



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Roberta Lordelo da Costa

**MICROBIOMA HOSPITALAR  
ESTRUTURA E FUNÇÃO DAS COMUNIDADES  
MICROBIANAS AMBIENTAIS**

Tese no âmbito do Doutoramento em Biociências, Especialização em Microbiologia, orientada pela Professora Doutora Paula Maria de Melim Vasconcelos de Vitorino Morais e pela Doutora Rita Susana Rosa Branco e apresentada ao Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Fevereiro de 2024

Faculdade de Ciências e Tecnologia  
da Universidade de Coimbra

# Microbioma Hospitalar

## Estrutura e função das comunidades microbianas ambientais

Roberta Lordelo da Costa

Tese no âmbito do Doutoramento em Biociências, Especialização em Microbiologia, orientada pela Professora Doutora Paula Maria de Melim Vasconcelos de Vitorino Morais e pela Doutora Rita Susana Rosa Branco e apresentada ao Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Fevereiro de 2024



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA



O trabalho que deu origem à presente tese foi realizado no Centro de Engenharia Mecânica, Materiais e Processos e no Laboratório de Microbiologia, Departamento de Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Parte desta investigação foi financiada pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) através do projeto nº 395 – “Avaliação da Eficácia da Descontaminação e Segurança da Reutilização dos Dispositivos de Proteção Respiratória” (2ª edição do RESEARCH4COVID 19), e contrato Ref. UIDB/ QUE/ 00102/ 2020.

Roberta Lordelo da Costa reconhece o apoio do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia (IFBA) através do afastamento com ônus, conforme o disposto na legislação do Brasil, Artigos 95 e 96-A da Lei nº 8.112/90, no Artigo 4 da portaria do Ministério da Educação nº 404, de 24/04/09, publicada no Diário Oficial da União de 07/05/09.



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA



INSTITUTO FEDERAL  
DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
Bahia





## Agradecimentos

---

Agradeço à Roberta de 2017 por ter aceitado o desafio de fazer Doutorado em outro país sem saber ao certo os desafios que atravessaria. A Roberta de hoje permanece a seguir em frente e está grata pelas pessoas que permaneceram em seu caminho e despede-se das que aqui não se encontram mais. Esta conquista é fruto de muitas mãos e as de vocês estão aqui.

A minha profunda gratidão à Professora Doutora Paula Morais por ter me acolhido em seu laboratório e ter dado a oportunidade de fazer parte da sua equipa durante a minha formação. A conceção do tema da pesquisa, a entrada no hospital para realização das amostragens, a capacidade de perceber novas oportunidades face a um cenário pandémico e a habilidade de ensinar como fazer ciência para produção do conhecimento, representam um recorte da minha experiência sob a luz da vossa orientação. A convivência no Laboratório de Microbiologia ajudou-me a perceber minhas limitações e ir à busca da minha melhor versão. Agradeço à Doutora Rita Branco por também aceitar a orientação da minha pesquisa. Eu precisei aprender a agir como cientista e a Dra. Rita fez parte desta formação. Foram valiosos momentos de questionamento, aceitação, aprendizado e amadurecimento. À Doutora Ana Paula Chung, agradeço por inspirar-me e perceber que mulheres de outras origens podem fazer parte da comunidade científica. Às queridas Sara, Carla e Cecília, minha admiração e carinho pelo nosso convívio, amizade e partilha de conhecimento. Aos demais colegas e funcionários do laboratório, o meu muito obrigada por serem incansáveis mantenedores deste espaço.

À querida Isis por me acompanhar nesta aventura transformadora. Filha, nem sempre foi fácil; aliás, quase sempre não é fácil conciliar o papel de ser mãe com a formação

acadêmica; embora tenha recebido de ti todo amor, parceria e compreensão. Eu tenho muita sorte de ser tua mãe.

Ao Ramiro Gabriel, por ter se somado à nossa família nesta jornada e ter trazido leveza. À minha mãe, Graça Lordelo, minha gratidão pelo auxílio no papel de mãe para que eu pudesse seguir em frente com o Doutorado. Às minhas irmãs e cunhado, Daniele, Renata e Márcio Reis, pelo apoio e parceria.

Um especial agradecimento ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia, na pessoa do Mestre Albertino Nascimento, por ser o gestor comprometido que tem a visão do crescimento do instituto através da qualificação dos seus servidores.

Agradeço aos amigos do Brasil, Ana Paula, Anthéogenes, Justo, Lybia, Naasson, Sinval, Soninha e Vânia pelo apoio, por encurtarem a distância de casa e encontrarem uma forma de estarem presentes nesta caminhada. Às queridas Flávia, Thaíla e Verônica por compartilharmos risadas durante a estadia na casa Sacramentinas.

Aos amigos que Portugal presenteou-me, Pedro, Karen, Edvan, Amanda, Cacá e Cecília; a minha estada foi mais leve e doce por conta de vocês. Aos momentos de escuta que tive com o Alexandre e que foram tão salutares no meu processo de autoconhecimento. À Doutora Mariane Ventura por auxiliar-me no processo de enfrentamento do Bournout.

À cidade de Coimbra, por ter sido minha morada durante o período do Doutorado e encerramento deste ciclo que tanto me transformou e me fez crescer. À Universidade de Coimbra por ser minha morada acadêmica, por possibilitar conhecer tantas pessoas e enxergar o mundo de uma forma diferente, o meu muitíssimo obrigada. A Roberta de 2024 é imensamente grata a todos vocês.



# Índice

---

Agradecimentos .....	i
Lista de Figuras .....	viii
Lista de Tabelas .....	x
Abreviaturas.....	xi
Abstract.....	xiv
Resumo .....	xvi
Capítulo I: Introdução Geral	
1.1 A perspetiva do problema de saúde pública das Infecções Associadas aos Cuidados de Saúde.....	3
1.2 Exemplos de microrganismos envolvidos em IACS em Portugal .....	4
1.3 Controlo e prevenção das IACS.....	6
1.4 A aplicação dos parâmetros microbianos em superfícies não críticas como ferramenta de controlo das IACS .....	7
1.5 A relação entre as IACS e o ambiente construído .....	9
1.6 Características de resistência das bactérias no ambiente hospitalar .....	11
1.7 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i> entre os patógenos causadores de infeções nosocomiais.....	14
1.8 As adaptações ao estudo face o cenário pandémico .....	20
1.9 A importância dos dispositivos de proteção respiratória em cenários de pandemia.....	20
1.10 Os processos de descontaminação dos DPRs .....	22
Objetivos.....	24

## Capítulo II: Importância da aplicação de índices microbiológicos no controle de qualidade microbiológico ambiental em hospitais

Resumo .....	30
2.1 Introdução.....	32
2.2 Metodologia .....	34
2.2.1 Área de Estudo .....	34
2.2.2 Metodologia de amostragem.....	35
2.2.3 Determinação da carga microbiana e isolamento bacteriano.....	36
2.2.4 Identificação da sequência do gene 16S rRNA dos isolados.....	37
2.2.5 Análise estatística.....	38
2.3 Resultados .....	38
2.3.1 Amostras obtidas e UFCs recuperadas .....	38
2.3.2 Carga microbiana recuperada dos equipamentos e superfícies não críticas	43
2.3.3 Isolados identificados através da sequência do gene que codifica o 16S rRNA.....	46
2.3.4 Perspetiva temporal da aplicação do índice quantitativo de Dancer.....	49
2.4 Discussão.....	50
2.5 Conclusões .....	56

## Capítulo III: Avaliação da resistência antimicrobiana, formação de biofilme e potencial de modificação de superfície em isolados hospitalares de *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*

Resumo .....	60
3.1 Introdução.....	61
3.2 Metodologia .....	62
3.2.1 Estirpes selecionadas .....	62
3.2.2 Testes de sensibilidade antimicrobiana.....	64
3.2.3 Produção de biofilme .....	65
3.2.4 Avaliação da capacidade de modificação de superfícies poliméricas .....	66

3.2.5	Microscopia eletrônica de varrimento (SEM) .....	67
3.2.6	Análise estatística dos dados .....	67
3.3	Resultados .....	68
3.3.1	Testes de sensibilidade antimicrobiana .....	68
3.3.2	Produção de biofilme .....	70
3.3.3	Teste Qui-quadrado .....	71
3.3.4	Avaliação da capacidade de modificação de superfícies poliméricas .....	72
3.4	Discussão .....	78
3.5	Conclusões .....	81

Capítulo IV: Avaliação da eficácia microbiológica de três métodos de descontaminação de máscaras e o seu impacto na filtração, permeabilidade ao ar e propriedades físico-químicas

Resumo .....	86	
4.1	Introdução .....	86
4.2	Materiais e métodos .....	90
4.2.1	Dispositivos de Proteção Respiratória (DPRs).....	90
4.2.2	Tratamentos de descontaminação.....	91
4.2.3	Ensaio microbiológicos.....	94
4.2.4	Eficiência de filtração e permeabilidade ao ar dos DPRs.....	95
4.2.5	Caracterização físico-química dos DPRs .....	97
4.2.6	Análises de dados e estatísticas .....	100
4.3	Resultados e discussão .....	100
4.3.1	Avaliação da eficácia microbiológica.....	100
4.3.2	Efeitos dos tratamentos na eficiência da filtração .....	106
4.3.3	Testes de permeabilidade ao ar.....	108
4.3.4	Efeitos dos tratamentos nas propriedades físico-químicas e estruturas dos DPRs .....	110

