol oxida rapidamente em dióxido de carbono e água. No caso, de ausência de oxigénio, pode levar à formação de metano. No entanto, o etanol pode atuar como um precursor, levando à formação de poluição fotoquímica (Australian Government, Department of Agriculture, Water and the Environment, 2018).

O etanol é uma substância ativa autorizada para os PT 01 – higiene humana, PT 02 – desinfetantes e algicidas não utilizados para a aplicação direta em humanos e animais, PT 04 – área de alimentação e ração e PT 06 – conservantes para produtos durante o armazenamento e está incluída no artigo 95 do regulamento de produtos biocidas, desde 2014 (ECHA, 2021).

2.4. Técnicas de avaliação da atividade antimicrobiana

As propriedades de eficácia e durabilidade do desinfetante multi-superfícies de longa duração podem ser analisadas através da realização de vários testes com a finalidade de avaliar a atividade antimicrobiana na superfície a estudar.

2.4.1. Determinação qualitativa da atividade antibacteriana

O teste de difusão em agar corresponde a um ensaio simples e confiável para detetar a presença de atividade antibacteriana, baseado na presença ou ausência de uma zona de inibição (EUCAST, 2021).

Neste método, as células bacterianas são inoculadas em meio semissólido, agar, sobre o qual as amostras em estudo são colocadas em contacto. A ausência de crescimento à volta e debaixo da amostra indica a presença de atividade antibacteriana. O tamanho da zona de inibição induz uma estimativa da atividade antibacteriana. Se ocorrer difusão do agente antibacteriano no agar forma-se uma zona de inibição – halo – como mostra a Figura 3, em que o tamanho da mesma fornece uma estimativa da atividade antibacteriana ou da taxa de libertação do agente. Se não se verificar a formação de uma zona de inibição é possível concluir que o agente antibacteriano não tem capacidade de difusão no agar (Hudzicki, 2009) (Pinho et al, 2011).

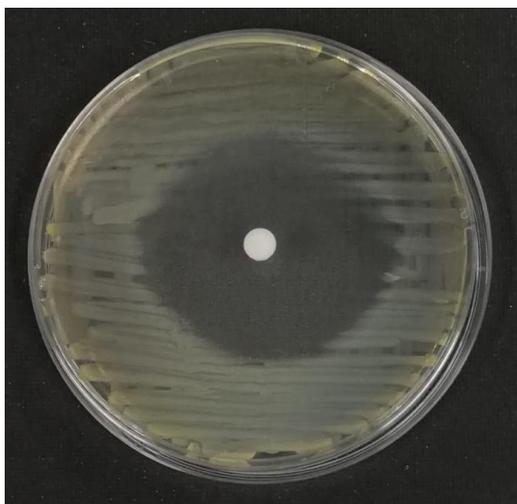


Figura 3 - Disco de difusão em agar com peróxido de hidrogénio com atividade antibacteriana, para *S. aureus*.

Este teste de difusão em agar é usado tanto para superfícies porosas como para superfícies não porosas e para uma grande variedade de microrganismos, como indicador da atividade antimicrobiana do produto em estudo.

2.4.2. Determinação quantitativa da atividade antibacteriana em superfícies porosas

Atualmente, o setor têxtil tem criado produtos têxteis com acabamentos antibacterianos, considerados superfícies porosas. Estes apareceram como resposta às necessidades do consumidor em garantir proteção contra os efeitos negativos causadas pelas bactérias. Portanto, a International Standards Organization desenvolveu a norma ISO 20743:2007, para determinar as propriedades da atividade antibacteriana e os métodos de teste a aplicar nos produtos têxteis antibacterianos, incluindo os não tecidos (ISO 20743, 2007) (Eurolab, 2007).

A presente norma expõe métodos de teste quantitativos para determinar a atividade antibacteriana de produtos têxteis antibacterianos. Os métodos em causa são independentes do tipo de agente antibacteriano usado, quer este seja orgânico ou inorgânico, natural ou sintético e também do método de aplicação. Adicionalmente, podem ser aplicados a um vasto leque de produtos têxteis, desde tecidos, fios e materiais para vários produtos, roupas, colchas, entre outros (ISO 20743, 2007) (Eurolab, 2007).

Consoante a aplicação final e o ambiente em que o produto têxtil será usado, deverá ser selecionado o mais adequado dos três métodos a seguir apresentados:

1. Método de absorção: método de avaliação no qual a suspensão bacteriana do teste é inoculada diretamente nas amostras;
2. Método de transferência: método de avaliação em que as bactérias do teste são colocadas numa placa de ágar e transferidas para as amostras;
3. Método de impressão: método de avaliação no qual as bactérias do teste são colocadas num filtro e impressas nas amostras.

Para a contabilização do número de bactérias são especificados o método de contagem de placas de colónias e o método de luminescência (ISO 20743, 2007) (Eurolab, 2007).

Staphylococcus aureus e *Klebsiella pneumoniae* são as duas bactérias que devem ser utilizadas para os testes realizados com recurso a esta norma (ISO 20743, 2007).

2.4.3. Determinação quantitativa da atividade antibacteriana em amostras não porosas

A norma ISO 22916:2011 foi desenvolvida pela International Organization for Standardization e especifica um método de avaliação da atividade antibacteriana em produtos plásticos e outras superfícies também não porosas tratadas com produtos antibacterianos (ISO 20743, 2007) (Eurolab, 2007).

O teste é um método quantitativo com resultados reprodutíveis. O seu objetivo é testar quantitativamente a capacidade do produto antimicrobiano de inibir ou eliminar o crescimento de microrganismos em superfícies plásticas, não porosas, durante um período de contacto de 24 h. É um método de teste muito sensível, uma vez que permite a deteção de baixos níveis de efeitos antibacterianos, durante um longo período. Durante a realização do teste, as concentrações bacterianas são padronizadas e as bactérias presentes são continuamente alimentadas durante o período de incubação, isso contrasta com alguns testes antimicrobianos, em que os microrganismos são incubados em suspensões não nutritivas, o que pode ser um fator de stress por longos períodos. Nesta norma é recomendado o uso de culturas de *S. aureus* e *Escherichia coli* (Eurolab, 2007) (ISO 22196, 2011).

2.4.4. Determinação da atividade antimicrobiana em superfícies do quotidiano

A norma ISO 18593:2004 especifica um método de avaliação para determinar a presença ou o número de microrganismos viáveis nas superfícies de utensílios, superfícies de trabalho e outros equipamentos em contacto com os alimentos para estimar o nível de contaminação durante a produção ou a eficácia dos protocolos de limpeza e desinfeção (ISO 18593, 2004).

Os métodos horizontais descritos nesta Norma incluem um método de contacto de superfícies usando placas de contacto e um método de cotonete. O método de placa de contacto é aplicável apenas em superfícies planas, enquanto o método de cotonete pode ser usado para todo o tipo de superfícies. Estes métodos devem ser apenas utilizados como uma análise de tendência uma vez que não são métodos quantitativamente confiáveis e reprodutíveis (ISO 18593, 2004).

2.4.5. Microrganismos em estudo

2.4.5.1. *Staphylococcus aureus*

O género *Staphylococcus* compreende atualmente mais de 50 espécies. Essas bactérias pequenas e resistentes encontram-se na pele e na membrana mucosa de muitas espécies de animais, incluindo a humana, estão também muito presentes no meio ambiente (Grace & Fetsch, 2018).

Staphylococcus foram isolados pela primeira vez em 1880, pelo cirurgião escocês Alexander Ogston, de um pus humano. Quando visualizadas ao microscópio estas eram semelhantes a um cacho de uvas, daí a sua denominação. Em 1886, o cirurgião alemão Anton J.

Rosenbach isolou duas espécies de *Staphylococcus* em cultura pura, em que uma delas seria *S. aureus*, apresentada na Figura 4, assim denominado devido a cor das suas colónias pigmentadas, *aureus* que significa dourado em latim (Grace & Fetsch, 2018).



Figura 4 - Cultura de *S. aureus* em Tryptic Soy Agar.

S. aureus é uma bactéria gram positiva pertencente à família *Micrococcaceae*. Consegue crescer em ambiente com temperaturas entre os 7 °C e os 46 °C, tem uma temperatura ótima de crescimento entre os 35 °C e os 37 °C. No que toca ao pH consegue crescer num intervalo de valores de 4,5 a 9,3, sendo que a taxa específica de crescimento é máxima quando os valores de pH se encontram entre 6,0 e 7,0. É uma bactéria reconhecida pela sua elevada osmotolerância pelo que consegue crescer em ambientes com valores de atividade de água superiores a 0,86 e com uma concentração de cloreto de sódio entre 5 % e 7 %. Por último é uma bactéria anaeróbia facultativa, pelo que cresce quer na presença ou ausência de oxigénio (ASAE, 2021).

S. aureus desempenha um papel importante de patógeno em humanos e outros animais. É uma causa comum de infeções de pele e doenças transmitidas por alimentos em humanos, bem como de infeções em hospitais e creches (Grace & Fetsch, 2018).

2.4.5.2. *Klebsiella pneumoniae*

O género *Klebsiella* pertence à família *Enterobacteriaceae* e foi nomeado em homenagem a um dos fundadores da microbiologia, Edwin Klebs. No entanto, apenas em 1882-83, este género de bactérias gram-negativas foi associado à pneumonia, por Carl Friedländer (Stürchler, 2016).

K. pneumoniae, apresentada na Figura 5, é uma bactéria gram negativa, encapsulada, anaeróbia facultativa em forma de bastonete, frequentemente encontrada na flora da boca, pele e intestinos, bem como em ambientes naturais (Wu & Li, 2015).

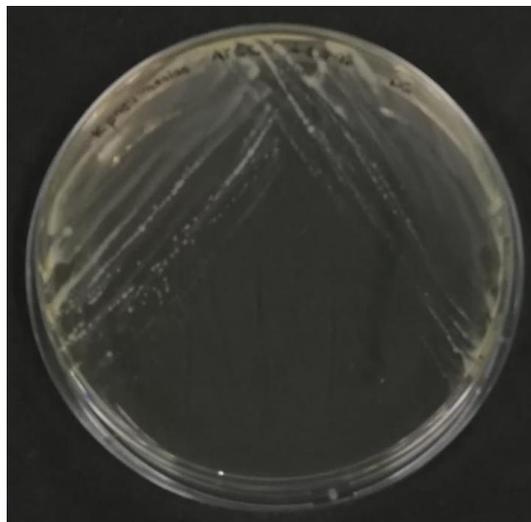


Figura 5 - Cultura de *K. pneumoniae* em Tryptic Soy Agar.

É um patógeno oportunista frequentemente relacionado com infecções em indivíduos comprometidos e debilitados. Esta bactéria gram negativa apresenta uma grande capacidade de resistência à ação de múltiplos antibióticos sendo de grande preocupação em ambientes hospitalares, onde pode causar infecções graves, como septicemia, pneumonia e infecção do trato urinário (Clegg & Sebghati, 2002) (Wu & Li, 2015).

2.4.5.3. *Escherichia coli*

O género *Escherichia* pertence à família *Enterobacteriaceae*. Este género contém um total de seis espécies, a saber, *E. coli*, *E. albertii*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* e *E. vulneris* (Samanta & Bandyopadhyay, 2020).

Escherichia coli foi identificada pela primeira vez em 1885, pelo Dr. Theodor Escherich, um pediatra alemão, que a denominou como *Bacterium coli commune*. O pediatra isolou a bactéria devido a estudos da flora intestinal de crianças. Posteriormente, detetou-se que a bactéria apresentava propriedades patogénicas associadas a infeção extraintestinal. Em 1919, Castellani e Chalmers definiram o género *Escherichia* e a *Bacterium coli* passou a denominar-se *E. coli* (Samanta & Bandyopadhyay, 2020) (Percival & Williams, 2014).

E. coli é uma bactéria gram negativa, facultativamente anaeróbica, em forma de bastonete curto, a sua forma varia de células esféricas a bastonetes alongados ou formas filamentosas longas. É uma bactéria não formadora de esporos e garante a sua mobilidade pela ação de flagelos peritricosos, apresentada na Figura 6 (Samanta & Bandyopadhyay, 2020) (Percival & Williams, 2014).

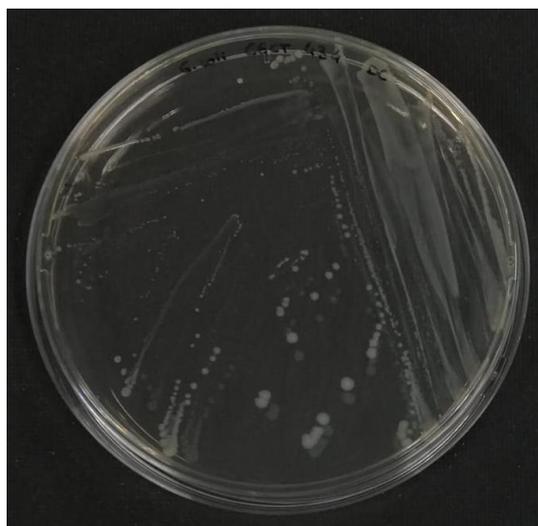


Figura 6 – Cultura de *E. coli* em Tryptic Soy Agar.

E. coli pode ser isolada de plantas e de uma grande variedade de animais. Embora esta seja principalmente um comensal de mamíferos, e em menor extensão de aves, pode ser isolada de uma variedade de espécies hospedeiras, bem como de solo, sedimentos e água. Fatores como o tamanho do corpo e a morfologia intestinal são determinantes na probabilidade de isolamento de *E. coli* de um determinado hospedeiro (Gordon, 2013).

2.5. Técnicas de caracterização da formulação

2.5.1. Determinação da estabilidade da formulação

O setor dos produtos farmacêuticos requer a maior compreensão possível do produto num curto espaço de tempo. Para isso foram desenvolvidas ferramentas que fornecem informações científicas substanciais, com relativa rapidez relacionadas a questões de desenvolvimento, investigação e controlo de alterações pertencentes a questões de ciclo de vida de produtos comerciais de longo prazo (Wicks et al, 2018).

O teste de estabilidade acelerada tem por objetivo principal simular o envelhecimento normal de uma formulação por aquecimento. Estes testes fornecem orientações úteis sobre o

desempenho do produto, após armazenamento. Caso a formulação apresente um mau desempenho no teste, significa que não tem uma vida útil satisfatória, em climas quentes ou temperados.

Os ensaios de estabilidade acelerada são considerados uma ferramenta preditiva que tem sido usada como um ensaio rápido para fornecer avaliação química dos produtos, principalmente farmacêuticos, e configurações de datas de validade estabelecidas (Malcolm, 2018).

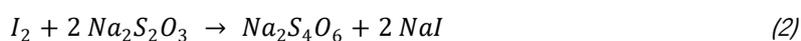
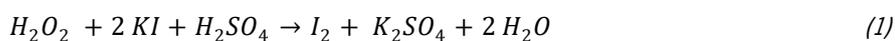
Os estudos de estabilidade permitem evidenciar de que forma a qualidade do produto em estudo se mantém ao longo do tempo, sob influência de diferentes fatores ambientais tais como temperatura, humidade e exposição à luz (Centro de Informação do Medicamento, 2012).

2.5.2. Titulação

A titulação é uma análise volumétrica que consiste em determinar quantidades de substância desconhecidas, ou concentrações desconhecidas – titulado –, por meio de medida de volumes, fazendo reagir uma solução de concentração conhecida – titulante – com a amostra cuja concentração ou quantidade é desconhecida. Para que o desconhecido possa ser determinado, é necessário, se possível, reconhecer em que ponto a reação termina e saber exatamente o volume da solução padrão que foi utilizado (Constantino et al, 2004).

Existem quatro tipos de titulações: titulação volumétrica ácido-base, em que ocorre a adição de um titulante básico a uma solução ácida – acidimetria – ou a adição de um titulante ácido a uma solução básica – alcalimetria –, titulação de complexação, consiste na formação de complexos solúveis, titulação por precipitação, baseia-se na formação de composto pouco solúveis e por último, titulação por oxidação-redução, ocorre a transferência de elétrons através de agentes oxidantes ou redutores.

No presente trabalho recorreu-se a uma titulação iodométrica – titulação por oxidação-redução – para a quantificação de peróxido de hidrogénio, seguindo a norma IS:7045-1973. A transferência de elétrons desta titulação é explicada pelas equações 1 e 2 e consiste na oxidação do iodeto, presente na solução de iodeto de potássio, em iodo, na presença de um catalisador de molibdato. O iodo formado na reação é titulado com solução de tiosulfato de sódio (USP technologies, 2021).



A reação de formação de iodo apresenta uma cor amarela, intensificada com a adição do catalisador. A reação termina quando a solução apresenta uma cor transparente por mais de trinta segundos (USP technologies, 2021).

CAPÍTULO 3. METODOLOGIA

3.1. Quantificação do princípio ativo – Peróxido de Hidrogénio

O peróxido de hidrogénio, sendo o principal princípio ativo do produto em estudo, foi quantificado na formulação do desinfetante e também nas superfícies porosas, neste caso as amostras têxteis após a aplicação do mesmo, para isso recorreu-se a uma titulação por iodometria.

3.1.1. Titulação do meio líquido por iodometria

Seguindo a norma IS:7045-1973, para quantificar o peróxido de hidrogénio presente na formulação do desinfetante em estudo procedeu-se à mistura de 10 g de formulação com 50 mL de água destilada, 10 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 20 % (v/v) e ainda 10 mL de iodeto de potássio (KI) a 1 % (m/v), bem como 2 gotas de molibdato de amónio, catalisador, mantendo sob agitação magnética. Em seguida fez-se a titulação da amostra com tiosulfato de sódio ($Na_2S_2O_3$) a 0,1 N, registando-se o volume necessário para que ocorra uma mudança de cor de castanho para incolor, e esta alteração seja mantida durante pelo menos 30 s, como demonstrado na Figura 7 (IS 7045, 1973).



Figura 7 - Titulação iodométrica para quantificação de peróxido de hidrogénio.

A percentagem de peróxido de hidrogénio foi calculada com base na equação 3, em que a % H_2O_2 representa a percentagem mássica de H_2O_2 presente na amostra, o $V_{Na_2S_2O_3}$ é o volume de tiosulfato de sódio (0,1 N) gasto na titulação, em mL, o valor de 0,1 corresponde à normalidade

da solução de tiosulfato de sódio e o valor de 1,7 corresponde à massa de H₂O₂ por cada 1 mL de tiosulfato de sódio (0,1 N) (IS 7045, 1973).

$$\% \text{H}_2\text{O}_2 = \frac{V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} \times 0,1 \times 1,7}{m_{\text{amostra}}} \quad (3)$$

3.1.2. Titulação do material têxtil por iodometria

Para quantificar o peróxido de hidrogénio presente nas amostras têxteis que foram utilizadas nos ensaios de atividade bacteriana fez-se um reajuste dos volumes a utilizar para a realização da titulação.

Foram utilizadas amostras têxteis com uma massa de (0,40 ± 0,05) g às quais adicionados 8 mL de água destilada e 0,8 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 20 % (v/v). Com o auxílio de uma vareta de vidro agitou-se e deixou-se repousar por 10 min. Na etapa seguinte acrescentou-se 0,8 mL de iodeto de potássio (KI), a 1 % (m/v), voltou-se a agitar e repousar no escuro devidamente, durante 20 min. Terminado o segundo tempo de repouso, adicionou-se 1 gota de molibdato de amónio, catalisador, colocando a solução sob agitação magnética. Em seguida fez-se a titulação da amostra com tiosulfato de sódio (Na₂S₂O₃) a 0,1 N, registando-se o volume necessário até que a solução se tornasse incolor e as amostras têxteis voltassem à cor inicial, durante pelo menos 30 s (IS 7045, 1973).

O cálculo da percentagem de peróxido de hidrogénio por amostra têxtil foi realizado com recurso à equação 3 (IS 7045, 1973).

3.2. **Ensaio de estabilidade acelerada**

O teste de estabilidade acelerada tem por objetivo principal fornecer orientações úteis sobre o desempenho do produto, assim sendo a formulação é colocada em estufa a (54 ± 2) °C durante 14 dias que é o equivalente a 2 anos de tempo de armazenamento em prateleira.

Para os ensaios de estabilidade acelerada foram colocados cerca de 40 mL de formulação em seis contentores de diagnóstico de 120 mL, foram analisados os tempos referentes ao dia 0, ao dia 7 e ao dia 14, para cada tempo correspondiam dois contentores, um para analisar por titulação do meio líquido por iodometria e outro para determinação da densidade e do pH da amostra.

3.2.1. Determinação da densidade

Para a determinação da densidade da formulação, foram escolhidos três picnômetros e as suas respectivas tampas, que tem de ter o mesmo número do recipiente de medida. Colocou-se o picnómetro vazio com a tampa na balança e registou-se a massa do mesmo, em g.

Com a pipeta de *Pasteur*, encheu-se o recipiente de medida de modo a evitar a formação de bolhas de ar. Acertou-se o nível da amostra, removendo o excesso de formulação com papel. Voltou-se a colocar o picnómetro na balança com o líquido e registou-se a massa do mesmo, em g. A densidade é determinada pela razão entre a diferença da massa do picnómetro cheio (m_c), em g, e massa do picnómetro vazio (m_v), em g e o volume real do picnómetro (V), em cm^3 , como apresentado na equação 4.

$$\rho \text{ (g/cm}^3\text{)} = \frac{m_c - m_v}{V} \quad (4)$$

3.2.2. Determinação do pH

Para a determinação do pH, foi utilizado um sensor *Hannah Instruments Edge*, como o demonstrado na Figura 8.



Figura 8 - Edge® Medidor de pH - HI2020.

Previamente à realização das leituras, o sensor do pH foi calibrado, para isso utilizaram-se as soluções tampão. O sensor foi colocado dentro de um frasco que continha a solução tampão e posteriormente era enxaguado e medida outra solução tampão, deste modo o sensor ficou calibrado.

Para a medição do pH da formulação, foi colocado o eléctrodo dentro do contentor de diagnóstico que continha formulação e anotado o valor demonstrado no visor.

3.3. Avaliação da Atividade Antimicrobiana

Este trabalho teve como objetivo a avaliação da atividade antimicrobiana do desinfetante em estudo para diferentes tempos de aplicação, nomeadamente 2 h, 24 h, 48 h e 7 dias, quer em materiais porosos, quer em materiais não porosos e, por fim, em superfícies do quotidiano. Para os ensaios de avaliação da atividade antibacteriana em materiais porosos, em particular nos têxteis, foi seguida a norma ISO 20743:2007. Os ensaios de atividade antibacteriana para os materiais não porosos, neste caso os alumínio, foram realizados de acordo com a norma ISO 22196:2011. Os ensaios de atividade antimicrobiana realizados em superfícies do quotidiano foram realizados segundo a norma ISO 18593:2004.

3.3.1. Microrganismos e condições de crescimento

Ao longo da realização dos vários ensaios, foram utilizadas culturas bacterianas de *S. aureus* ATCC 6538, de *K. pneumoniae* ATCC 11296 e de *E. coli* CECT 434. Estas culturas foram escolhidas uma vez que são recomendadas pelas normas utilizadas, a *K. pneumoniae* recomendada pela norma ISO 20743:2007, a *E. coli* recomendada pela norma ISO 22196:2011 e a *S. aureus* comum a ambas as normas.

Cada cultura bacteriana foi inoculada por esgotamento em meio *Tryptic Soy Agar* (TSA) (Anexo A.1), incubada durante 24 h a 37 °C, de maneira a obter colónias isoladas.

Para o crescimento das culturas bacterianas, foi retirada com uma ansa estéril uma colónia da cultura preparada anteriormente e transferiu-se para um matraz, onde previamente foram colocados 30 mL de *Tryptic Soy Broth* (TSB) (Anexo A.2) e incubado durante 18 h a 37 °C, com uma frequência de rotação de 120 min⁻¹.

O Anexo A apresenta a composição de todos os meios e soluções utilizados ao longo de todos os ensaios. Adicionalmente, é de salientar que todos os ensaios biológicos foram realizados em condições assépticas, em câmaras de fluxo laminar com recurso a material estéril.

3.3.2. Determinação das retas de calibração

De modo a garantir uma correlação entre a densidade ótica, a 620 nm, e a concentração celular (UFC-unidades formadores de colónias)/mL, procedeu-se à construção de uma reta de calibração para cada uma das culturas em estudo. A densidade ótica é quantificada para um comprimento de onda de 620 nm, uma vez que é a normalmente utilizada para medições de

suspensões celulares de bactérias, avaliando a turbidez de uma cultura microbiana estabelecendo uma relação entre a absorvância e a concentração celular (Grupo de Ciências Biológicas do IST, 2005).

Para esse efeito, inocularam-se as bactérias tal como explicado no ponto 3.3.1. Realizaram-se diversas diluições do inóculo em TSB. Mediu-se a densidade ótica das diluições a 620 nm e garantiu-se que estas se encontravam no intervalo de 0,1 a 1. Para cada diluição do inóculo determinou-se o número de colónias fazendo diluições de 1:10 em Tampão fosfato-salino (PBS- Phosphate-Buffered Saline) 1X (Anexo A.3). As colónias foram plaqueadas em TSA e incubaram-se as placas entre 18 h a 24 h a 37 °C. Depois da quantificação do número de colónias para cada diluição e a sua respetiva densidade ótica é possível estabelecer a relação destes dois parâmetros traçando-se uma reta de calibração, para cada cultura (Anexo B).

3.3.3. Testes de difusão em agar

Os testes de difusão em agar foram adaptados da norma ISO 20645:2004, iniciaram-se com a inoculação da bactéria em análise como explicado no ponto 3.3.1. Após o período de incubação mediu-se a densidade ótica do inóculo para determinação da concentração celular (UFC), com o auxílio da reta de calibração previamente definida. A concentração do inóculo foi ajustada para 1×10^9 /mL (ISO 20645, 2004).

Numa placa de Petri estéril, verteu-se cerca de 10 mL de TSA enquanto este ainda estava líquido, foram colocadas as amostras têxteis. De modo a impedir o seu enrolamento e assegurar a melhor aderência e para dificultar o enrolamento das mesmas, as amostras foram pulverizadas com o desinfetante antecipadamente consoante o tempo de aplicação a analisar. Num falcon estéril verteu-se 9 mL de TSA (arrefecido a cerca de 40 °C) e acrescentou-se 1 mL de inóculo com a concentração celular (UFC) de 1×10^9 /mL, ficando com a concentração final (UFC) de 1×10^8 /mL. Em seguida a mistura foi vertida sobre a placa que já continha as amostras. Após a solidificação do meio, a placa foi invertida e colocada a incubar a (37 ± 2) °C durante 24 h (ISO 20645, 2004).

3.3.4. Teste de disco – difusão em agar

No teste do disco, de difusão em agar, foram testados todos os co-formulantes líquidos presentes na formulação, com o objetivo de certificar a atividade antibacteriana das substâncias ativas, peróxido de hidrogénio e etanol, e que estas se encontram ativas.

Com essa finalidade, numa placa de Petri estéril, verteu-se cerca de 10 mL de TSA e deixou-se solidificar. Posteriormente, foram colocados 100 µL de inóculo com a concentração celular (UFC) de 1×10^3 /mL e espalhados com o auxílio de um cotonete humedecido no inóculo. Foram colocados os quatro discos de difusão brancos, humedecidos com 25 µL de cada um dos componentes líquidos da formulação, sendo estes, peróxido de hidrogénio, etanol, um componente que desempenha um papel de ligante e um outro com papel de emulsionante. No final, a placa foi invertida e colocada a incubar a (37 ± 2) °C durante 24 h (ISO 20645, 2004).

Este teste foi ainda utilizado na formulação, após esta ser submetida aos ensaios de estabilidade acelerada para garantir a efetividade antibacteriana dos princípios ativos, inclusive após os 14 dias sob temperaturas elevadas (ISO 20645, 2004).

3.3.5. Avaliação da atividade antibacteriana em materiais porosos

Os materiais porosos utilizados para avaliar a atividade antibacteriana do desinfetante, foram amostras têxteis. Para a realização destes ensaios foi seguida a norma ISO 20743:2007.