Capítulo V: Considerações finais	
Considerações finais .....	121
Perspetivas futuras .....	125
Referências.....	129
Apêndice 1:	
Sequências do gene 16S rRNA .....	150
Apêndice 2:	
Resultados EITF-RTA .....	157
Apêndice 3:	
Medições do ângulo de contacto.....	160
Apêndice 4:	
Taxas de Transmissão de Vapor de Água (TTVA/WVTR).....	162
Apêndice 5:	
Análise Termogravimétrica (ATG) .....	165
Apêndice 6:	
Calorimetria Exploratória Diferencial Modulada (CEDM).....	167
Apêndice 7:	
Porosimetria por Intrusão de Mercúrio (PIM/MIP).....	171
Apêndice 8:	
Microscopia ótica e eletrónica .....	174



## Lista de Figuras

---

Figura 1.1 Modelo do ciclo de formação do biofilme em <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . ....	12
Figura 1.2 Mecanismos de resistência a antibióticos em uma bactéria Gram-negativa. ...	14
Figura 1.3 O mecanismo geral de degradação biológica de plásticos em condições aeróbicas. ....	18
Figura 1.4 Imagens de três tipos de DPRs. ....	22
Figura 2.1 Recuperação das unidades formadoras de colônia ([UFC]/ cm <sup>2</sup> ) das superfícies não críticas amostradas nas áreas de Cardiologia (C), Pneumologia (P) e Hematologia (H). ....	39
Figura 2.2 Níveis de carga microbiana por unidades formadoras de colônia (UFC/ cm <sup>2</sup> ) nas enfermarias amostradas durante 4 meses. ....	40
Figura 2.3 Categorias de cargas bacterianas definidas com base nas unidades formadoras de colônias (UFC/cm <sup>2</sup> ) nos equipamentos e superfícies hospitalares amostradas nas enfermarias da Cardiologia (a), Pneumologia (b) e Hematologia (c), em meios seletivos PIA (branco) e KSA (cinza). ....	43
Figura 2.4 Contagens bacterianas médias (UFC/cm <sup>2</sup> ) dos equipamentos e superfícies não críticas das enfermarias da Cardiologia (a), Pneumologia (b) e Hematologia (c) em meios seletivos PIA (branco) e KSA (cinza). ....	45
Figura 2.5 Espécies bacterianas recuperadas dos equipamentos e superfícies hospitalares. ....	49
Figura 3.1 Classificação das estirpes com base na capacidade de produção de biofilme avaliada por ensaio CV. ....	71
Figura 3.2 Densidades óticas dos crescimentos bacterianos, ao longo do período de incubação, na presença de diferentes materiais poliméricos. ....	74
Figura 3.3 Imagens SEM das estirpes <i>P. aeruginosa</i> 440Pa, 440Pi e 244Pa em três diferentes superfícies de materiais – tubo de infusão do soro, cateter urinário e cânula nasal. ....	76

Figura 3.4 – Imagens SEM das estirpes *P. aeruginosa* 440Pa, 440Pi e 244Pa em três diferentes superfícies de materiais – tubo de infusão do soro, cateter urinário e cânula nasal. .... 77

Figura 4.1 Descontaminação de três tipos de DPR usando diferentes procedimentos: peróxido de hidrogénio nebulizado (A), imersão em lixívia comercial (B) e contacto com vapor gerado por micro-ondas (C). .... 102

Figura 4.2 Eficácia da inativação dos endósporos usando três diferentes suspensões de número de endósporos ( $10^7$  (barras pretas),  $10^8$  (barras cinzentas) e  $10^9$  (barras brancas) pelos três processos de descontaminação para máscaras cirúrgicas, KN95 e de pano ... 105

Figura 4.3 Resultados experimentais obtidos para a eficiência de filtração, estratificada de acordo com o tipo de máscara (MP, KN, MC) e tratamento de descontaminação ( $H_2O_2$ , NaClO, Saco de Vapor). .... 107

Figura 4.4 Resultados experimentais obtidos para a permeabilidade ao ar, estratificada de acordo com o tipo de máscara (MP, KN, MC) e tratamento de descontaminação ( $H_2O_2$ , NaClO, Saco de Vapor). .... 109

## Lista de Tabelas

---

Tabela 2.1 Distribuição e identificação dos isolados amostrados nas 3 enfermarias.....	47
Tabela 2.2 Equipamentos e superfícies hospitalares não críticas que atingiram contagens iguais e superiores a 5UFC/ cm <sup>2</sup> .....	50
Tabela 3.1 Estirpes selecionadas usadas no presente estudo.....	63
Tabela 3.2 Percentagens de resistência das 33 estirpes de <i>P. aeruginosa</i> e 2 estirpes de <i>K. pneumoniae</i> aos compostos antimicrobianos testados.....	69
Tabela 3.3 Classificação quanto à multirresistência (MDR) dos isolados resistentes a antibióticos com atividade anti-pseudomonas.....	70
Tabela 3.4 Ligação entre as estirpes de <i>P. aeruginosa</i> e <i>K. pneumoniae</i> e o sistema de distribuição de água potável. ....	72
Tabela 3.5 Análise das bactérias com potencial de degradação de polímeros. ....	73
Tabela 4.1 Análise unidirecional da eficiência de filtração (Kruskal–Wallis não paramétrico bicaudal usando classificações).....	107
Tabela 4.2 Análise unidirecional da permeabilidade ao ar (Kruskal–Wallis não paramétrico, bicaudal usando classificações).....	109

## Abreviaturas

---

16S rRNA – gene que codifica o RNA ribossômico 16S

ATG – Análise Termogravimétrica

BLAST – do inglês Basic Local Alignment Search Tool, ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local

cAMP – do inglês cyclic Adenosine Monophosphate, adenosina monofosfato cíclico

CCIH – Comissão de Controlo de Infecção Hospitalar

c-di-GMP – do inglês bis-(3'-5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate, monofosfato de guanosina dimérico bis-(3'-5')-cíclico

CEDM – Calorimetria Exploratória Diferencial Modulada

CLSI – do inglês Clinical & Laboratory Standards Institute; Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais

CV – Cristal Violeta

DEHP – do inglês di(2-ethylhexyl) phthalate; di(2-etilhexil) ftalato

DGS – Direção-Geral da Saúde

DO – Densidade Ótica

DOc – Densidade Ótica do controlo negativo

DPR – Dispositivo de Proteção Respiratória

E – camada externa

ECDC – do inglês European Centre for Disease Prevention and Control; Centro Europeu de Prevenção e Controlo de Doenças

EFP – Eficiência de Filtração de Partículas

EITF-RTA – Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier e Refletância Total Atenuada

ESKAPE – *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Enterobacter*

EUCAST – do inglês European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; Comitê Europeu de Testes de Susceptibilidade Antimicrobiana

FC – Fibrose Cística

FDA – do inglês Food and Drug Administration; Administração de Alimentos e Medicamentos.

GES – do inglês Guiana Extended Spectrum  $\beta$ -lactamase.

H1N1 – vírus influenza A; gripe A, estirpe H1N1

HR – humidade relativa

I – Intermédio

I' – camada interna

IACS – Infecções Associadas aos Cuidados de Saúde

INICC – do inglês International Nosocomial Infection Control Consortium; consórcio internacional para o controlo das infeções nosocomiais

KN – máscaras KN95

KPC – enzima carbapenase

KSA – *Klebsiella* Selective Agar

LB – Luria-Bertani

M – camada intermédia

MC – máscaras cirúrgicas

MDR – do inglês multidrug-resistant; apresenta multirresistência

ME – camada intermédia próxima à camada externa

MI – camada intermédia próxima à camada interna

MIC – do inglês Minimum growth Inhibitory Concentration; concentração mínima inibitória do crescimento

MP – máscaras de pano

MRA – Microrganismos Resistentes a Antibióticos

MRSA – do inglês Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*; *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina

NA – do inglês Nutrient Agar

NB – do inglês Nutrient Broth

NCBI – do inglês National Center for Biotechnology Information; Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia

NGS – do inglês Next-Generation Sequencing, sequenciamento de nova geração

ns – não significativa

OPPPs – do inglês Opportunistic Premise Plumbing Pathogens; patógenos de canalização de premissas oportunistas

PAV – Pneumonia Nosocomial Associada à Ventilação mecânica

PBS – do inglês Phosphate Buffered Saline; solução salina tamponada com fosfato

PBP – do inglês Penicillin-Binding Proteins, proteínas de ligação à penicilina

PCR – do inglês Polymerase Chain Reaction; reação em cadeia da polimerase

PDR – do inglês pandrug-resistant; resistente a todas as classes de antibióticos

PE – polietileno

PET – polietileno tereftalato

PIA – do inglês *Pseudomonas Isolation Agar*, Ágar de Isolamento de *Pseudomonas*