3.3.5.1. Amostras têxteis

Foram testados dois tipos de amostras têxteis, apresentados na Figura 9. A amostra 1 é um jersey simples que apresenta de gramagem 137 g/m^2 enquanto a amostra 2 é uma felpa americana, com o valor de gramagem de 306 g/m^2 . Este valor é importante para definir se existem perdas de espessura ao longo dos tratamentos ou para definir rendimentos aquando do corte/confeção. Além disso a diferença de gramagem entre as duas amostras indica claramente que a amostra 2 é mais densa do que a amostra 1.

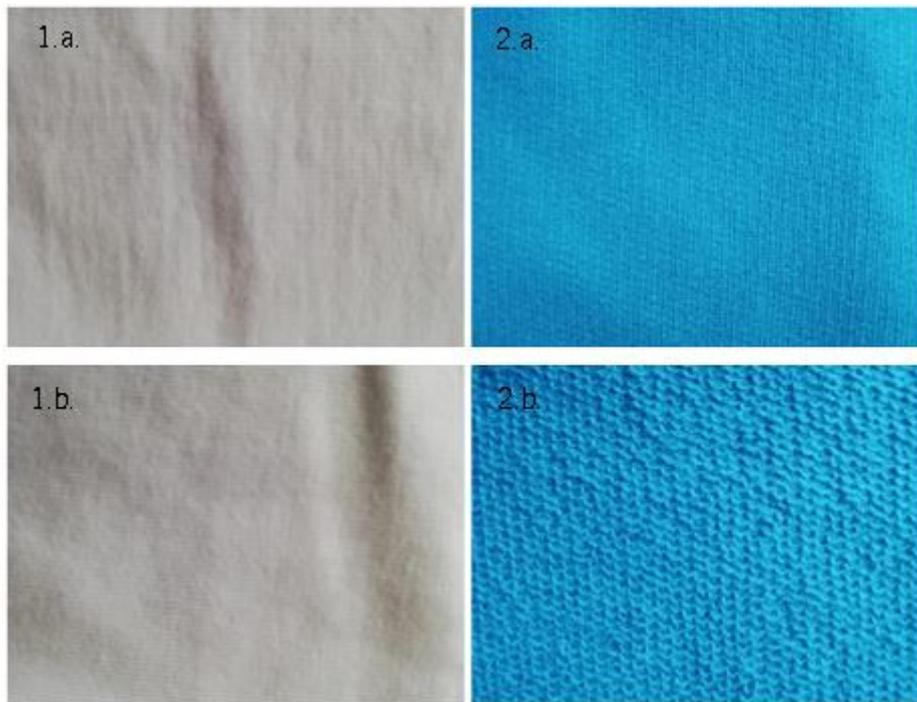


Figura 9 - Amostras têxteis utilizadas nos ensaios de atividade antibacteriana; 1.a.-amostra 1 face a testar; 1.b.- amostra 1 face inversa; 2.a.-amostra 2 face a testar; 2.b.-amostra 2 face inversa.

As amostras em estudo foram cortadas de modo a terem uma massa de $(0,40 \pm 0,05)$ g. Todas as amostras foram esterilizadas em autoclave a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 min e as amostras de controlo foram imediatamente colocadas em contentores de diagnóstico estéreis, enquanto as restantes foram pulverizadas com o desinfetante em estudo, consoante o tempo de aplicação a analisar e colocadas também em contentores de diagnóstico estéreis (ISO 20743, 2007).

3.3.5.2. Método de Contagem em Placa

O inóculo foi incubado como explicado no ponto 3.3.1. Após o período de incubação, procedeu-se à leitura da densidade ótica do inóculo, com a finalidade de determinar a sua concentração celular.

A concentração bacteriana (UFC) foi ajustada para estar dentro do intervalo exigido pela norma, $1 \times 10^5/\text{mL}$ a $3 \times 10^5/\text{mL}$. Para a obtenção de uma concentração celular final (UFC) de $2,5 \times 10^5 /\text{mL}$, recorreu-se à reta de calibração da cultura em estudo. Para ilustração do procedimento, tomado como exemplo a reta de calibração da *S. aureus* ATCC 6538, mostrada pela seguinte equação 5.

$$DO_m = 6 \times 10^{-10} C_i + 0,0313 \Leftrightarrow C_i = \frac{DO_m - 0,0313}{6 \times 10^{-10}} \Leftrightarrow C_i = x/\text{mL} \quad (5)$$

$$C_i V_i = C_f V_f \Leftrightarrow V_i = \frac{2,5 \times 10^7 / \text{mL} \times 10 \text{ mL}}{x / \text{mL}} \Leftrightarrow V_i = x \text{ mL} \quad (6)$$

$$C_i V_i = C_f V_f \Leftrightarrow V_i = \frac{2,5 \times 10^5 / \text{mL} \times 10 \text{ mL}}{2,5 \times 10^7 / \text{mL}} \Leftrightarrow V_i = 0,100 \text{ mL} \quad (7)$$

DO_m é a média das três leituras de densidade ótica a 620 nm, C_i é a concentração inicial, C_f é a concentração final, V_i é o volume inicial e V_f é o volume final (ISO 20743, 2007).

Após a obtenção da concentração celular (UFC) de $2,5 \times 10^5 / \text{mL}$, foram adicionados 200 μL de inóculo a cada amostra têxtil previamente colocados em contentores de diagnóstico de 120 mL estéreis. Posteriormente foram incubados a $(37 \pm 2) ^\circ\text{C}$ durante 24 h. Após o período de incubação, adicionaram-se 20 mL de solução de TSB com polisorbato 80 (Anexo A.4) e em seguida procedeu-se a agitação dos frascos durante 20 s. Retirou-se 1 mL da suspensão presente no contentor de diagnóstico para um tubo estéril (ISO 20743, 2007).

No caso das amostras de controlo de 24 h, devido ao elevado crescimento celular foi necessário proceder à realização de diluições em placas de 96 poços, onde se colocaram 180 μL de PBS 1 \times . Para a primeira diluição retiraram-se 20 μL da solução do tubo e adicionaram-se aos 180 μL de PBS 1 \times . Para as seguintes diluições tiram-se 20 μL do poço anterior e adicionaram-se aos 180 μL de PBS 1 \times , e assim sucessivamente até à diluição pretendida, como ilustrado na Figura 10 (ISO 20743, 2007).

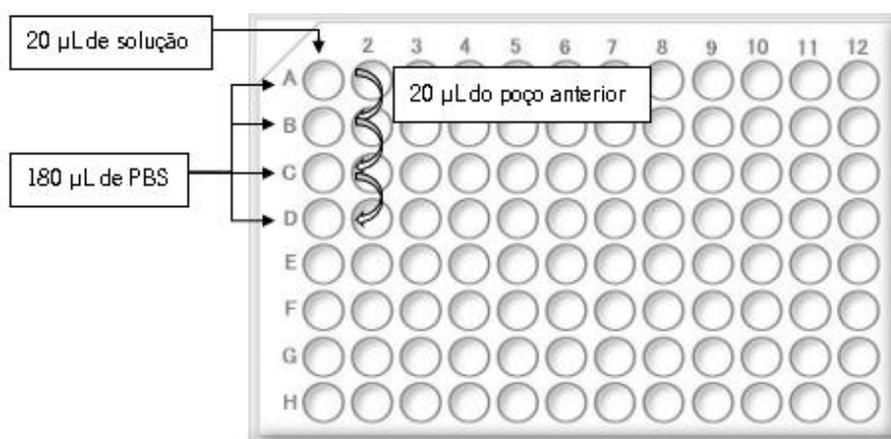


Figura 10 - Esquema de diluição em placa de 96 poços.

Quando terminadas as diluições, plaquearam-se 5 gotas de 10 μL , da mesma diluição para maior concordância dos resultados, em TSA. Após a secagem, inverteram-se as placas de Petri e levaram-se a incubar a $(37 \pm 2) ^\circ\text{C}$ durante 24 h (ISO 20743, 2007).

Para o teste ser considerado válido é necessário que as condições enumeradas em seguida sejam satisfeitas. A primeira condição indica que o inóculo do teste deve apresentar uma concentração celular (UFC) entre 1×10^5 /mL a 3×10^5 /mL. A segunda condição obriga a que a diferença dos extremos entre os três tecidos de controlo imediatamente após a inoculação e após a incubação, apresente um $\lg \leq 1$. Por último, a terceira condição refere-se ao fator de crescimento, calculado através da equação 8, obrigando a que este seja superior a 1.

$$F = \lg C_t - \lg C_0 \quad (8)$$

F representa o fator de crescimento nos têxteis de controlo, $\lg C_t$ é a média do logaritmo de base 10 do número de bactérias, em UFC/mL, obtida a partir das três amostras de têxtil de controlo após uma incubação de 18 h a 24 h e $\lg C_0$ é a média do logaritmo de base 10 do número de bactérias, em UFC/mL, obtida a partir das três amostras de têxtil de controlo imediatamente após a inoculação (ISO 20743, 2007).

Quando o teste é considerado eficaz, pode-se obter o valor da atividade antibacteriana de acordo com a equação 9.

$$A = \lg \frac{C_t}{C_0} - \lg \frac{T_t}{T_0} = F - G \quad (9)$$

A é o valor da atividade antibacteriana, F é o fator de crescimento nos têxteis de controlo, G é o fator de crescimento nos têxteis com aplicação de antibacteriano, $\lg T_t$ é a média do logaritmo de base 10 do número de bactérias, em UFC/mL, obtida a partir das três amostras de têxtil com aplicação de antibacteriano após uma incubação de 18 h a 24 h e $\lg T_0$ é a média do logaritmo de base 10 do número de bactérias, em UFC/mL, obtida a partir das três amostras de têxtil com aplicação de antibacteriano imediatamente após a inoculação. No caso de não se contabilizar nenhuma colónia, será considerado o logaritmo para uma colónia (ISO 20743, 2007).

3.3.6. Avaliação da atividade antibacteriana nas amostras não porosas

Os materiais não porosos utilizados para avaliar a atividade antibacteriana do desinfetante, foram amostras de alumínio. Para a realização destes ensaios foi seguida a norma ISO 22196:2011.

Após o período de incubação do inóculo como explicado no ponto 3.3.1, foi estimado o número de bactérias recorrendo ao espectrofotómetro, para leitura da densidade ótica. Foram realizadas três leituras de densidade ótica e após o cálculo do valor médio, este é utilizado para o cálculo da concentração inicial do inóculo, com recurso à reta de calibração, como explicado para

a norma ISO 20743:2007. Foi obtida inicialmente uma concentração celular (UFC) de 6×10^7 /mL e posteriormente uma concentração final (UFC) de 6×10^5 /mL (ISO 22196, 2011).

As amostras metálicas de tamanho 50 mm × 50 mm foram previamente esterilizadas em ambas as faces com radiação ultravioleta. Foram pulverizadas com o desinfetante, para o tempo de aplicação em estudo, e colocadas em placas de Petri estéreis, com a superfície a analisar voltada para cima (ISO 22196, 2011).

Em seguida, pipetaram-se 400 µL do inóculo na superfície da amostra, o inóculo foi coberto com um filme de polipropileno (PP) de tamanho 40 mm × 40 mm e pressionado para garantir que o inóculo cobria toda esta área. Colocou-se a tampa da placa de Petri e incubaram-se as amostras a uma temperatura de (37 ± 2) °C durante 24 h (ISO 22196, 2011).

Após a incubação, adicionou-se 10 mL de TSB na placa de Petri e colocou-se num agitador com uma frequência de rotação de 100 min^{-1} para homogeneizar. Com um raspador celular, raspou-se a superfície da amostra, para remover possíveis filmes celulares formados durante o tempo de incubação e retirou-se 1 mL de suspensão da placa de Petri para um tubo estéril. Quando necessário foram realizadas diluições como demonstrado anteriormente na Figura 10 (ISO 22196, 2011).

Analogamente ao ponto 3.3.5.2., plaquearam-se 5 gotas de 10 µL em TSA e depois de secas as placas de Petri foram invertidas e incubadas a (37 ± 2) °C durante 24 h (ISO 22196, 2011).

O número de células viáveis (N) foi calculado com base na equação 10, onde C é a média do número de células contadas, D é o fator de diluição usado nas placas contadas, V o volume, em mL, de TSB adicionado às placas de Petri e A a área, em mm², da superfície recoberta.

$$N = \frac{(100 \times C \times D \times V)}{A} \quad (10)$$

Para o ensaio ser considerado válido este tem de satisfazer as três condições seguintes. A primeira condição pretende que o valor logarítmico do número de bactérias viáveis recuperadas após a inoculação das amostras de teste não tratadas satisfaça o seguinte requisito

$$(\log_{\max} - \log_{\min})/\log_{\text{med}} < 0,2 \quad (11)$$

, onde \lg_{\max} é o logaritmo de base 10 do número máximo de bactérias viáveis contadas, \lg_{\min} é o logaritmo de base 10 do número mínimo de bactérias viáveis contadas e o \lg_{med} é o logaritmo de base 10 do número médio de bactérias viáveis contadas. A segunda condição estabelece que o número médio de bactérias viáveis contadas (UFC) imediatamente após a inoculação das amostras de teste não tratadas deve estar entre $6,2 \times 10^3/\text{cm}^2$ e $2,5 \times 10^4/\text{cm}^2$. Por fim, a última condição

refere que o número de bactérias viáveis (UFC) recuperadas de cada amostra de teste não tratada após incubação por 24 h não deve ser inferior a $6,2 \times 10^1 / \text{cm}^2$ (ISO 22196, 2011).

O valor de atividade antibacteriana (R) é calculado pela equação 12, em que U_0 é a média do logaritmo do número de bactérias viáveis, em UFC/cm², contadas das amostras não tratadas imediatamente após a inoculação, após 0 h, U_t é a média do logaritmo do número de bactérias viáveis, em UFC/cm², contadas das amostras não tratadas após incubação de 24 h e A_t média do logaritmo do número de bactérias viáveis, em UFC/cm², contadas das amostras tratadas após 24 h (ISO 22196, 2011).

$$R = (U_t - U_0) - (A_t - U_0) \quad (12)$$

No caso de não se contabilizar nenhuma colónia, será considerado o logaritmo para uma colónia (ISO 22196, 2011).