PIM – Porosimetria por Intrusão de Mercúrio

PME – Pequenas e Médias Empresas

PNCI – Programa Nacional de Prevenção e Controlo da Infecção Associada aos Cuidados de Saúde

PP – polipropileno

PPCIRA – Programa de Prevenção e Controlo de Infecções e de Resistência aos Antimicrobianos

PRCV – coronavírus respiratório suíno

PSL – látex de poliestireno

PVC – do inglês Polyvinil Chloride; policloreto de vinilo

R – resistente

RAPD – do inglês Random Amplified Polymorphic DNA; amplificação ao acaso do DNA polimórfico

S – sensível

SEM – do inglês Scanning Electron Microscopy; microscopia eletrônica de varrimento

SNS – Serviço Nacional de Saúde

TCA – do inglês Tricarboxylic Acid, ácido tricarboxílico

TSA – do inglês Tryptic Soy Agar

TSB – do inglês Tryptone Soy Broth, meio de triptona de soja

TTVA – Taxas de Transmissão de Vapor de Água

UCCCB – do inglês University of Coimbra Bacteria Culture Collection; Coleção de Culturas de Bactérias da Universidade de Coimbra

UFC – Unidade Formadora de Colónias

UFP – Unidade Formadora de Placas

UV – ultravioleta

VRE – do inglês, Vancomycin Resistant *Enterococcus*; *Enterococcus* resistentes à vancomicina

XDR – do inglês extensively drug-resistant; extensivamente resistente; resistentes a 6 ou 7 classes de antibióticos.

## Abstract

---

By representing a public health concern, Healthcare-Associated Infections (HAIs) have generated significant investments from public authorities. HAIs often involve ESKAPE organisms - *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and several *Enterobacter* strains. It has been documented that these organisms can be present on non-critical surfaces. Commonly, non-critical surfaces, due to their contact with not damaged skin, are considered low risk for contamination. However, recent findings reveal that conventional cleaning and disinfection methods used do not eliminate completely ESKAPE organisms. This highlights the need for establishing microbiological indices for quality in hospitals, similar to those employed in the food industry.

In this study, equipment and non-critical surfaces were sampled from three nurseries of a Portuguese hospital. The application of the microbiological indices for quality control used the enumeration of total aerobic colonies count determined for the equipment and surfaces. The identification of the isolated strains was achieved through 16S rRNA gene sequencing and analysis. The study analysed in more detail the resistance profiles of two ESKAPE bacteria species, namely *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. Characteristics such as resistance to antimicrobial agents, biofilm production abilities, and potential for degradation polymeric agents commonly used in hospitals were determined for the strains selected. Additionally, in order to address the pressing concerns of the COVID-19 pandemic, this study evaluated three disinfection mechanisms of different respiratory protective devices (RPDs). Given the widespread use of RPDs, namely surgical, KN95, and cloth masks, their disposal in domestic waste raised

environmental challenges. To increase the information on how to deal with the new problem, this study examined the effectiveness of disinfection methods for RPDs. The results confirmed the presence of ESKAPE organisms, particularly highlighting the prevalence of *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, and *Enterobacter* sp. on non-critical equipment and surfaces. These organisms were mainly associated with hospital areas subjected to humidity. The bacterial dispersion sites were identified in the WC sink's drain, WC shower, WC chair, WC shower inner part, WC hose inner part, WC wall, nursing bench, WC sink's tap, and nursing room tap. The isolated strains of *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* species exhibited susceptibility to most clinically relevant antibiotics. Moreover, 97% of the strains demonstrated the ability to produce biofilm and the strain *P. aeruginosa* 440Pi showed the potential to degrade polymeric material. The critical points of drinking water distribution (pipes, WC hose inner part WC shower inner part) were considered key entry points for *P. aeruginosa* into the hospital environment. Regarding the decontamination processes of RPDs, the nebulized hydrogen peroxide was the most effective, demonstrating superior decontamination efficacy. The number of treatment cycles did not have a significant effect on the efficiency of the decontamination processes under analysis. Furthermore, the filtration efficiency was not compromised throughout the treatment cycles and visible effects were primarily confined to changes in air permeability.



## Resumo

---

Ao representarem um problema de saúde pública, as Infecções Associadas aos Cuidados de Saúde (IACS) têm gerado investimentos significativos por parte do poder público. As IACS frequentemente envolvem organismos do grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Enterobacter*). Tem sido documentado que estes organismos podem estar presentes em superfícies não críticas. Habitualmente, as superfícies não críticas, devido ao contacto com a pele sem lesões, são consideradas de baixo risco para contaminações. Descobertas recentes revelaram que os métodos convencionais de limpeza e desinfecção utilizados não eliminam completamente os organismos ESKAPE. Essa revelação sinaliza a importância de estabelecer índices microbiológicos em hospitais, semelhantes aos empregados na indústria de alimentos.

O estudo focou as estirpes obtidas por amostragem dos equipamentos e superfícies não críticas em três enfermarias de um hospital português. A aplicação dos índices microbiológicos para controlo de qualidade utilizou a contagem das colónias aeróbias totais, determinadas para equipamentos e superfícies. A identificação das estirpes foi realizada por sequenciação do gene que codifica o 16S rRNA. O estudo explorou, particularmente, os perfis de resistência de duas espécies de bactérias do grupo ESKAPE, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*. Características como resistência aos agentes antimicrobianos, capacidade de produção de biofilme e potencial para degradar agentes poliméricos habitualmente usados em hospitais foram determinadas para as estirpes seleccionadas. Além disso, a fim de abordar as preocupações urgentes da pandemia COVID-19, este estudo avaliou três mecanismos de desinfecção de diferentes

Dispositivos de Proteção Respiratória (DPRs). Dado o uso generalizado de DPRs, nomeadamente máscaras cirúrgicas, máscaras KN95 e máscaras de pano, e o seu descarte no lixo doméstico revelaram desafios ambientais. Para aumentar as informações sobre como lidar com o novo problema, esta investigação examinou a eficácia dos métodos para desinfeção de DPRs. Os resultados confirmaram a presença de organismos ESKAPE, destacando particularmente a prevalência de *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *Enterobacter* sp. Esses organismos estão associados, principalmente às áreas hospitalares sujeitas a humidade. Os locais de dispersão bacteriana foram identificados no ralo dos lavatórios dos quartos, no chuveiro das casas de banho, nas cadeiras de apoio ao banho, na parte interna dos dispersores dos chuveiros, na parte interna das mangueiras dos chuveiros, na parede dos duches, nas bancadas das salas de enfermagem, nas torneiras dos lavatórios dos quartos e nas torneiras das salas de enfermagem. As estirpes isoladas das espécies de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* exibiram suscetibilidade à maioria dos antibióticos clinicamente relevantes. Além disso, 97% das estirpes demonstraram capacidade para produzir biofilme e a estirpe *P. aeruginosa* 440Pi mostrou potencial para degradar material polimérico. Os pontos críticos de distribuição de água potável (tubagens, parte interna da mangueira do chuveiro e a parte interna do dispersor do chuveiro) foram considerados pontos-chave de entrada de *P. aeruginosa* no ambiente hospitalar. Relativamente aos processos de descontaminação dos DPRs, o peróxido de hidrogénio nebulizado foi o mais efetivo, demonstrando eficácia superior à descontaminação. O número de ciclos de tratamento não teve efeito significativo sobre a eficiência dos processos de descontaminação em análise. Além disso, a eficiência da filtração não foi comprometida ao longo dos ciclos de tratamento e os efeitos visíveis foram primariamente restritos às mudanças na permeabilidade ao ar.



## **Capítulo I: Introdução Geral**



## 1.1 A perspetiva do problema de saúde pública das Infecções Associadas aos Cuidados de Saúde

As Infecções Associadas aos Cuidados de Saúde (IACS) representam um problema de saúde pública. Têm consequências significativas em termos do prolongamento do tempo de permanência do utente no hospital e no aumento do consumo de medicamentos no tratamento da infeção. Os efeitos provocados pelas IACS refletem-se na qualidade de vida do utente durante o internamento, contribui na redução da sua esperança de vida e exige maior investimento por parte do Serviço Nacional de Saúde (SNS).

As IACS abrangem um conjunto de infeções emergentes adquiridas pela exposição do utente a organismos patogénicos ou suas toxinas no decurso dos cuidados de saúde (Cardoso et al., 2014; Horan et al., 2008). Adicionalmente, os profissionais que trabalham nas unidades de saúde estão também sujeitos à possibilidade de contraírem as IACS no exercício da sua atividade profissional (Khan et al., 2015).

A natureza abrangente das IACS contempla o grupo das infeções nosocomiais que correspondem a infeções adquiridas durante o internamento hospitalar (Khan et al., 2015). Os internamentos prolongados podem levar a um uso prolongado de fármacos antimicrobianos, aumentando a possibilidade de seleção e promoção do crescimento de microrganismos resistentes a antibióticos (MRA) (Lebre et al., 2017).

Entre 2016 e 2020, 70,9% dos casos de infeções por bactérias resistentes a antibióticos registadas na Europa tiveram a sua origem nas IACS (Merk et al., 2022). Dados de 2019 do Centro Europeu de Prevenção e Controlo de Doenças estimam que anualmente, 33000 pessoas morreram na Europa devido a infeções causadas por bactérias resistentes aos medicamentos e 1,5 mil milhões de euros adicionais anuais foram gastos no tratamento destes casos (Milionis et al., 2019).

O elevado impacto financeiro e de segurança que as IACS causam no sistema de saúde exige a adoção de medidas preventivas que afetem positivamente a gestão da saúde (Gonçalves & Carmo, 2022). Os custos financeiros dos utentes portadores de IACS são consideravelmente mais elevados, duplicam quando comparados com os custos dos utentes sem infeção. Este aumento dos custos deve-se ao prolongamento do tempo de internamento hospitalar, sendo em doentes com IACS, em média, mais 2 a 20 dias e as despesas diárias com a utilização de antibióticos são até 28 vezes superiores em doentes com IACS (Gonçalves & Carmo, 2022).

## 1.2 Exemplos de microrganismos envolvidos em IACS em Portugal

O grupo de organismos ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Enterobacter*) estão envolvidos numa percentagem substancial de infeções nosocomiais em hospitais modernos. Este grupo de organismos incluiu a maioria dos isolados que manifestam resistência a agentes antimicrobianos, dando origem a sérios desafios terapêuticos no campo da saúde humana (Pendleton et al., 2013).

Estirpes de *P. aeruginosa* são bactérias gram-negativas, aeróbias, habitualmente encontradas no ambiente, e são responsáveis por infeções respiratórias graves em pacientes imunocomprometidos (Biondo, 2023; Brooke, 2012; Gajdács et al., 2021; Mena & Gerba, 2009; Schulster et al., 2004; Suleyman et al., 2018; Taudien et al., 2023). Em Portugal, num hospital da região Centro, durante 10 anos, estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* foram isoladas em cerca de 60,5% dos utentes internados e 39,5% dos utentes em ambulatório (S. G. Pereira et al., 2014). O estudo buscou relacionar a evolução das taxas de multirresistência (MDR, do inglês multidrug-resistant) ao longo dos anos de acordo com a origem das amostras e das enfermarias onde foram colhidas. Do total de

isolados, 39,9% foram classificados como MDR (resistente a  $\geq 3$  antibióticos); destes 7,4% foram considerados resistentes a 6 ou 7 classes de antibióticos (XDR, do inglês extensively drug-resistant) das 8 classes utilizadas no ensaio. Entre o grupo de isolados a partir de infeções nosocomiais, 52,2% apresentaram MDR entre os quais 7,9% com perfil XDR. Nenhuma estirpe foi considerada resistente a todas as classes de antibióticos – PDR, do inglês pandrug-resistant (S. G. Pereira et al., 2014). Em 2007, Nordmann e colaboradores já referia o aumento progressivo do número de *P. aeruginosa* MDR. Atribuiu como causa do aumento da multirresistência desta espécie, a presença de estruturas genéticas responsáveis pela transferência de elementos genéticos móveis, nomeadamente, transposões, integrões e plasmídeos portadores de genes que conferiam resistência a antibióticos (Nordmann et al., 2007).

Os surtos nosocomiais e infeções clínicas por *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE do inglês, vancomycin resistant *Enterococcus*) parecem ter surgido no início do século XXI (Leavis et al., 2006). Os VRE são responsáveis por infeções da corrente sanguínea e apresentam taxas de prevalência superiores a 10% em Portugal e em outros seis países da Europa, nomeadamente Irlanda, Grécia, Polónia, Letónia, Roménia e Alemanha (ECDC, 2014). Os VRE também possuem a capacidade de transferência do seu plasmídeo para estirpes de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA, do inglês methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*), uma vez que ambas as estirpes podem estar no mesmo reservatório de biofilme (Nordmann et al., 2007). Estirpes de *S. aureus* podem causar uma variedade de infeções na corrente sanguínea e nos tecidos internos. Apesar das estirpes de *S. aureus* fazerem parte do microbioma normal da pele, a sua colonização persistente, tanto por estirpes resistentes quanto por sensíveis à meticilina, aumenta os riscos de infeções subsequentes decorrentes da rutura da pele ou mucosa, condição que permite a entrada dos estafilococos no organismo. O tratamento da



infecção é difícil de gerir devido a presença das estirpes MRSA (T. A. Taylor & Unakal, 2023).

*K. pneumoniae* está normalmente associada a quadros de pneumonia, infeções do trato urinário e da corrente sanguínea e as estirpes dispersam-se através do contato com secreções do paciente infetado (Biondo, 2023; Brisse et al., 2006; Guentzel, 1996; Khan et al., 2015; Paterson et al., 2014). Em 2020, foi observado um surto de *K. pneumoniae* num hospital português localizado na região Norte (G. Mendes et al., 2022). Os mecanismos de vigilância foram implementados para deteção das bactérias produtoras de carbapenemases de metalo- $\beta$ -lactamase de Nova Delhi na enfermaria onde o surto foi identificado e nas diferentes enfermarias do hospital. A triagem das estirpes portadoras de genes de resistência foi realizada por meio de testes de cultura, confirmadas por deteção da presença de genes codificadores das proteínas envolvidas por reação em cadeia da polimerase (PCR) e identificação das estirpes por sequenciação do gene que codifica o rRNA 16S. Das 21 estirpes de *K. pneumoniae* isoladas neste surto, 18 estavam interrelacionadas uma vez que apresentaram os mesmos genes de resistência e de virulência (G. Mendes et al., 2022). O aumento do consumo de antimicrobianos sem prescrição clínica durante a pandemia do coronavírus foi sugerido como um dos fatores que pode ter contribuído para o aumento significativo da incidência de infeções bacterianas multirresistentes, entre as quais, infeções por *K. pneumoniae* produtora de  $\beta$ -lactamase de largo espectro (G. Mendes et al., 2022).

### 1.3 Controlo e prevenção das IACS

A aplicação de medidas mais rigorosas de prevenção e controlo de infeções, nomeadamente precauções de barreira para isolamento e triagem de pacientes, desinfeção ambiental e promoção da higiene estão identificadas como ações que contribuem para

redução significativa ou que impedem a ocorrência de um número considerável de incidências de IACS (Watson et al., 2023). Destaca-se o programa proposto por Murni e colaboradores (2015) na Indonésia, focado no controlo do uso de antibióticos e higienização das mãos dos profissionais de saúde, o que resultou na redução da mortalidade infantil hospitalar de 10,4% para 8%. Nesse programa, verificaram-se ainda outros resultados muito significativos, incluindo a redução geral das infeções relacionadas com os cuidados de saúde (22,6% para 8,6%), a diminuição do uso de antibióticos (43% para 20,6%) e o aumento da adesão à higienização das mãos (19% para 63%) (Murni et al., 2015).

É provável que não seja possível evitar algumas dessas infeções, e esse seja o valor a pagar pelos avanços tecnológicos e terapêuticos (Pina et al., 2019). Contudo, um número significativo de infeções pode ser evitado, e elas são classificadas por W. Mendes e colaboradores (2013) como eventos adversos evitáveis. O estudo apresentou dados que comprovam a existência de danos causados aos utentes decorrentes dos cuidados de saúde e que podem ser evitados. São exemplos deste tipo de danos evitáveis os decorrentes do facto dos profissionais de saúde não adotarem o protocolo clínico previsto em norma (55,9% dos casos), ou dos causados por erros técnicos (14,7%) ou ainda os decorrentes da falta de capacidade técnica do profissional de saúde (11,8%) (W. Mendes et al., 2013).

#### 1.4 A aplicação dos parâmetros microbianos em superfícies não críticas como ferramenta de controlo das IACS

A especificação de índices de controlo de qualidade e a monitorização dos parâmetros microbianos nos serviços de saúde surgem como alternativas úteis no acompanhamento e controlo das IACS e na gestão do risco dessas infeções (Bogusz et al., 2013; Claro et al.,

2015; Dancer, 2004; Dolan et al., 2011; Moore & Griffith, 2007). Nesse sentido, é necessária a monitorização da carga microbiana em ambientes hospitalares, embora esta tarefa ainda não faça parte da rotina normal do hospital e seja considerada uma atividade árdua (Bogusz et al., 2013; Claro et al., 2015; Dancer, 2004; Dolan et al., 2011; Moore & Griffith, 2007; Rawlinson et al., 2019; Schulster et al., 2004). Para além disso, a metodologia associada a este processo de monitorização é considerada dispendiosa, sendo apenas utilizada quando ocorre a propagação de surtos (Robakowska et al., 2021; Schulster et al., 2004). No entanto, essas técnicas são amplamente utilizadas noutras áreas, nomeadamente, no controlo de qualidade na indústria alimentar (Dancer, 2004).