3.3.7. Avaliação da atividade antimicrobiana em superfícies do quotidiano

Para a análise do desempenho do desinfetante em estudo em superfícies do quotidiano foi aplicado o mesmo sobre estantes e secretárias utilizadas diariamente. O protocolo para estes ensaios foi adaptado da norma ISO 18593:2004.

Inicialmente foram definidas cinco zonas, referentes a um controlo e a tempos de aplicação de 2 h, 24 h, 48 h e 7 dias, como demonstrado na Figura 11. Estas zonas tinham uma área útil de 100 cm², delimitadas por uma zona coberta com fita-cola (ISO 18593, 2004).

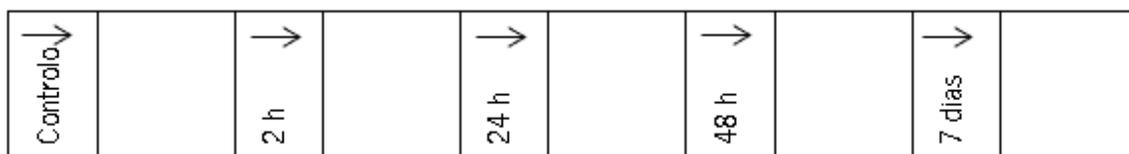


Figura 11 - Esquema da prateleira utilizada para os ensaios de atividade antimicrobiana em superfícies.

Na zona referente ao controlo não foi aplicado desinfetante, enquanto nas outras zonas foi aplicado consoante os tempos de aplicação em estudo.

Para a recolha da amostra, foi humidificada uma zaragatoa, num tubo onde foi colocado previamente cerca de 2 mL de PBS 1×, passando a zaragatoa pela superfície em paralelo e posteriormente em perpendicular, rodando sempre sobre ela própria (ISO 18593, 2004).

Por fim, a zaragatoa foi passada sobre uma placa de Petri contendo TSA, invertida e levada a incubar a $(37 \pm 2) ^\circ\text{C}$ durante 24 h, para o aparecimento de bactérias. Após essas 24 h, as

placas foram colocadas à temperatura ambiente durante 7 dias para analisar o surgimento de fungos e leveduras (ISO 18593, 2004).

CAPÍTULO 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

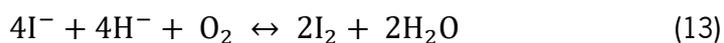
4.1. Formulação

4.1.1. Quantificação do Peróxido de Hidrogénio na formulação

Como o peróxido de hidrogénio é uma das substâncias ativas da formulação em estudo, é de elevada importância quantificá-lo, para garantir que as quantidades presentes no desinfetante são as desejadas. Os ensaios de quantificação do peróxido de hidrogénio foram realizados com recurso à titulação do meio líquido por iodometria, seguindo a norma IS:7045-1973, descrita no ponto 3.1.1.

O valor teórico de peróxido de hidrogénio na formulação é de 1,49 % (m/m) tendo-se obtido experimentalmente na formulação um valor de $(1,04 \pm 0,07)$ % (m/m).

As diferenças entre o valor teórico e o valor experimental podem ser explicados por uma possível degradação de peróxido de hidrogénio em água e oxigénio. O método utilizado é muito sensível, uma vez que depende da decisão do investigador de quando é o ponto final do ensaio, por ser um método colorimétrico. Adicionalmente, quando se utiliza uma solução de iodeto, em meio ácido, como é o caso da formulação em estudo, é necessário a realização imediata da titulação, para evitar a oxidação com o oxigénio atmosférico, como demonstrado na Equação 13. A taxa de reação aumenta para pH mais baixo, como a formulação em estudo que apresenta um pH de 4,01 a 26 °C, o que influencia a oxidação da solução de iodeto. Em condições neutras, a reação de iões iodeto e oxigénio é desprezível e em meio alcalino é completamente impraticável (Seely, 2020) (Ciesielski & Zakrzewski, 2006).



A concentração da solução de iodeto de potássio usada é inferior a 4 % (m/v), o que poderá potenciar perdas por volatilização, à temperatura ambiente (Seely, 2020) (Andrade, 2018).

4.1.2. Análise dos componentes da formulação

O teste do disco, de difusão em agar, foi utilizado para testar os co-formulantes e as substâncias ativas do produto, com a finalidade de certificar que as substâncias ativas são as únicas que desempenham um papel antimicrobiano e que o mesmo está a ser desempenhado como pretendido.

Nesse sentido, os formulantes líquidos foram testados para as três bactérias que se foram utilizadas ao longo dos ensaios, *S. aureus*, *K. pneumoniae* e *E. coli*, da esquerda para a direita na Figura 12.

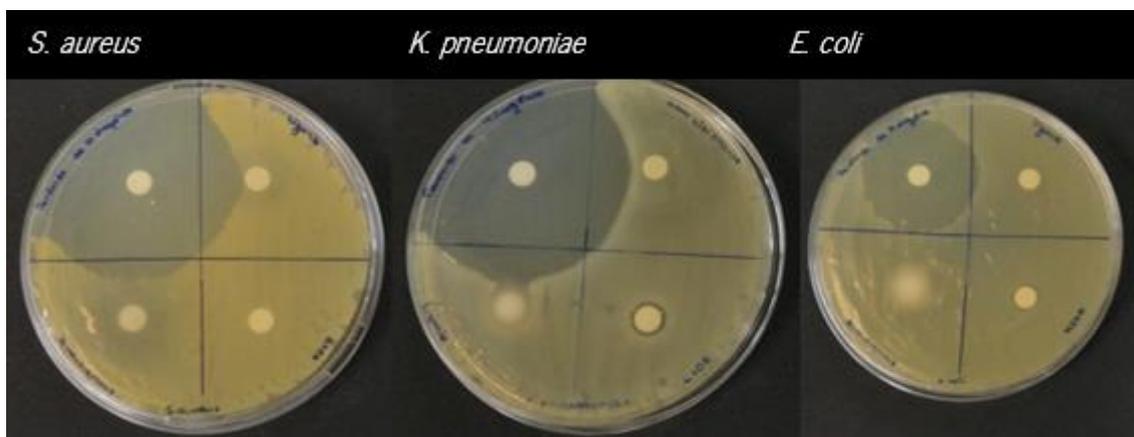


Figura 12 - Teste do disco, de difusão em agar, para os componentes líquidos da formulação.

A Figura 12 apresenta, no quadrante superior esquerdo, o peróxido de hidrogênio, que sendo uma das substâncias ativas apresentou halo à volta do disco de difusão, assim como no canto inferior direito, o etanol, apresenta um halo com dimensões francamente inferiores. O emulsionante, canto superior direito e o ligante, canto inferior esquerdo não apresentam halo em nenhuma das bactérias em estudo.

O halo formado à volta do disco com peróxido de hidrogênio é menor para a *E. coli* quando comparado com o halo apresentado pela *S. aureus* e pela *K. pneumoniae*, verificando assim que a *E. coli* é mais resistente à substância ativa em estudo. O mesmo se verifica para o caso do etanol que apresenta um halo mais definido para a *K. pneumoniae* quando comparado com as restantes bactérias.

4.2. Ensaio de estabilidade acelerada

O ensaio de estabilidade acelerada tem por objetivo principal simular o envelhecimento normal de uma formulação por aquecimento, para um tempo de armazenamento em prateleira de 2 anos.

O desinfetante foi colocado numa estufa, submetido a uma temperatura de $(54 \pm 2) ^\circ\text{C}$, durante 14 dias, foram analisados fatores como a densidade e o pH e realizados ensaios de quantificação do peróxido de hidrogênio, de modo a saber se ocorrem perdas significativas de substância ativa e quais são os fatores a melhorar, para obter um melhor desempenho. Os

parâmetros em análise foram estudados antes da colocação da formulação na estufa, ao 7º dia de ensaio e por fim, no 14º dia, que corresponde ao final da experiência. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Fatores analisados no ensaio de estabilidade acelerada em função do tempo de ensaio

Tempo/(dias)	Quantificação de Peróxido de Hidrogénio / % (m/m)	Densidade / (g/cm³)	pH
0	1,04 ± 0,07	0,93 ± 0,00	4,01 a 26 °C
7	0,84 ± 0,05	0,93 ± 0,00	3,25 a 30,3 °C
14	0,80 ± 0,03	0,93 ± 0,00	3,10 a 23,9 °C

Após o armazenamento a (54 ± 2) °C por catorze dias, o teor médio da substância ativa não deve ser inferior a 80 % em relação ao teor médio determinado antes do armazenamento da formulação. (Dobrat & Martijn, 1994). A percentagem de peróxido de hidrogénio desejável no final do ensaio de estabilidade acelerada seria de 0,83 % (m/m). Como demonstrado na Tabela 1. a percentagem de peróxido hidrogénio ao fim dos 14 dias de ensaio é de $(0,80 \pm 0,03)$ % (m/m), o valor desejável encontra-se dentro do intervalo calculado pelo valor experimental. É possível concluir que as perdas de peróxido de hidrogénio não colocam em causa a estabilidade do desinfetante, ao fim dos 14 dias de ensaio, que simulam o tempo de prateleira de dois anos de armazenamento.

A densidade de uma formulação define-se como o quociente entre a massa da formulação e o respetivo volume. Segundo a fórmula da densidade, esta é inversamente proporcional ao volume, sendo o volume uma grandeza que varia com a temperatura e a pressão. No caso de se aumentar a temperatura, as moléculas da formulação vão se expandir, aumentando o seu volume e consequentemente diminuindo a densidade, ou seja, a densidade é inversamente proporcional à temperatura. A formulação foi submetida a uma temperatura de (54 ± 2) °C e as leituras foram realizadas todas à mesma temperatura, 26 °C. O parâmetro da densidade não sofreu qualquer tipo de alteração ao longo do ensaio de estabilidade acelerada, como demonstrado na Tabela 1.

O pH é uma escala numérica adimensional, é uma medida quantitativa da acidez ou basicidade de soluções aquosas, que varia entre 0 e 14. A rigor, o pH traduz os valores da concentração do ião de hidrogénio presente na solução a analisar. A temperatura altera o equilíbrio

de dissociação da água, facilitando a dissociação das ligações de oxigênio e hidrogênio. O aumento da temperatura aumenta a atividade dos íons de hidrogênio, tornando a solução mais ácida. As leituras de pH apresentadas na Tabela 1., embora realizadas a temperaturas diferentes devido a problemas com a sonda de medição de pH, denotam essa tendência para uma redução do pH. O valor inicial de pH, a 26 °C era 4,01 e no final, a 23,9 °C diminuiu para 3,10. A estabilidade do peróxido de hidrogênio é máxima para pH entre 4,5 e 3,5, para um temperatura de 20 °C tendo em conta esta informação, o pH da formulação não está desajustado com aquele que seria o ideal (ECHA, 2015).

Com o propósito de analisar a atividade antibacteriana ao fim dos 14 dias de ensaio, foi realizado o teste do disco, de difusão em agar, como descrito no ponto 3.3.4., para *S. aureus*, *K. pneumoniae* e *E. coli*, apresentado na Figura 13.

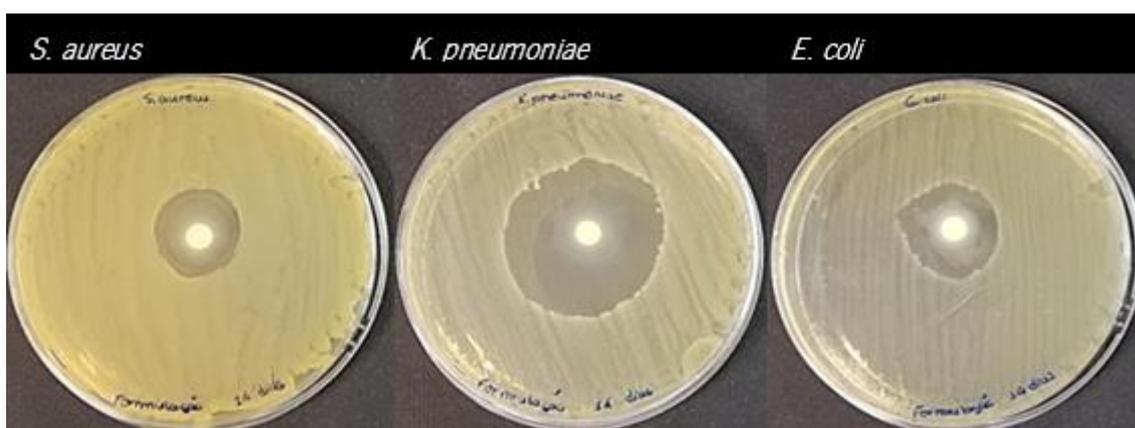


Figura 13 - Teste do disco, de difusão em agar, para as três bactérias em estudo.

Na Figura 13 é possível visualizar a presença de halos em torno dos discos, garantindo assim, que o desinfetante continua a garantir atividade antibacteriana após os 14 dias de ensaio, sendo um resultado expectável uma vez que não ocorreu uma perda de substância ativa fora dos limites aceitáveis.

Estes resultados estão de acordo com os resultados apresentados no ponto 4.1.2., sendo que a *K. pneumoniae* é a bactéria mais suscetível ao produto em estudo.

De acordo com os parâmetros analisados, a formulação não sofreu alterações preocupantes tendo em vista a sua atividade antibacteriana, no entanto é de elevada importância garantir a estabilidade do produto em causa. Uma solução para uma melhoria deste aspeto passaria pela possível adição de estabilizantes na formulação. Um estabilizador é qualquer

substância usada para preservar as propriedades físicas e químicas de um material e prevenir a degradação (Brenntag, 2021). Os estabilizadores auxiliam na extensão da vida útil dos materiais e na prevenção de falhas prematuras (Brenntag, 2021). No caso desta formulação, onde a substância ativa é o peróxido de hidrogénio podem ser adicionados estabilizadores como o ácido fosfórico e o ácido láctico, com capacidades de ajustar o pH, o fosfato de sódio, com capacidade de regulação de acidez e de quelante de certos minerais e nitrato de sódio, sulfato de sódio ou combinações dos mesmos, uma vez que reduzem drasticamente a decomposição do mesmo (ECHA, 2003). No entanto, alguns dos compostos sugeridos como estabilizadores de peróxido de hidrogénio apresentam problemas, como toxicidade, impacto ambiental e baixo desempenho.