A colonização microbiana em áreas não críticas do ambiente hospitalar pode ser interpretada de forma qualitativa ou quantitativa. Organismos pertencentes ao grupo ESKAPE (Geadas Farias et al., 2017; Pendleton et al., 2013) e *Clostridium difficile* (Dancer, 2004) são considerados indicadores de risco para infeções associadas aos cuidados de saúde. Consequentemente, a presença de um ou mais organismo indicador de infeção por  $\text{cm}^2$  estabelece uma medida qualitativa e suscita atenção para a monitorização de infeções associadas aos cuidados de saúde (Dancer, 2004; Robakowska et al., 2021).

O critério de avaliação quantitativa consiste na enumeração total de microrganismos aeróbios presentes numa área amostrada. O valor maior ou igual a 5 UFC/ $\text{cm}^2$  (unidades formadoras de colónia por  $\text{cm}^2$ ) de qualquer organismo em superfícies hospitalares indica que estas áreas oferecem condições para o desenvolvimento de qualquer microbiota devido à ausência de métodos de desinfeção eficazes (Dancer, 2004; Dolan et al., 2011; Rutala & Weber, 2021).

O conhecimento dos riscos de transmissão de agentes patogénicos resulta na adoção de medidas para limpeza e desinfeção do ambiente hospitalar. As zonas não críticas são consideradas locais que oferecem baixo risco de transmissão e consequentemente há

redução natural das medidas de limpeza adotadas (Doll et al., 2018; Weldegebreal et al., 2019) e ausência de programas de monitorização definidos (Dancer, 2004). Entretanto, estudos relatados na literatura referem a ocorrência significativa de bactérias do grupo ESKAPE em áreas não críticas, nomeadamente torneiras dos quartos dos utentes, tubagens de duchas, cortinas de camas de enfermaria, luvas, bem como telemóveis dos funcionários do hospital e esses microrganismos estão envolvidos em episódios de infeções associadas aos cuidados de saúde (Caselli et al., 2016; de Abreu et al., 2014; Geadas Farias et al., 2017; Otter et al., 2011; Pendleton et al., 2013; Rutala & Weber, 2021; Squeri et al., 2012; Weber et al., 2013). O aparecimento de microrganismos em áreas não críticas facilita a transmissão secundária, através do contato das mãos dos profissionais de saúde e/ou do contato com equipamentos médicos (Arnold, 2014; Caselli et al., 2016; de Abreu et al., 2014; Geadas Farias et al., 2017; Han et al., 2015; Klassert et al., 2022; Mora et al., 2016; Otter et al., 2011; Pendleton et al., 2013; Rutala & Weber, 2019; Shek et al., 2018; Squeri et al., 2012; Weber et al., 2013).

## 1.5 A relação entre as IACS e o ambiente construído

Watson e colaboradores sugerem que a existência de surtos de IACS nos cuidados de saúde está relacionado com a carga biológica no ambiente construído (Watson et al., 2023). Embora a percentagem real de IACS diretamente relacionadas com os microrganismos presentes no espaço físico seja desconhecida, os microrganismos formam seus reservatórios no ar, na água e nas superfícies inanimadas (Bartley et al., 2010). Um quarto dos casos de IACS tem sido atribuído a organismos presentes em superfícies clínicas contaminadas (Watson et al., 2023).

Durante a construção/ renovação dos hospitais há produção de material particulado que pode apresentar esporos do género *Aspergillus* ou outros esporos de fungos. Estes esporos

podem ser transportados por grandes distâncias, o que representa um dos principais riscos ambientais aos utentes com problemas respiratórios ou gravemente imunocomprometidos. Outros patógenos transmitidos durante a renovação incluem estirpes dos géneros *Bacillus* spp e *Legionella*. Numa revisão de surtos notificados entre 1966 e 2005, houve 53 que afetaram 458 pacientes. A fonte provável mais comum foram os trabalhos de construção/renovação, totalizando 49% (Talento et al., 2019).

As alterações na rede de distribuição de água, durante períodos em que decorrem renovações do espaço hospitalar, podem perturbar o biofilme presente nas tubagens, representando uma ameaça aos utentes. O reservatório de micróbios patogénicos presente na água potável inclui bactérias Gram-negativas, nomeadamente *Legionella* e *Pseudomonas*, micobactérias não tuberculosas e fungos (Bartley et al., 2010).

Lax e colaboradores (2017) realizaram o estudo do microbioma de um hospital antes e depois da sua inauguração, a fim de caracterizar a diversidade bacteriana presente e a sua dinâmica. Para isso, analisaram amostras do microbioma da pele dos pacientes e compararam-nas com amostras da comunidade microbiana de diversas superfícies hospitalares. O estudo mostrou, após um dia de internamento, que o microbioma do utente se assemelhava bastante ao microbioma das grades da cama. Este resultado permitiu determinar o tempo necessário e a dinâmica que ocorre no ambiente hospitalar responsável pela transmissão de microrganismos aos utentes, sejam eles patógenos ou não (Lax et al., 2017).

Ao acompanhar as ocorrências nos equipamentos e nas superfícies hospitalares colonizadas por *Klebsiela* spp, *P. aeruginosa* e micobactérias não-tuberculosas num hospital da região Centro de Portugal, Farias e colaboradores (2017) constataram grande diversidade bacteriana em torneiras e cortinas dos chuveiros das casas de banho. Embora a comunidade microbiana identificada não tenha apresentado relação com o diagnóstico

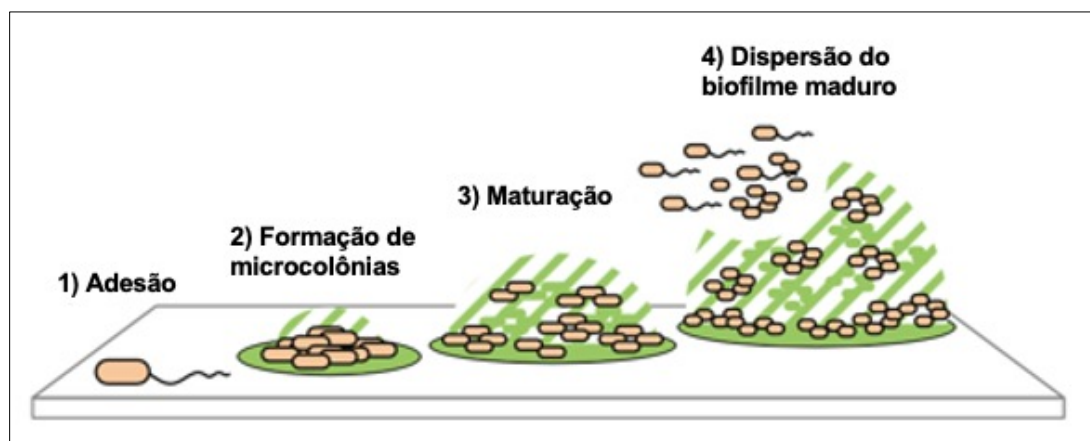
clínico dos utentes (os pacientes foram agrupados estatisticamente, independentemente do diagnóstico), o estudo revelou que os utilizadores preferenciais do espaço e equipamentos contribuíram para composição da comunidade microbiana ali identificada. Apesar do ambiente inanimado representar um reservatório de microrganismos, inclusive os multirresistentes, a presença de microrganismos resistentes no ambiente hospitalar não significa que venha a ocorrer a transferência cruzada, pois suas etapas são complexas. É exemplo os isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) onde apenas 35% das estirpes recuperadas dos utentes corresponderam as estirpes recuperadas do ambiente inanimado (Bartley et al., 2010).

## 1.6 Características de resistência das bactérias no ambiente hospitalar

Os estudos que evidenciam os locais propícios à colonização dos microrganismos no ambiente hospitalar são importantes por ajudar na compreensão das relações ecológicas existentes e as condições ambientais que contribuem para a sobrevivência dos microrganismos e conseqüente formação de biofilmes (Bartley et al., 2010).

Os biofilmes são definidos como sendo consórcios microbianos sésseis que constituem uma importante estratégia de sobrevivência dos microrganismos em condições ambientais adversas (Azeredo et al., 2017). A formação do biofilme, esquematizada na Figura 1.1, começa com a adesão de uma célula microbiana a uma determinada superfície, auxiliada por proteínas de superfície e substâncias poliméricas extracelulares. Durante a transição para a ligação irreversível, duas moléculas intracelulares são produzidas, o cAMP (do inglês, cyclic Adenosine Monophosphate) e c-di-GMP (do inglês bis-(3'-5')-cyclic dimeric Guanosine Monophosphate). A expressão destas moléculas depende das condições ambientais como por exemplo, as quantidades de carbono e oxigénio. Após a fixação irreversível, as células bacterianas iniciam a formação de micro colónias, as quais

proliferam e produzem substâncias poliméricas extracelulares. Estas substâncias envolvem as células do biofilme e apresentam diversas funções tais como: fornecem integridade estrutural à comunidade microbiana, promovem a adesão às superfícies e agregação celular, protegem contra stress, e retêm moléculas sinalizadoras de detecção de quorum sensing e enzimas extracelulares, até ao momento de dispersão das células (Azeredo et al., 2017).



**Figura 1.1 Modelo do ciclo de formação do biofilme em *Pseudomonas aeruginosa*.** Na primeira etapa, ocorre a adesão da célula planctônica à superfície através de proteínas associadas à parede celular. A multiplicação da célula planctônica e agregação gradativa leva a formação de micro colônias. O desenvolvimento da arquitetura do biofilme maduro com formação de subpopulações de células distintas entre as camadas interiores e exteriores ao biofilme até à dispersão das formas planctônicas (P. K. Taylor et al., 2014).

Segundo Mahmud & Gorzin (2017), os biofilmes desempenham um papel crucial no suporte aos microrganismos responsáveis por 60% das infeções nosocomiais. Como estrutura, os biofilmes podem ser resistentes à ação de antibióticos, tornando-se mais resistentes à medida que aumenta o seu período de permanência no local onde se formam, o que dificulta a sua erradicação, constituindo um grave problema de saúde pública (Mahmudi & Gorzin, 2017).

A base para a resistência e tolerância dos biofilmes aos antibióticos é multifatorial e envolve condições físicas, fisiológicas e genéticas. A resistência das bactérias nos biofilmes aos antibióticos depende da transferência lateral de genes, incluindo plasmídeos, transposões ou integrões (Ciofu & Tolker-Nielsen, 2019; Hall & Mah, 2017; Lebeaux et al., 2014; P. K. Taylor et al., 2014; Thi et al., 2020; Yin et al., 2022), da fraca difusão dos antibióticos através da matriz viscosa do biofilme, da taxa lenta de crescimento dos microrganismos no biofilme, dos diferentes fenótipos das células que formam o biofilme, do mecanismo das bombas de efluxo de antibióticos e da regulação do quorum sensing (Soto, 2013).

Em bactérias Gram-negativas, a saída de antibióticos através de bombas de efluxo é considerada um dos principais mecanismos responsáveis pela resistência aos antibióticos. A presença destas bombas permite que tais microrganismos extrudam substâncias tóxicas, incluindo os agentes antimicrobianos, para fora da célula, a fim de regular o ambiente celular interno (Soto, 2013).

Em bactérias Gram-positivas, duas estratégias principais determinam o mecanismo de resistência: a degradação enzimática do antibiótico pela produção de  $\beta$ -lactamases, ou pela diminuição da afinidade e suscetibilidade do seu sítio alvo, a proteínas de ligação à penicilina (PBP do inglês Penicillin-Binding Proteins) por qualquer aquisição de DNA exógeno ou por alterações nos genes PBP existentes (Jubeh et al., 2020).

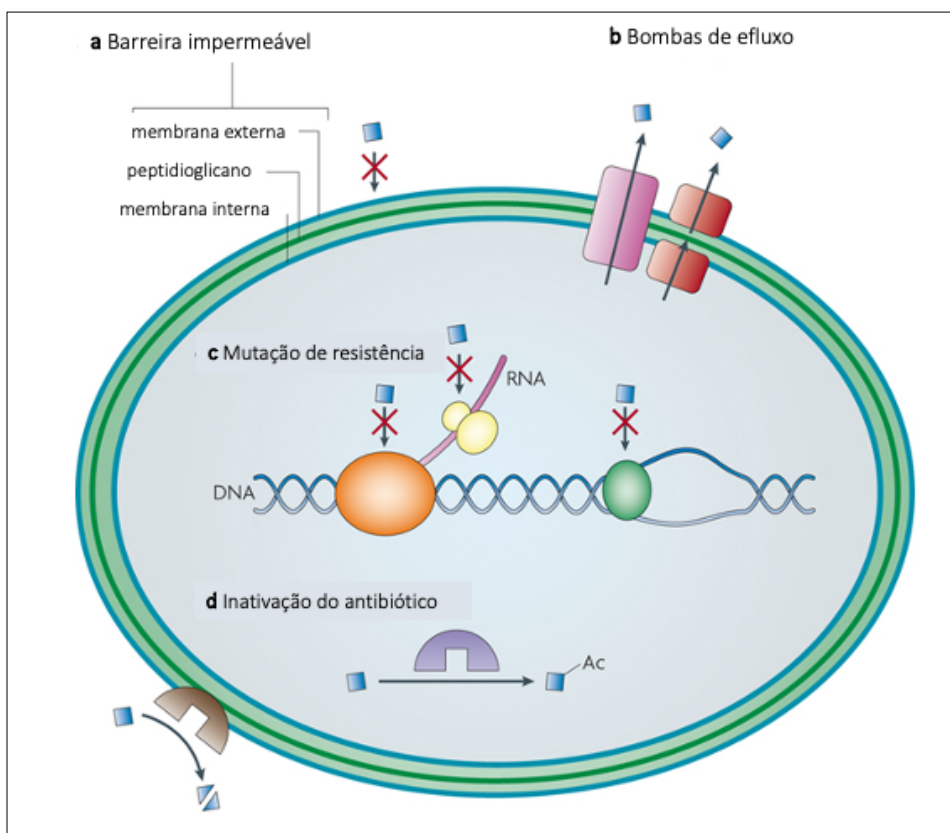
Em 2018, um estudo prospetivo longitudinal, desenvolvido num hospital do Canadá, demonstrou a influência das superfícies hospitalares como local de infeção cruzada por bactérias resistentes (Shek et al., 2018). Esse estudo mostrou que após 14 dias, 87,5% das cortinas estavam contaminadas por estirpes de *S. aureus*, que apresentavam resistência à metilicina. Apenas as cortinas do grupo controlo, as cortinas dos quartos sem



atendimento direto aos utentes ou contacto com profissionais de saúde apresentaram baixa contaminação (Shek et al., 2018).

### 1.7 *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* entre os patógenos causadores de infeções nosocomiais

*Pseudomonas aeruginosa* e *K. pneumoniae* são duas bactérias Gram-negativas, pertencentes ao grupo ESKAPE, apresentando perfil de multirresistência a muitas das suas estirpes (G. Mendes et al., 2022; Nordmann et al., 2007; S. G. Pereira et al., 2014). Em 2020, em Portugal, 11% e 24% das estirpes de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*, respetivamente, apresentaram um perfil de multirresistência antimicrobiana (Paiva et al., 2022). A Figura 1.2 evidencia de forma geral o mecanismo de resistência aos antimicrobianos em bactérias Gram-negativas.



**Figura 1.2 Mecanismos de resistência a antibióticos em uma bactéria Gram-negativa.** a | Barreira impermeável. Algumas bactérias são intrinsecamente resistentes a

certos antibióticos (quadrados azuis) simplesmente porque possuem uma membrana impermeável ou não possuem o alvo do antibiótico. b | Bombas de efluxo de multirresistência. Essas bombas extrusam antibióticos da célula. Alguns transportadores, como os da família de nodulação de resistência da divisão celular (rosa), podem bombear antibióticos diretamente para fora da célula, enquanto outros, como os da superfamília dos principais facilitadores (vermelho), os secretam para o periplasma. c | Mutações de resistência. Estas mutações modificam a proteína alvo, por exemplo, desativam o local de ligação da proteína ao antibiótico, mas deixam intacta a funcionalidade celular da proteína. Exemplos específicos incluem mutações na girase (verde), que causam resistência às fluoroquinolonas; na subunidade B da RNA polimerase (laranja), que causam resistência à rifampicina; e na proteína S12 da subunidade ribossômica 30S (codificada pelo gene *rpsL*) (amarelo), que causam resistência à estreptomicina. d | Inativação do antibiótico. A inativação pode ocorrer por modificação covalente do antibiótico, como aquela catalisada por acetiltransferases (roxo) que atua sobre antibióticos aminoglicosídeos, ou por degradação do antibiótico, como aquela catalisada por  $\beta$ -lactamases (castanho) que atuam sobre antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. Ac, grupo acetil (Allen et al., 2010).

A resistência inata aos antibióticos apresentada por *P. aeruginosa* resulta da baixa permeabilidade da parede celular e é reforçada pela atividade de sistemas de efluxo. Os sistemas de efluxo da *P. aeruginosa* são normalmente constituídos por uma bomba de membrana citoplasmática, uma proteína periplasmática e um canal proteico de membrana externa que permite a remoção de moléculas para fora da célula, inclusive os antibióticos (Soto, 2013).

Outra estratégia para a resistência aos antibióticos em *Pseudomonas* são as mutações que resultam em alterações nas proteínas membranares, as porinas. Em organismos resistentes, as proteínas que formam a parede desses poros foram alteradas de tal modo que limitam o fluxo através dos canais, surgindo resistência a muitas classes de antimicrobianos (Bălăsoiu et al., 2014).

Segundo ECDC (2017), *P. aeruginosa* são bacilos que são encontrados com facilidade no ambiente hospitalar em reservatórios húmidos com poucos nutrientes, criando condições propícias ao seu oportunismo enquanto patógeno. Devido à sua facilidade de desenvolvimento e capacidade de produzir biofilme, estirpes de *P. aeruginosa* podem colonizar diferentes superfícies, incluindo os reservatórios das bombas de aspiração de leite, incubadoras, lavatórios, assim como, mãos dos profissionais e até mesmo sabonetes para as mãos, potenciando a sua transmissão (Khan et al., 2015). Esta espécie está particularmente associada a doenças pulmonares como a fibrose quística (Boisvert et al., 2016; Maurice et al., 2018) e a pneumonia nosocomial associada à ventilação mecânica (PAV) (Maurice et al., 2018), podendo facilmente infetar pacientes com diferentes patologias.