4.3. Quantificação de peróxido de hidrogénio nas amostras têxteis

As amostras têxteis são as amostras representativas de superfícies porosas, que foram utilizadas nos ensaios de atividade antibacteriana e por isso foram pulverizadas com o produto em estudo. Neste sentido, é de elevada importância quantificar o peróxido de hidrogénio presente nas amostras, mas também as taxas de perda que podem ocorrer ao longo dos tempos de aplicação do ensaio.

Para a quantificação do peróxido de hidrogénio nas amostras têxteis foi empregue a norma IS:7045-1973, como descrita no ponto 3.1.2. e foram testadas as duas amostras que foram utilizadas ao longo de todos os ensaios de atividade antibacteriana. No entanto, a amostra 2 devido ao facto de apresentar coloração verde não permite que se visualize se existe peróxido de hidrogénio retido na amostra por isso optou-se por analisar apenas a amostra 1, de fácil visualização, o que leva a menos erros.

Neste ensaio pretendeu-se relacionar o tempo de aplicação de desinfetante com a percentagem de peróxido de hidrogénio presente nas amostras têxteis, a informação encontra-se representada na Figura 14.

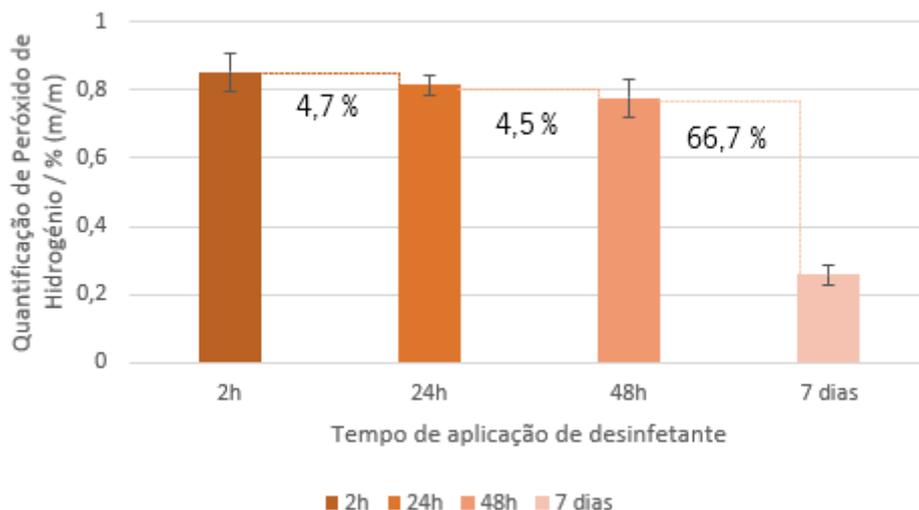


Figura 14 - Quantificação de peróxido de hidrogénio, por iodometria, em função do tempo de aplicação de desinfetante.

A quantificação de peróxido de hidrogénio foi calculada teoricamente para aferir se o valor teórico é próximo do valor experimental. Para a obtenção do valor teórico foi utilizada a massa da amostra que era de $(0,40 \pm 0,05)$ g, assim como a massa de produto aplicada para essa mesma massa, em g, sabendo que 1 *pump* de desinfetante tem normalmente de 0,11 g e foram aplicados 2 *pumps*. Tendo em conta a percentagem de peróxido de hidrogénio utilizada na formulação e a concentração a que o mesmo se encontra obtém-se um valor de $(0,85 \pm 0,08)$ % (m/m). A quantificação de peróxido de hidrogénio experimental é de $(0,85 \pm 0,06)$ % (m/m). O valor teórico coincide com o valor experimental, este é um ótimo indicador que a quantidade de peróxido de hidrogénio que a amostra apresenta é o mesmo que se pretende.

Comparando os dois intervalos de tempo entre as 2 h e as 24 h com as 24 h e as 48 h, é possível visualizar através da Figura 14 que a diminuição de substância ativa é muito semelhante, sendo de 4,7 % e 4,5 %, para o primeiro e segundo intervalo de tempo, respetivamente. Como os intervalos de tempo são idênticos, esperava-se também que a percentagem de redução de peróxido de hidrogénio também fosse próxima, assim como obtido.

Para o maior intervalo de tempo, das 48 h aos 7 dias, como seria de esperar, observa-se a maior decrescência no teor de peróxido de hidrogénio, correspondendo a perdas de 66,7 % de substância ativa.

4.4. Avaliação da atividade antibacteriana em superfícies porosas

4.4.1. Determinação do tipo de tratamento a aplicar nas amostras porosas

Antes de iniciar os ensaios com os tempos de aplicação do desinfetante em estudo, foi realizado um ensaio em que a variável a ter em conta era o tipo de tratamento de esterilização a aplicar nas amostras porosas, no caso desta dissertação em amostras têxteis.

Para isso foram consideradas três variáveis, a saber: esterilização por radiação ultravioleta, com exposição das amostras em ambas as faces a 30 min de radiação ultravioleta, numa câmara de fluxo laminar, a segunda variável foi a esterilização com recurso a autoclave, em que as amostras eram embrulhadas em papel de alumínio e levadas a esterilizar durante 20 min, a 120 °C e, por fim, a não aplicação de qualquer tipo de tratamento nas amostras têxteis.

Foi então aplicado o procedimento descrito na norma ISO 20743:2007 em amostras inoculadas com *S. aureus*, para um tempo de aplicação de desinfetante de 2 h.

Após a incubação das placas de Petri para contabilização das células, visualizou-se que para as placas da terceira variável de tratamento, em que não existia tratamento, estas apresentavam desenvolvimento fúngico. Sabendo que a contaminação fúngica pode alterar o crescimento e desenvolvimento das bactérias nas amostras, esta alternativa foi descartada.

No que se refere às amostras de controlo imediatamente após inoculação e com antibacteriano imediatamente após a inoculação, não existe grande diferença entre o número de células viáveis nos dois tipos de esterilização (Figura 15). Por sua vez, as amostras de controlo após incubação demonstram que o menor crescimento bacteriano ocorre para as amostras tratadas com radiação ultravioleta.

Quanto ao desempenho do desinfetante, analisado pelo lg do número de células viáveis das amostras após incubação, este demonstra elevada eficácia. As amostras em causa não apresentam qualquer tipo de crescimento bacteriano para ambos os processos de esterilização, ou seja, o desinfetante em estudo inibiu completamente o crescimento de *S. aureus* na superfície das amostras, como demonstrado na Figura 15.

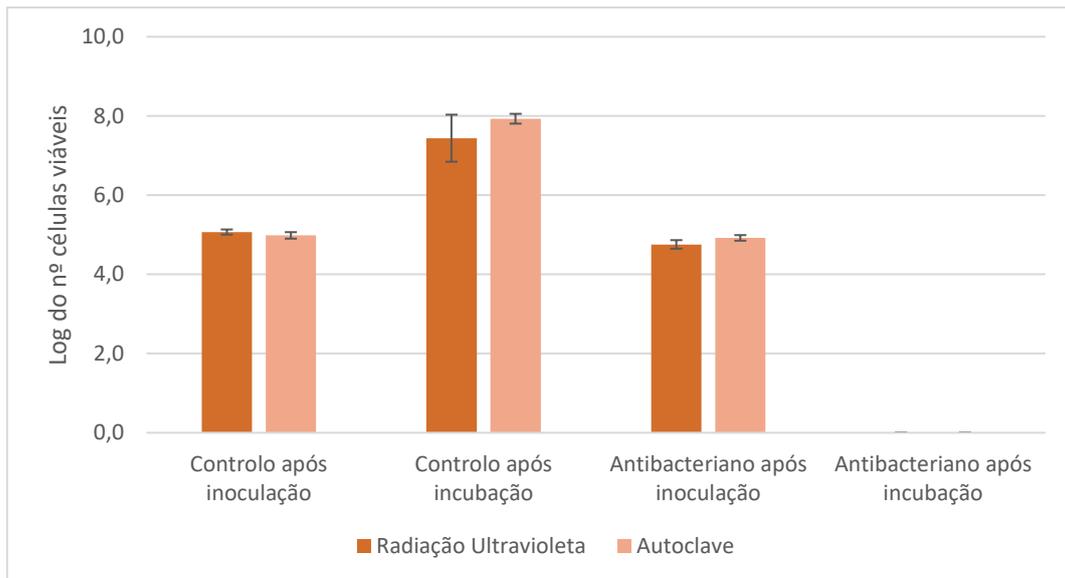


Figura 15 - Lg do número de células viáveis em função da variável de tratamento a aplicar nas amostras têxteis, para *S. aureus* com um tempo de aplicação de desinfetante de 2 h.

A radiação ultravioleta apresenta maior diferença entre os valores apresentados, como demonstrado pelas barras de erro presentes na Figura 15, o que não se verifica no tratamento com autoclave em que as barras de erro são as menores dos três métodos utilizados. Para além disso o tratamento com recurso a autoclave é o aconselhado pela norma ISO 20743:2007, por isso foi o procedimento adotado para os ensaios com os tempos de aplicação a estudar.

4.4.2. Determinação qualitativa da atividade antibacteriana das amostras porosas

De modo a obter um indicador de como se comportaria o desinfetante em estudo quando aplicado nas amostras têxteis posteriormente postas em contacto com bactérias gram positivas e gram negativas, recorreu-se à realização do teste de difusão em agar, como explicado no ponto 3.3.3., utilizando como bactérias indicadoras *S. aureus* e *K. pneumoniae*. A Figura 16 apresenta os resultados após a realização do teste.

No caso da amostra 1, é possível visualizar, na Figura 16 o desenvolvimento do halo em torno da amostra de tecido quando o tempo de aplicação de desinfetante corresponde a 2 h, adicionalmente, verifica-se que o halo referente a *K. pneumoniae* é de maior dimensão que o halo associado à *S. aureus*, o que está de acordo com os resultados anteriormente reportados nos pontos 4.1.2. e 4.2.

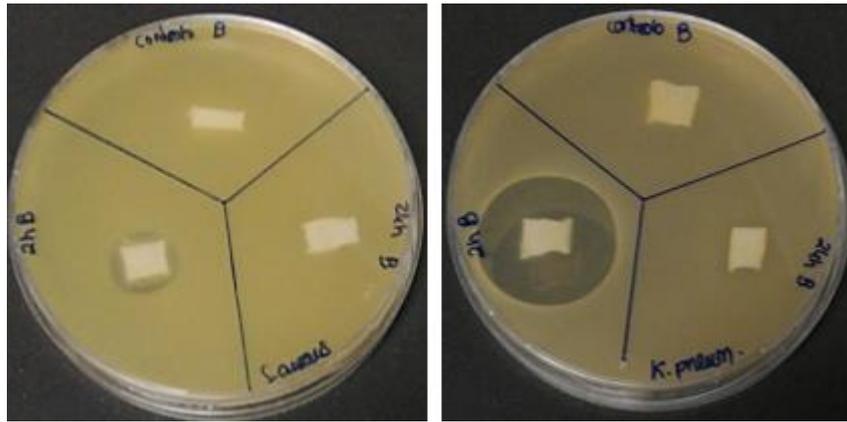


Figura 16 - Teste de difusão em agar, para a amostra 1 com o desinfetante em estudo, para tempos de aplicação de 2 h e 24 h, para *S. aureus*, do lado esquerdo, e *K. pneumoniae*, do lado direito.

Quanto às amostras referentes ao tempo de aplicação de desinfetante de 24 h não ocorre aparecimento de halo para nenhuma das bactérias. Uma possível explicação para esse facto é que a amostra 1 é caracterizada por um valor de gramagem de 137 g/m² uma vez que apresenta menor gramagem, quando os tempos de aplicação são mais longos tem maior dificuldade em desenvolver halo em torno da amostra, uma vez que sendo mais fina, apresenta maior dificuldade em reter a formulação na sua estrutura.

Este ensaio é qualitativo, funcionando apenas como indicador de atividade antibacteriana, o não aparecimento de halo nas amostras referentes a um tempo de aplicação de 24 h, não implica que as amostras em causa não possam apresentar atividade antibacteriana nos ensaios quantitativos.

Na Figura 17 podem observar-se os resultados obtidos para a amostra 2, no teste do halo.

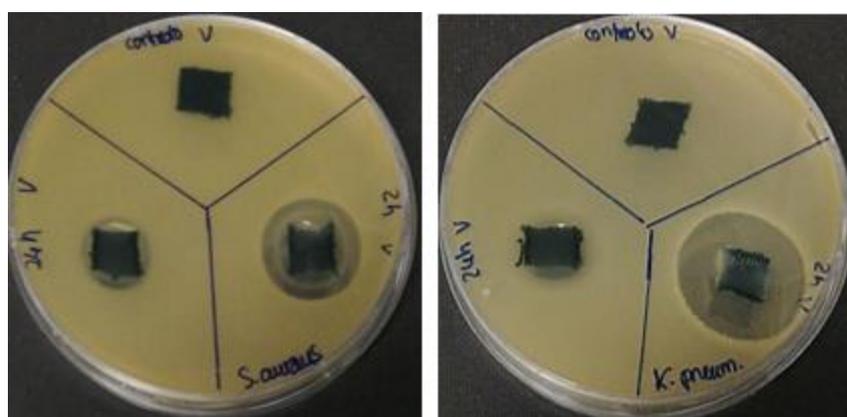


Figura 17 - Teste de difusão em agar, para a amostra 2 com o desinfetante em estudo, para tempos de aplicação de 2 h e 24 h, para *S. aureus*, do lado esquerdo, e *K. pneumoniae*, do lado direito.

A amostra 2 (Figura 17) mostra um halo após 2 h e 24 h de aplicação, o que pode ser explicado pelo seu valor de gramagem de 306 g/m², sendo uma amostra mais densa, com maior facilidade de retenção de desinfetante entre as suas fibras. No entanto como se pode ver na Figura 17, o halo formado à volta da amostra referente ao tempo de aplicação de 2h é superior ao halo com tempo de aplicação de 24 h, e isto deve-se ao facto de ocorrer perda de substância ativa (peróxido de hidrogénio) ao longo dos tempos de aplicação (Figura 14).

4.4.3. Determinação quantitativa da atividade antibacteriana das amostras porosas

Após os resultados positivos sobre a atividade antibacteriana nas amostras em estudo no ensaio de difusão em agar, demonstrado no ponto anterior, foram realizados ensaios, adaptados da norma ISO 20743:2007, como explicado no ponto 3.3.5, para os tempos de aplicação a analisar.

Nos ensaios realizados foram testadas as duas amostras, para as três bactérias em estudo, *S. aureus*, representativa de bactérias gram positiva e como bactérias gram negativas a *K. pneumoniae* e a *E. coli*.

Após a realização do ensaio, quando as placas referentes às amostras com tratamento foram retiradas da incubadora, visualizou-se que estas não apresentavam crescimento de colónias ou apenas apresentavam crescimento de uma colónia, sendo muito insignificante quando comparado com as placas das amostras de controlo, que apresentam um crescimento de colónias francamente superior.

Após a contagem das UFC e com recurso à equação 9, apresentada no ponto 3.3.5.2 foi possível determinar os valores de atividade antibacteriana para cada tempo de aplicação, de cada uma das amostras, apresentados na Tabela 2.

A primeira conclusão após análise da Tabela 2 é que o desinfetante apresenta atividade antibacteriana durante 7 dias quer para a bactéria gram positiva, *S. aureus*, quer para as bactérias gram negativas, *K. pneumoniae* e *E. coli* uma vez que todos os valores são superiores a 2. Considerando a norma JIS Z 2801: Teste de atividade antimicrobiana em plásticos, esta define que existe atividade antibacteriana para valores superiores a 2.

Como não existiu qualquer crescimento bacteriano nas amostras pulverizadas com desinfetante, as diferenças entre os valores de atividade antibacteriana devem-se ao crescimento nas amostras de controlo, que não foi igual para todas as bactérias, a *K. pneumoniae*, apresentou

menor crescimento e conseqüentemente os valores referentes à atividade antibacteriana são inferiores como apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores de atividade antibacteriana para cada tempo de aplicação em estudo, para as amostras têxteis inoculadas com *S. aureus*, *K. pneumoniae* e *E. coli*

Tempo de Aplicação	Atividade Antibacteriana					
	<i>S. aureus</i>		<i>K. pneumoniae</i>		<i>E. coli</i>	
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 1	Amostra 2
2 h	5,68	4,77	4,54	2,66	5,31	5,28
24 h	5,65	4,83	4,27	2,72	5,30	5,26
48 h	5,64	4,81	4,35	2,68	5,25	5,29
7 dias	5,71	4,89	4,20	2,65	5,35	5,26

Particularmente, a amostra 1 apresenta maior atividade antibacteriana quando comparada com a amostra 2, para os ensaios com *S. aureus*, e a *K. pneumoniae*, embora a amostra 1 tenha menor capacidade de fixação do desinfetante do que na amostra 2. Este facto provavelmente é justificado pela hidrofobicidade das amostras têxteis, a amostra 1 é mais hidrofílica quando comparada com a amostra 2, e sendo mais hidrofílica tem uma maior capacidade de fixar o inóculo e respetivo crescimento do mesmo, podendo até originar biofilmes microbianos (Hemmatian et al, 2021). Os biofilmes microbianos consistem em comunidades de microrganismos aderidos a uma superfície viva ou inerte (Barbosa et al, 2013). As bactérias incorporam-se numa matriz protetora altamente hidratada de substâncias poliméricas extracelulares excretadas pelas mesmas, que facilita a sobrevivência em ambientes hostis (Stoodley et al, 2013). O processo de formação do biofilme consiste em muitas etapas, começando pela adesão a uma superfície que leva a formação de uma micro-colónia, dando origem a estruturas tridimensionais e terminando, após o amadurecimento, com o desprendimento (Jamal et al, 2018).

Por outro lado, como a amostra 2 é mais hidrofóbica, o inóculo colocado sobre a amostra tem maior dificuldade em penetrar nos seus poros, portanto os microrganismos têm maior dificuldade em crescer. Isto não é verificado nos ensaios com *E. coli* uma vez que esta possui a mesma capacidade de crescimento quer na amostra 1 quer na amostra 2. Tanto *E. coli* como a *K. pneumoniae* apresentam uma parede celular composta por polissacarídeos e estes facilitam a

adesão a substratos têxteis mais hidrofóbicos. Por isso, as duas bactérias deviam apresentar a mesma capacidade de crescimento em ambas as amostras (Hemmatian et al, 2021). No entanto, o mesmo não se verifica, a diferença de comportamento de adesão ao inóculo pode ser justificada pelo arranjo das paredes celulares das bactérias, que diferem entre si. No caso da *K. pneumoniae*, esta apresenta uma parede celular composta de lipopolissacarídeo, lípido A, um oligossacarídeo central e uma cadeia lateral de polissacarídeo específico antígeno O. Em contraste com outras estruturas de *Enterobacteriaceae*, os oligossacarídeos da *K. pneumoniae* O:1 e O:8 não possuem resíduos de fosfato (Clegg & Sebghati, 2002). Por sua vez, a *E. coli* apresenta na sua parede celular lipopolissacarídeos antígenos O e antígenos flagelados H específicos da espécie (McAuley & Fegan, 2020). Outra diferença entre os núcleos de *K. pneumoniae* e *E. coli* reside na presença de ácido urónico na região do núcleo externo do primeiro e na presença de uma região contendo hexose do último (Clegg & Sebghati, 2002).

De um modo geral, o desinfetante em estudo, tem a mesma capacidade de inibir o crescimento de bactérias gram positivas e bactérias gram negativas, em superfícies porosas, uma vez que demonstrou, na maior parte dos ensaios, valores largamente superiores a 2 para atividade antibacteriana.

4.4.4. Determinação da atividade antibacteriana das amostras não porosas

Com a finalidade de estudar as propriedades antibacterianas em superfície não porosas, adaptou-se para protocolo a norma ISO 22196:2011, como explicado no ponto 3.3.6.

Para o estudo de superfícies não porosas, foram utilizadas amostras de alumínio onde se aplicou o desinfetante com os mesmos tempos de aplicação estudados nos ensaios das superfícies porosas.

Após a realização dos ensaios e com os resultados obtidos, foi possível calcular os valores de atividade antibacteriana, para as três bactérias em estudo. Na Tabela 3 estão apresentados os resultados de atividade antibacteriana para a *S. aureus*, *K. pneumoniae* e *E. coli*, em função do tempo de aplicação de desinfetante.

Numa primeira análise à Tabela 3 é possível verificar que a *S. aureus* apresenta os valores de atividade antibacterianas superiores a 2 até um tempo de aplicação de 48 h, isto é, as amostras de alumínio inibem o crescimento da *S. aureus* até às 48 h. Centrando nas bactérias gram negativas, a *K. pneumoniae* apresenta atividade antibacteriana até os 7 dias de aplicação, uma vez que todos os valores são claramente superiores a 2, enquanto a *E. coli* não apresenta atividade

antibacteriana, para nenhum dos tempos de aplicação. Verifica-se que a *E. coli* é resistente ao desinfetante, quando aplicado neste tipo de superfícies. Em concordância, no ponto 4.1.2., foi possível visualizar que a *E. coli* apresentava menor suscetibilidade ao peróxido de hidrogénio quando comparado com as restantes bactérias em análise.

Tabela 3 - Valores de atividade antibacteriana para cada tempo de aplicação em estudo, para as amostras de alumínio inoculadas com *S. aureus*, *K. pneumoniae* e *E. coli*

Tempo de aplicação	Atividade antibacteriana		
	<i>S. aureus</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>
2 h	5,47	4,25	1,67
24 h	3,06	4,25	1,20
48 h	3,49	3,57	1,06
7 dias	1,54	4,25	0,71

Quando se estabelece uma comparação entre as amostras com um tempo de aplicação de 24 h com as amostras de 48 h, é possível ver que o valor de atividade antibacteriana é superior para as amostras referentes às 48 h. Este é um valor anómalo uma vez que quanto maior a antecedência de aplicação de desinfetante, menor deveria ser a inibição da bactéria e, portanto, também, menor deveria ser a atividade antibacteriana. Esta discrepância poderá ser explicada por uma pulverização da superfície desigual, uma vez que para amostras com o mesmo tempo de aplicação, no mesmo ensaio, surgiram resultados diferentes, tendo amostras em que quase não ocorreu o crescimento de colónias e amostras em que o número de colónias era superior à centena. Adicionalmente, os fenómenos de adesão dos microrganismos são influenciados pelas propriedades do material e as condições ambientes. No processo de adesão, a hidrofobicidade, rugosidade e composição química das superfícies são fatores a ter em conta (Carvalho et al, 2013).

Em relação às amostras com tempo de aplicação de 7 dias sendo o valor de atividade antibacteriana inferior a 2, não se verifica atividade antibacteriana por parte do desinfetante, não inibindo o crescimento de *S. aureus* na superfície da amostra de alumínio. Face aos resultados de quantificação de peróxido de hidrogénio, apresentados no ponto 4.3., é possível verificar a redução superior a 50 % da substância ativa do desinfetante na amostra têxtil de 7 dias. Sabendo que a amostra têxtil tem maior facilidade de retenção de desinfetante do que as amostras de alumínio é

natural que as amostras de alumínio com tempo de aplicação de 7 dias não inibam o crescimento de *S. aureus*.

Para as bactérias gram negativas os valores de atividade antibacteriana apresentam grande diferença entre si, uma vez que a *K. pneumoniae* apresenta atividade antibacteriana até 7 dias de aplicação de desinfetante, contrariamente a *E. coli* que não apresenta, para nenhum tempo de aplicação de desinfetante, atividade antibacteriana.

A *K. pneumoniae*, não apresentou crescimento bacteriano nas amostras de alumínio para os tempos de aplicação de 2 h, 24 h e 7 dias. Quanto às amostras de alumínio referentes às 48 h, estas apenas apresentaram crescimento bacteriano num ensaio, esta possível discordância pode ser justificada por uma diferente pulverização nas amostras de um dos três ensaios realizados.

Por último, as amostras inoculadas com *E. coli* não apresentam atividade antibacteriana para nenhum dos tempos de aplicação em estudo. O crescimento da bactéria apresenta um ligeiro decréscimo quando comparado com as amostras de controlo, mas nunca suficiente para atingir valores superiores a 2, ou seja, valores em que se possa considerar que existe atividade antibacteriana. Esta ausência de atividade antibacteriana poderá ser justificada pelo diferente arranjo da parede celular, explicado anteriormente, mas também pelo desenvolvimento de colónias de alta densidade de *E. coli*. Como a *E. coli* é um microrganismo positivo para a catalase, isto é, é um microrganismo capaz de produzir catalase, quando se encontra em colónias de alta densidade, esta é capaz de produzir catalase suficiente para proteger as células contra o peróxido de hidrogénio presente na superfície, convertendo-o em água e oxigénio (Juven & Pierson, 1996). Embora todas as bactérias dos ensaios sejam microrganismos de catalase positiva não significa que todos tenham a mesma facilidade de produzir as quantidades necessárias desta enzima para dissociar o peróxido de hidrogénio e por isso proteger as suas colónias.

Em conclusão, como os alumínio são representativos de superfícies não porosas, este não tem a capacidade de reter o desinfetante na sua superfície, sendo suscetível que ao longo do tempo de aplicação vá ocorrendo evaporação da formulação pulverizada. Sendo assim, para as amostras com um tempo mais longo de aplicação, 7 dias, a formulação presente não tem a capacidade de inibir *S. aureus*, mas mantém a capacidade de inibir totalmente *K. pneumoniae*. No caso da *E. coli* nunca apresenta capacidade de inibição.

4.4.5. Determinação da atividade antibacteriana em superfícies do quotidiano

Após a realização dos ensaios em superfícies porosas e não porosas, em condições assépticas, achou-se por bem a realização de ensaios em superfícies do quotidiano, uma vez que esta seria a forma mais aproximada da realidade de utilização do desinfetante em estudo.

Seguindo a intenção de testar superfícies do quotidiano, a norma ISO 18593:2004 foi adaptada para protocolo e utilizada como explicado no ponto 3.3.7.

Na Figura 18 é apresentado o resultado das placas após 7 dias da realização do ensaio. As placas foram colocadas na incubadora, durante 24 h a $(37 \pm 2) ^\circ\text{C}$, para permitir o aparecimento de bactérias e nos restantes 7 dias foram colocadas à temperatura ambiente para o possível desenvolvimento de fungos.