A capacidade infecciosa de estirpes de *K. pneumoniae* está bem documentada e a sua importância tem aumentado progressivamente nos últimos anos devido ao aumento da resistência aos antimicrobianos. Simultaneamente, tem se verificado a colonização do ambiente hospitalar por esta espécie, sendo neste momento a causa de muitas infeções e surtos, especialmente em Portugal (Lebre et al., 2017).

Nas últimas décadas, o aumento da deteção de estirpes de *K. pneumoniae* produtoras da enzima carbapenemase tem representado uma ameaça significativa aos antibióticos carbapenemos, que representam o último recurso no tratamento de infeções por essa estirpe (Pitout et al., 2015). A resistência aos carbapenemos em *K. pneumoniae* está ligada a diferentes mecanismos e a co-ocorrência de alterações na permeabilidade da membrana externa, juntamente com a superprodução de  $\beta$ -lactamase com atividade de carbapenemase e a superexpressão de bombas de efluxo (Pitout et al., 2015). Em Portugal, foi também identificada a presença de estirpes de *K. pneumoniae* da Guiana Francesa (GES, do inglês Guiana Extended Spectrum  $\beta$ -lactamase), variante 5 (GES-5)

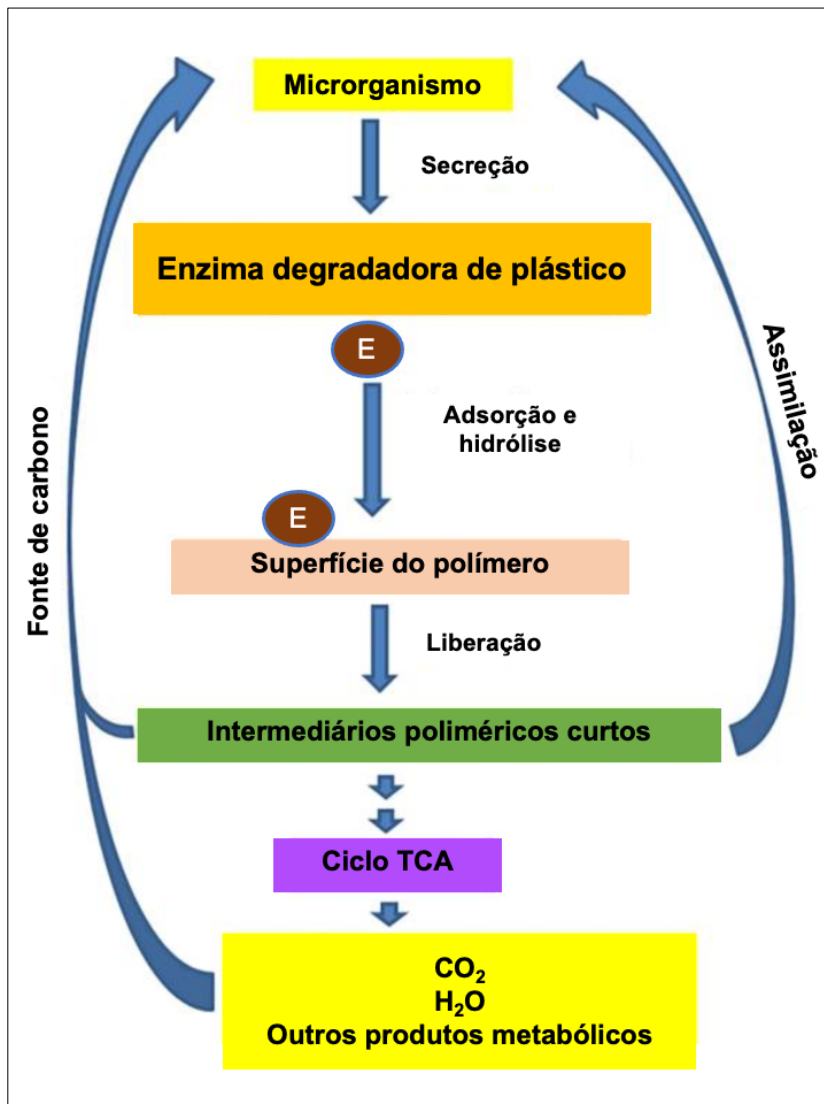
com atividade contra os carbapenêmicos, nomeadamente o imipenem (G. Mendes et al., 2023).

Estirpes de *K. pneumoniae* são comuns em hospitais, onde podem ser transmitidas de paciente para paciente, através do contacto com as superfícies ou equipamentos contaminados, como cateteres ou ventiladores (Ndlovu et al., 2023). Em ambientes não clínicos, *K. pneumoniae* está presente no solo, nas fontes de águas superficiais, nas plantas e no trato gastrointestinal de mamíferos (Ndlovu et al., 2023). Hassan e colaboradores (2019) realizaram um estudo num hospital público em Bangladesh, a fim de identificar superfícies hospitalares contaminadas por *K. pneumoniae*. As superfícies mais contaminadas foram o lençol, a toalha e a grade da cama, destacando ainda os riscos por não haver práticas rotineiras de limpeza de superfícies neste hospital (Hassan et al., 2019).

Diversas estirpes de *P. aeruginosa* estão referenciadas como tendo capacidade de biodegradação de polímeros (Maurice et al., 2018; Wilkes & Aristilde, 2017). Algumas estirpes de *P. aeruginosa* ao colonizar superfícies de materiais poliméricos têm a capacidade de obter elementos essenciais ao seu crescimento a partir desses materiais, resultando na degradação dos materiais (Linos et al., 2000; Maurice et al., 2018; Wilkes & Aristilde, 2017). Normalmente, a formação de biofilme precede a biodegradação do polímero (Ghosh et al., 2019). Durante a fase de fixação das células na superfície do polímero, as bactérias podem libertar enzimas extracelulares capazes de degradá-los, libertando o carbono necessário ao crescimento da célula (Ghosh et al., 2019; Mohanan et al., 2020).

O processo de biodegradação do plástico apresentado em forma esquemática na Figura 1.3, como exemplo, envolve as seguintes etapas: 1) biodeterioração, que envolve a modificação das propriedades do polímero, facilitando a sua posterior degradação; 2)

biofragmentação, que resulta na hidrólise e fragmentação das cadeias de carbono do polímero e na liberação de produtos intermediários da degradação; 3) bioassimilação dos produtos intermediários pelas células microbianas e sua incorporação na biomassa; 4) mineralização, que acompanha a degradação completa do plástico em  $\text{CO}_2$  e água (Kotova et al., 2021).



**Figura 1.3** O mecanismo geral de degradação biológica de plásticos em condições aeróbicas. A biodegradação dos plásticos envolve a liberação de enzimas extracelulares pelo microrganismo, a fixação da enzima à superfície do plástico, a hidrólise em intermediários poliméricos curtos, que são finalmente assimilados pelas células dos

microrganismos como fonte de carbono para liberar CO<sub>2</sub>. Ciclo TCA, do inglês Tricarboxylic Acid ou ciclo do ácido tricarboxílico (Mohan et al., 2020).

Polímeros derivados de petróleo como o policloreto de vinilo (PVC) são extremamente recalcitrantes às vias naturais de biodegradação. Embora a biodegradação destes plásticos no ambiente natural seja possível, este processo poderá demorar longos períodos de tempo, sendo de 50 a 150 anos no caso do PVC. A taxa de biodegradação dos polímeros sintéticos depende de vários fatores, incluindo as suas estruturas químicas, pesos moleculares e graus de cristalinidade. Alguns estudos já demonstraram a capacidade de degradação do PVC através do uso de microrganismos, incluindo estirpes de *P. aeruginosa* (Mohan et al., 2020).

O látex da borracha natural é um biopolímero com propriedades elásticas, sintetizado por mais de 2000 espécies de plantas, embora apenas o látex produzido pelas espécies *Hevea brasiliensis* (99% do mercado mundial) e *Parthenium argentatum* (1% do mercado mundial) seja comercializado. Bactérias e fungos provenientes do solo têm mostrado um notável potencial em degradar o látex, utilizando-o como uma fonte natural de carbono e energia. Dentre esses microrganismos, destacam-se estirpes como a *P. aeruginosa* AL98 (Ali Shah et al., 2013; de Lima et al., 2023).

É de suma importância a compreensão das características de patógenos infecciosos pois permite a elaboração de estratégias de controle e monitoramento das IACS. Nas últimas décadas o controle e prevenção de infecções hospitalares tem merecido um crescente interesse da parte de vários Serviços de Saúde a nível mundial, e de várias agências governamentais (Rosenthal et al., 2016). Hoje, é obrigatório as instituições hospitalares possuírem uma equipa multidisciplinar (CCIH - Comissão de Controle de Infecção Hospitalar) que, de acordo com as características físicas e funcionais de cada instituição,

avalia os riscos específicos nelas existentes e promove a divulgação e a aplicação de medidas adequadas à prevenção ou o combate de infeções hospitalares, caso ocorram.