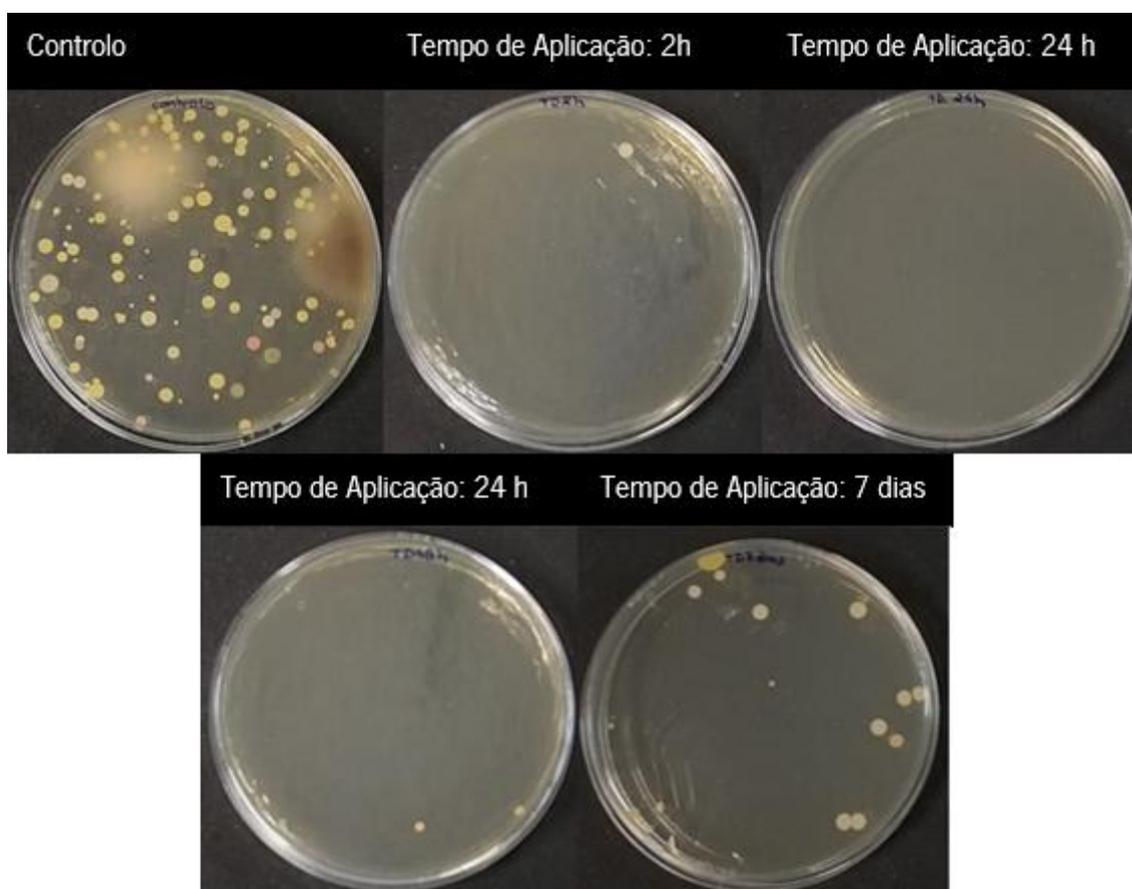


Figura 18 - Resultados do ensaio realizado em superfície do quotidiano.

A Figura 18 demonstra uma grande quantidade de colónias de bactérias e fungos, na amostra relativa ao controlo, que corresponde a uma zona da superfície onde não foi aplicado o desinfetante em estudo. Nas outras amostras onde foi aplicado o desinfetante com os respetivos

tempos de aplicação nota-se uma diminuição praticamente total da quantidade de bactérias e uma diminuição total de fungos.

As superfícies analisadas para o ensaio foram superfícies plásticas. Estas são consideradas superfícies não porosas assim sendo os resultados obtidos neste ensaio vão de acordo com os resultados obtidos nos ensaios realizados em condições assépticas de superfícies não porosas.

Na Figura 18 é de salientar a elevada inibição de crescimento microbiano nas amostras referentes a tempos de aplicação de 2 h, 24 h e 48 h. Quanto às amostras a 7 dias é possível visualizar uma redução de colónias bacterianas e uma total inibição fúngica, sendo por isso possível afirmar que o desinfetante em estudo apresenta o mesmo desempenho quer em condições assépticas, quer em condições reais.

CAPÍTULO 5. Conclusão e proposta de trabalho futuro

O presente projeto teve como objetivo o estudo da eficácia e da durabilidade de um desinfetante multi-superfícies de longa duração. Para isso, foram realizados ensaios para analisar a estabilidade da formulação, ensaios para determinar a atividade antibacteriana em superfícies porosas e não porosas utilizando amostras têxteis e amostras de alumínio, respetivamente, e ensaios de atividade antimicrobiana em superfícies do quotidiano.

Numa fase inicial, foi analisada a formulação, as substâncias ativas, os co-formulantes e a estabilidade da formulação. Inicialmente realizaram-se ensaios de iodometria para quantificar o peróxido de hidrogénio na formulação, sendo o valor experimental de $(1,04 \pm 0,07) \%$ (m/m). Considerando as substâncias ativas, o peróxido de hidrogénio e o etanol, e os co-formulantes, um ligante e um emulsionante, foram realizados ensaios de difusão em agar, para os três microrganismos em estudo. Através destes ensaios, concluiu-se que a *K. pneumoniae* é a bactéria mais suscetível às duas substâncias ativas e a *E. coli* é a bactéria mais resistente. Demonstrou-se que a formulação ao fim de 14 dias a 54 °C apresentava-se estável, sendo que os 14 dias em estufa correspondem a 2 anos de armazenamento em prateleira. Nesse ensaio foram estudados três parâmetros, a quantificação do peróxido de hidrogénio, a densidade e o pH. A percentagem de peróxido de hidrogénio diminuiu ao longo dos 14 dias do ensaio, para um valor experimental de $(0,80 \pm 0,03) \%$ (m/m). Quanto ao parâmetro da densidade este não sofreu qualquer alteração e o pH diminuiu, assim como esperado, devido a ter sido submetido a temperaturas elevadas, as interações dos grupos hidroxilo aumentaram favorecendo uma diminuição do pH.

Numa segunda fase, estudou-se a atividade antibacteriana em superfícies porosas, com dois tipos de amostras têxteis, seguindo a norma ISO 20743:2007, o produto demonstrou atividade antibacteriana para tempos de aplicação de desinfetante até 7 dias, para as três bactérias em estudo.

Para superfícies não porosas, foram realizados ensaios com amostras de alumínio, adaptando para protocolo a norma ISO 22196:2011, as amostras apresentaram atividade antibacteriana até 7 dias de aplicação de desinfetante, para a *K. pneumoniae*. Por sua vez, para a *S. aureus*, as amostras demonstraram atividade antibacteriana até 48 h após a aplicação de desinfetante e em relação a *E. coli*, as amostras não apresentaram atividade antibacteriana para nenhum dos tempos de aplicação.

O último ponto de estudo centra-se na atividade antimicrobiana em superfícies do quotidiano onde se obtiveram resultados de total inibição fúngica e grande inibição bacteriana nas superfícies após 7 dias de aplicação de desinfetante.

Com este estudo demonstrou-se, assim, que o desinfetante tem uma atuação antimicrobiana de pelo menos 7 dias.

O trabalho desenvolvido no âmbito desta investigação permitiu antever a necessidade de aprofundar o estudo em vários pontos. Numa primeira etapa, será necessário aumentar a estabilidade da formulação de modo a evitar as perdas de substância ativa ao longo de tempo e manter o pH num intervalo que garanta maior estabilidade para o peróxido de hidrogénio. Numa segunda etapa, deverão ser realizados ensaios de atividade antifúngica de modo a saber se o desinfetante tem o mesmo comportamento de quando se realizou o ensaio de atividade antimicrobiana em superfícies do quotidiano. Por último, deverão ser realizados ensaios de atividade antivírica de modo a completar toda a informação do desempenho do desinfetante.

Bibliografia

- Abdollahi, M., & Hosseini, A. (2014). *Hydrogen Peroxide*, pp. 967-970.
- Andrade, J. C. (17 de setembro de 2018). Revista Chemkeys. *Determinações Iodométricas*, pp. 1-6. Obtido em 7 de outubro de 2021, de <https://econtents.bc.unicamp.br/inpec/index.php/chemkeys/article/view/9623>
- ASAE. (01 de setembro de 2021). *Staphylococcus aureus*. Obtido de Autoridade de Segurança Alimentar e Económica: <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-biologicos/staphylococcus-aureus.aspx>
- Australian Government, Department of Agriculture, Water and the Environment. (1 de novembro de 2018). *Ethanol (ethyl alcohol)*. Obtido de National Pollutant Inventory: <http://www.npi.gov.au/resource/ethanol-ethyl-alcohol>
- Barbosa, D. B., Monteiro, D. R., Takamyia, A. S., Camargo, E. R., Agostinho, A., Delbem, A. C., & Pessan, J. P. (2013). Chapter 9 - Silver and Phosphate Nanoparticles: Antimicrobial Approach and Caries Prevention Application. Em K. Subramani, W. Ahmed, & J. K. Hartsfield, *Nanobiomaterials in Clinical Dentistry* (pp. 187-202). William Andrew Publishing.
- Brenntag. (2021). *Guide to Stabilizers*. Obtido em 8 de outubro de 2021, de Brenntag: https://www.brenntag.com/en-us/industries/coatings-construction/guide-to-stabilizers/#content_row_1
- Carvalho, I. H., Oliveira, J. C., Alves, C. F., Piedade, A. P., & Carvalho, S. (17 de junho de 2013). Influence of surface features on the adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to Ag-TiCN thin films. *Sci Technol Adv Mater*.
- Centro de Informação do Medicamento. (janeiro/fevereiro de 2012). Boletim do cim. *Estudos de estabilidade e prazos de validade de produtos farmacêuticos*.
- Chaoui, L., Mhand, R., Mellouki, F., & Rhallabi, N. (2019). Contamination of the Surfaces of a Health Care Environment by Multidrug-Resistant (MDR) Bacteria. *International Journal of Microbiology*.
- Ciesielski, W., & Zakrzewski, R. (1 de janeiro de 2006). Iodimetric Titration of Sulfur Compounds in Alkaline Medium. *Chemia Analityczna*.
- Clegg, S., & Sebghati, T. A. (2002). 77 - *Klebsiella pneumoniae*. Em M. Sussman, *Molecular Medical Microbiology* (pp. 1655-1680). Academic Press.

- Coelho, S. T., & Goldemberg, J. (2004). Alternative Transportation Fuels: Contemporary Case Studies. Em C. J. Cleveland, *Encyclopedia of Energy* (pp. 67-80). Elsevier.
- Constantino, M. G., Silva, G. V., & Donate, P. M. (2004). Análise Volumétrica - Titulação. Em M. G. Constantino, G. V. Silva, & P. M. Donate, *Fundamentos de Química Experimental Vol. 53* (pp. 79-87).
- Criddle, W. J. (2005). ETHANOL. Em P. Worsfold, A. Townshend, & C. Poole, *Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition)* (pp. 562-569). Elsevier.
- Culp, J. T. (2015). Chapter 5 - Flexible Solid Sorbents for CO₂ Capture and Separation. Em F. Shi, & B. Morreale, *Novel Materials for Carbon Dioxide Mitigation Technology* (pp. 149-176). National Energy Technology Laboratory, U.S. Department of Energy, Pittsburgh, PA, USA: Elsevier.
- Dobrat, W., & Martijn, A. (1994). *CIPAC Handbook: Physico-chemical methods for technical and formulated pesticides*. Collaborative International Pesticides Analytical Council.
- ECHA. (2003). *Hydrogen Peroxide - Risk Assessment*.
- ECHA. (2015). *Evaluation of active substances - Hydrogen peroxide*. Filândia.
- ECHA. (2015). *Opinion on the application for approval of the active substance: Hydrogen Peroxide*. Helsinquia, Filândia.
- ECHA. (26 de Agosto de 2021). *Article 95 List*. Obtido de ECHA - European Chemicals Agency: https://echa.europa.eu/documents/10162/5604808/art_95_list_en.pdf/c752c5ae-358c-e84b-652a-fb98106dfe8e?t=1630391631573
- Engineering ToolBox. (2018). *Ethanol - Thermophysical properties (online)*. Obtido de https://www.engineeringtoolbox.com/ethanol-ethyl-alcohol-properties-C2H6O-d_2027.html
- EUCAST. (2021). *EUCAST Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing*.
- Eurolab. (2007). *ISO 20743 Textile - Antibacterial Determination of Antibacterial Activity in Finished Fabrics*. Obtido em 01 de setembro de 2021, de Eurolab Laboratory Services: <https://www.laboratuar.com/en/testler/medikal/iso-20743-tekstil-antibakterial-aprenlenmis-kumaslarda-antibakteriyel-aktivitenin-tayini/>
- Golin, A. P., Choi, D., & Ghaharu, A. (setembro de 2020). Hand sanitizers: A review of ingredients, mechanisms of action, modes of delivery, and efficacy against coronaviruses. *Am J Infect Control*, 1062-1067.

- Gordon, D. M. (2013). Chapter 1 - The ecology of *Escherichia coli*. Em M. S. Donnenberg, *Escherichia coli (Second Edition)* (pp. 3-20). Academic Press.
- Grace, D., & Fetsch, A. (2018). Em A. Fetsch, *Staphylococcus aureus* (pp. 3-10).
- Grupo de Ciências Biológicas do IST. (18 de novembro de 2005). *Acompanhamento da curva de crescimento*. Obtido de e-escola: <http://e-escola.tecnico.ulisboa.pt/topico.asp?id=235&ordem=4>
- Helmenstine, A. M. (27 de agosto de 2020). *Emulsifier Definition: Emulsifying Agent*. Obtido de ThoughtCo: thoughtco.com/definition-of-emulsifier-or-emulsifying-agent-605085
- Hemmatian, T., Lee, H., & Kim, J. (11 de janeiro de 2021). Bacteria Adhesion of Textiles Influenced by Wettability and Pore Characteristics of Fibrous Substrates. *Polymers (Basel)*, p. 13:223.
- Hota, B. (2004). Contamination, disinfection, and cross-colonization: are hospital surfaces reservoirs for nosocomial infection? *Clinical Infectious Diseases*, 1182-1189.
- Hudzicki, J. (2009). Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. *American Society for Microbiology*.
- ISO 7045. (1973). *Method for determination of hydrogen peroxide content in textile materials*.
- ISO 18593. (2004). *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs*.
- ISO 20645. (2004). *Textile fabrics - Determination of antibacterial activity - Agar diffusion plate teste*.
- ISO 20743. (2007). *Textiles – Determination of antibacterial activity of antibacterial finished products*.
- ISO 22196. (2011). *Measurement of antibacterial activity on plastics and other non-porous surfaces*.
- Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A., . . . Kamil, M. A. (Janeiro de 2018). Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association*.
- Juven, B. J., & Pierson, M. D. (novembro de 1996). Antibacterial Effects of Hydrogen Peroxide and Methods for Its Detection and Quantitation. *Journal of Food Protection*, 1233-1241.
- Liu, P. S., & Chen, G. F. (2014). Chapter One - General Introduction to Porous Materials. Em P. S. Liu, & G. F. Chen, *Porous Materials* (pp. 1-20). Butterworth-Heinemann.

- Malcolm, L. (2018). Chapter 12 - Accelerated Stability Assessment Program (ASAP) Applications in a Postapproval Environment. Em F. Qiu, & G. Scrivens, *Accelerated Predictive Stability* (pp. 287-304). Academic Press.
- Markets and Markets. (1 de agosto de 2020). *Surface Disinfectant Market by Composition (Quaternary Ammonium, Alcohols, Chlorine, Hydrogen Peroxide), Type (Liquids, Sprays, Wipes), Application (Surface, Instrument), End User (Hospitals, Diagnostic and Research Labs) - Global Forecast to 2025*. Obtido de Markets and Markets: <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/surface-disinfectant-market-231286043.html>
- McAuley, C. M., & Fegan, N. (2020). Pathogens in Milk: Escherichia coli. *Reference Module in Food Science*.
- McDonnell, G. (28 de abril de 2014). *The Use of Hydrogen Peroxide for Disinfection and Sterilization Applications*, pp. 1-34.
- Microbiology in Pictures. (2015). *Escherichia coli*. Obtido de Microbiology in Pictures: <https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria-photos/escherichia-coli-photos/escherichia-coli-tsa.html>
- Microbiology in Pictures. (2015). *Klebsiella pneumoniae*. Obtido de Microbiology in Pictures: <https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria-photos/klebsiella-pneumoniae-photos/klebsiella-pneumoniae-tsa.html>
- Misono, M. I., Islam, M. M., Epaarachchi, J. A., & Lau, K. (2014). Potentiality of utilising natural textile materials for engineering composites applications. *Materials & Design*, 359-368.
- MLS. (2 de setembro de 2021). *Staphylococcus Aureus – Cultural Characteristics*. Obtido de Medical Laboratory Scientist MLS: <https://medicallabscientist.org/staphylococcus-aureus-cultural-characteristics/>
- Moretro, T., & Langsrud, S. (2017). Residential Bacteria on Surfaces in the Food Industry and Their Implications for Food Safety and Quality. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1022-1041.
- Munir, M. T., Pailhories, H., Eveillard, M., Aviat, F., Lepelletier, D., Beloncle, C., & Federighi, M. (2019). Antimicrobial Characteristics of Untreated Wood: Towards a Hygienic Environment. *Scientific Research Publishing*, 152-170.

- Percival, S. L., & Williams, D. W. (2014). Chapter Six - Escherichia coli. Em S. L. Percival, M. V. Yates, D. W. Williams, R. M. Chalmers, & N. F. Gray, *Microbiology of Waterborne Diseases (Second Edition)* (pp. 89-117). Academic Press.
- Pinho, E. P., Magalhães, L., Henriques, M., & Oliveira, R. (2011). Antimicrobial activity assessment of textiles: Standard methods comparison. *Annals of Microbiology*, 493-498.
- Qin, Y. (2016). 4 - A brief description of the manufacturing processes for medical textile materials. Em Y. Qin, *Medical Textile Materials* (pp. 43-54). Woodhead Publishing.
- Ray, S. C. (2012). 1 - Knitting at a glance. Em S. C. Ray, *Fundamentals and Advances in Knitting Technology* (pp. 1-11). Woodhead Publishing India.
- Rutala, W. A., Weber, D. J., & HICPAC, H. I. (maio de 2019). *Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities*.
- Saccucci, M., Bruni, E., Uccelleti, D. B., Sarto, M. S., Bossù, M., Carlo, G., & Polimeni, A. (2018). Surface Disinfections: Present and Future. *Journal of Nanomaterials*, 1-9.
- Samanta, I., & Bandyopadhyay, S. (2020). Chapter 15 - Escherichia coli. Em I. Samanta, & S. Bandyopadhyay, *Antimicrobial Resistance in Agriculture* (pp. 171-193). Academic Press.
- Seely, O. (29 de junho de 2020). *Iodometric Determination of Cu in Brass*. Obtido em 7 de outubro de 2021, de Chemistry LibreTexts: https://chem.libretexts.org/Ancillary_Materials/Laboratory_Experiments/Wet_Lab_Experiments/Analytical_Chemistry_Labs/Iodometric_Determination_of_Cu_in_Brass
- Shrivastava, A. (2018). *Introduction to Plastics Engineering*. Elsevier.
- Singh, R. (2012). Chapter 8 - Stainless Steels. Em R. Singh, *Applied Welding Engineering* (pp. 65-73). Butterworth-Heinemann.
- Stoodley, P., Hall-Stoodley, L., Costerton, B., DeMeo, P., Shirtliff, M., Gawalt, E., & Kathju, S. (2013). 5 - Biofilms, Biomaterials, and Device-Related Infections. Em K. Modjarrad, & S. Ebnesaajad, *Handbook of Polymer Applications in Medicine and Medical Devices* (pp. 77-101). Plastics Design Library.
- Stürchler, D. (2016). Klebsiella and Klebs the person behind the name. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 654.
- The Hygiene Lab. (6 de novembro de 2019). *What does the phrase "Kills 99.9% of Germs" REALLY mean?* Obtido de <http://thehygienelab.com/2019/11/06/what-is-99-9-of-germs-mean/>
- Thompson, K. M. (25 de abril de 2012). *The Science Of Disinfectants*.

- UC RUSAL. (setembro de 2021). *What is aluminium?* Obtido de All about aluminium:
https://www.aluminiumleader.com/about_aluminium/what_is_aluminum/
- USP technologies. (9 de novembro de 2021). *Iodometric Titration*. Obtido de USP technologies:
<https://www.usptechnologies.com/iodometric-titration/>
- Verbund für Angewandte Hygiene (VAH) . (29 de outubro de 2020). *As a biocidal active substance, ethanol is indispensable for hygienic hand disinfection (Authorized translation)*.
- Wicks, B. S., Lewis, T., & Khawam, A. (2018). Chapter 15 - Applications of ASAP to Generic Drugs. Em F. Qiu, & G. Scrivens, *Accelerated Predictive Stability* (pp. 341-352). Academic Press.
- Wikipedia. (27 de outubro de 2021). Obtido em 12 de novembro de 2021, de Etanol:
<https://pt.wikipedia.org/wiki/Etanol>
- Wikipedia. (2021). *Hydrogen Peroxide*. Obtido de Wikipedia:
https://en.wikipedia.org/wiki/Hydrogen_peroxide
- Writer, S. (14 de abril de 2020). *What Are Some Examples of Non-Porous Surfaces?* Obtido de Reference*:
<https://www.reference.com/science/examples-non-porous-surfaces-b132e2a7b6150430>
- Wu, M., & Li, X. (2015). Chapter 87- *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. Em Y.-W. Tang, M. Sussman, D. Liu, I. Poxton, & J. Schwartzman, *Molecular Medical Microbiology (Second Edition)* (pp. 1547-1564). Academic Press.

ANEXOS

Anexo A. Composição dos meios de cultura e reagentes

Tabela A. 1 - Meio TSA

Volume (mL)	TSB (g)	Agar (g) (2%)	Água destilada (mL)
1000	30	20	1000

O meio TSB e agar é adquirido à Frilabo.

Tabela A.2 - Meio TSB

Volume (mL)	TSB (g)	Água destilada (mL)
1000	30	1000

O meio TSB é adquirido à Frilabo.

Tabela A. 3 - PBS 1X

Volume (mL)	NaCl (g)	KCl (g)	K ₂ HPO ₄ (g)	NaHPO ₄ .12H ₂ O (g)	Água ultrapura (mL)
1000	80	2	2	28,5	1000

Adicionar o volume de água e homogeneizar. Ajustar pH a 7,5 com HCl 37 %. Esterilizar por filtração ou autoclavar, a 121 °C, durante 20 min. Armazenar a temperatura ambiente. Para utilizar diluir 1:10 em água ultrapura estéril.

Tabela A.4 - Meio TSB com Polisorbato 80

Volume (mL)	TSB (g)	Polisorbato 80 (g)	Água destilada (mL)
1000	30	7	1000

Anexo B. Retas de calibração

Anexo B.1. Reta de calibração de *S. aureus* ATCC 6538

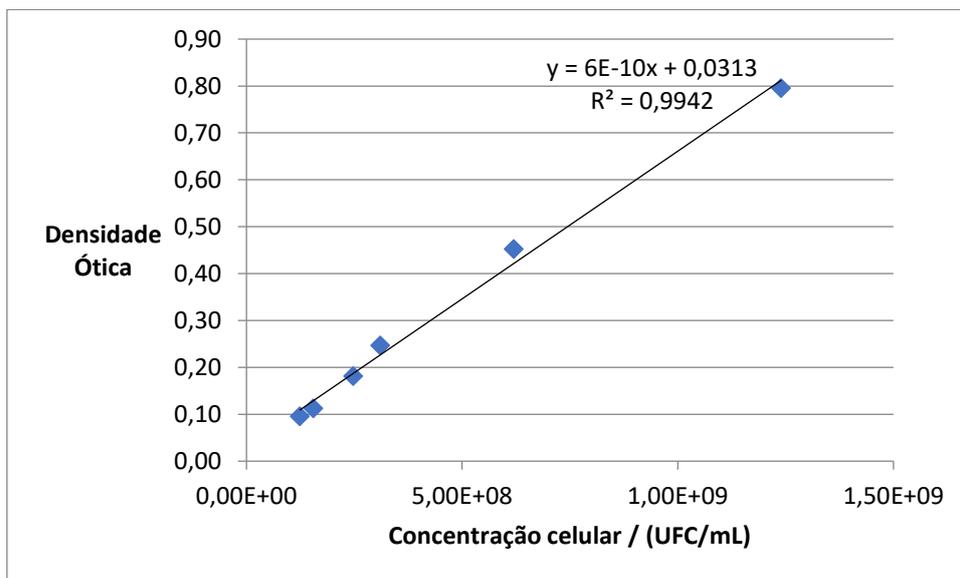


Figura A.1 – Reta de calibração da concentração celular, em UFC/mL de *S. aureus* ATCC 6538 em função da sua densidade ótica, a 620 nm.

Anexo B.2. Reta de calibração de *K. pneumoniae* ATCC 11296

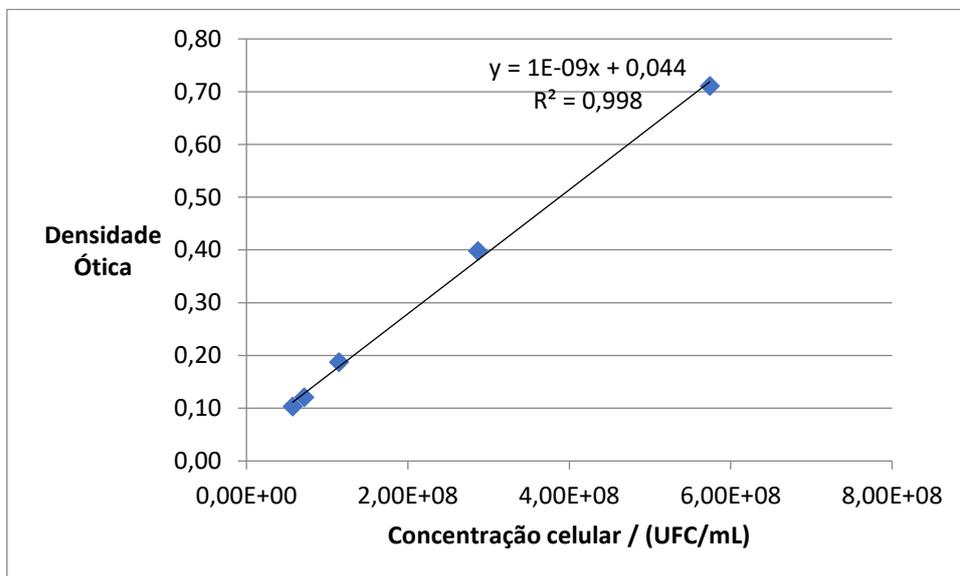


Figura A.2 – Reta de calibração da concentração celular, em UFC/mL de *K. pneumoniae* ATCC 11296 em função da sua densidade ótica, a 620 nm.

Anexo B.3. Reta de calibração de *E. coli* CECT 434

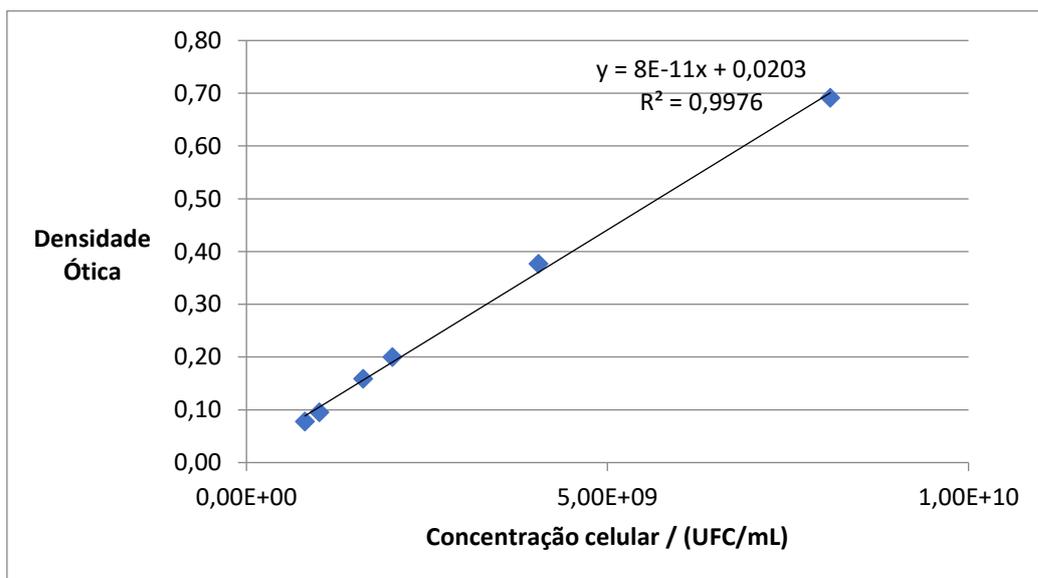


Figura A.3 – Reta de calibração da concentração celular, em UFC/mL de *E. coli* CECT 434 em função da sua densidade ótica, a 620 nm.