## 1.8 As adaptações ao estudo face o cenário pandémico

A pandemia ocasionada pelo coronavírus alterou profundamente a vida de toda a população mundial. Em Portugal, a rápida disseminação do vírus e a ausência de veiculação das condutas terapêuticas fez com que a Assembleia da República pedisse à Presidência da República a declaração do estado de emergência. A 2 de Março de 2020, Portugal registava os primeiros casos de COVID-19; as escolas encerraram suas atividades no dia 15 de Março de 2020 e três dias após o estado de emergência foi declarado pelo governo português, e o lockdown (confinamento) é obrigatório. A mobilização do poder público no enfrentamento da pandemia esteve em linha com o ocorrido em Espanha, Itália e França. A situação foi encarada com seriedade e ampla informação passou a ser divulgada diariamente. O governo português desenvolveu uma plataforma para acompanhamento da evolução da pandemia por região do país e o COVID-19 passou a ter legislação específica.

## 1.9 A importância dos dispositivos de proteção respiratória em cenários de pandemia

Para combater a disseminação da COVID-19, o poder público tornou obrigatório o uso de dispositivos de proteção respiratória (DPR), tanto em contexto profissional como social. Os países que favoreceram o uso de máscaras pela população no início do surto de COVID-19 tiveram baixa mortalidade relacionada ao vírus (Howard et al., 2021; Leffler et al., 2020; WHO, 2020).

Os DPRs são equipamentos de proteção respiratória que, ao serem utilizados por um indivíduo contaminado, criam uma barreira capaz de controlar a dispersão da infecção e a potencial contaminação do ambiente por essa infecção (Canini et al., 2010; Chu et al., 2020). Existem diferentes tipos de DPRs, nomeadamente máscaras cirúrgicas (MC), máscaras KN95 (KN) e máscaras de pano (MP).

As máscaras cirúrgicas constituem uma barreira física para a proteção respiratória que não deve ser partilhada e não deve ser utilizada mais de uma vez (Canini et al., 2010; WHO, 2020). Quando usadas corretamente, as MC ajudam a bloquear a inalação de gotas, sprays ou respingos que podem conter vírus e bactérias (Canini et al., 2010; WHO, 2020). As máscaras KN95 (KN) são projetadas para fornecer uma vedação ao redor do nariz e da boca. As KNs são classificadas como um dispositivo de proteção respiratória por constituir um sistema de filtração muito eficiente de partículas transportadas pelo ar (Chu et al., 2020). As MP produzidas em tecido têm por objetivo serem reutilizadas; portanto, devem permitir a sua lavagem e ser capazes de suportar altas temperaturas (WHO, 2020).

Todos os três tipos de DPRs (MC, KN e MP) incluem diferentes camadas de materiais de polipropileno (PP) e polietano tereftalato (PET) e possuem três camadas protetoras (Lordelo et al., 2022), como exibido na Figura 1.4: 1) Máscaras cirúrgicas (MC): camada externa (E, tecido não tecido de PP), camada intermédia (M, tecido não tecido fundido por fusão PP), e camada interna (I', tecido não tecido de PP). 2) Máscaras KN95 (KN): camada externa (E, tecido não tecido de PP), camada intermédia (M, tecido não tecido fundido por fusão PP de algodão), e camada interna (I', tecido não tecido de PP). 3) Máscaras de pano (MP): camada externa (E, tecido PET), camada intermédia próxima à camada externa (ME, tecido não tecido de PP), intermédia próxima à camada interna (MI,



tecido não tecido de PP), e camada interna (I', tecido PET – diferente da camada externa).



**Figura 1.4** Imagens de três tipos de DPRs. Topo: máscaras cirúrgicas (MC); Centro: máscaras KN95 (KN); e Base: máscaras de pano (MP). Camadas constituintes dos DPRs: camada externa (E), camada interna (I'), e camada intermédia (M). No caso das máscaras tipo MP, as camadas intermédias foram indicadas como camada intermédia próxima à camada externa (ME) e camada intermédia próxima à camada interna (MI).

### 1.10 Os processos de descontaminação dos DPRs

As máscaras cirúrgicas e KN95 são consideradas descartáveis. O seu uso massificado durante a pandemia com quebras no reabastecimento e dificuldades nas cadeias produtivas, chamou à atenção para a necessidade de pensar e comprovar a sua

reutilização sem perda de funcionalidade e qualidade (Lordelo et al., 2022). Essa reutilização permitiria responder a um cenário futuro de escassez de máscaras, à medida que possibilitaria elaborar e testar protocolos de reutilização apresentados como parte de um plano de contingência (Lordelo et al., 2022).

Ao mesmo tempo, o consumo em massa de máscaras cria um problema ambiental, decorrente do seu descarte como lixo doméstico. Ao apresentar o reaproveitamento das DPRs, segundo protocolos de descontaminação credíveis e testados, uma única reutilização reduzirá a pegada ambiental em 50% (Lordelo et al., 2022).

Diversos estudos mostraram a importância da adoção de estratégias de limpeza, desinfecção e monitorização de superfícies ambientais e dispositivos médicos na prevenção da transmissão de organismos patogênicos (Han et al., 2015; Rutala & Weber, 2019). O peróxido de hidrogénio nebulizado ( $H_2O_2$ ) foi utilizado na descontaminação de uma ampla gama de microrganismos e não apresentou toxicidade à saúde humana após a sua conversão em água e oxigénio (WHO, 2020). O efeito da descontaminação por  $H_2O_2$  foi examinado em máscaras cirúrgicas e máscaras KN95 e respetivas tiras elásticas contaminadas com coronavírus suíno. Esse tratamento permitiu uma redução de cinco ordens de grandeza do número de microrganismos das máscaras contaminadas (Ludwig-Begall et al., 2020). Sacos para vapor de micro-ondas também foram aplicados na descontaminação de máscaras KN95 e os resultados mostraram uma redução de 3 ordens de grandeza (E. M. Fisher et al., 2011). Num outro estudo, foi desenvolvido um Procedimento Operacional Padrão que foi seguido pelos profissionais de saúde, tendo demonstrado eficiência do processo de desinfecção dos respiradores elastoméricos com hipoclorito de sódio (Bessesen et al., 2015).

## Objetivos

A contaminação do espaço hospitalar por microrganismos do grupo ESKAPE contribui significativamente para as infeções associadas aos cuidados de saúde (IACS). O Centro Europeu de Controlo de Doenças estima um total de quatro milhões de episódios de IACS, a cada ano, na Europa. Os utentes que são afetados pelas IACS aumentam o seu tempo de permanência nos hospitais e os custos no tratamento.

Considerando todos os problemas geralmente associados à contaminação de espaços hospitalares, esta tese teve por objetivo geral mapear a colonização do espaço hospitalar por microrganismos do grupo ESKAPE. Particularmente, focamo-nos nas estirpes das espécies *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*, visando compreender as características específicas desses isolados que favorecem sua permanência nesses ambientes não críticos. Assim, este estudo pretendeu não apenas documentar a dispersão destes microrganismos em diferentes superfícies hospitalares, mas também compreender as particularidades que conferem a essas estirpes a capacidade de persistir nos espaços hospitalares. Este conhecimento poderá proporcionar informações valiosas para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e controlo da disseminação desses patógenos.

O trabalho de investigação desta tese encontra-se dividido em três capítulos. O segundo capítulo da tese, intitulado “Importância da aplicação de índices microbiológicos no controlo de qualidade microbiológica ambiental nos hospitais”, teve por objetivo identificar os pontos de dispersão microbiana presentes nos equipamentos e superfícies hospitalares não críticas a partir da determinação do número total de microrganismos cultiváveis e da presença de microrganismos das espécies *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*. A aplicação dos índices de Dancer permitiu comparar estes resultados numa

perspetiva temporal no mesmo hospital e determinar os locais propensos à criação de reservatórios microbianos nos equipamentos e superfícies não críticas.

O estudo assumiu os índices microbianos em superfícies não críticas, propostos por Dancer, como ferramentas de monitorização de IACS que contribuem para o controlo de qualidade nos hospitais.

O terceiro capítulo da tese, intitulado “Avaliação da resistência antimicrobiana, formação de biofilme e potencial de modificação de superfícies por isolados hospitalares de *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*”, teve por objetivo a avaliação de 33 estirpes de *P. aeruginosa* e de 2 *K. pneumoniae*, isoladas a partir de equipamentos e superfícies não críticas de um hospital português, quanto à resistência a agentes antimicrobianos, à capacidade de produção de biofilme e ao potencial para degradação de material polimérico de uso hospitalar.

Duas bactérias do grupo ESKAPE, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*, estão normalmente relacionadas a perfis de multirresistência em Portugal. A capacidade de resistir aos antibióticos e produzir biofilmes pode contribuir para a persistência de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* nas superfícies não críticas do ambiente hospitalar, torna ineficaz a ação dos biocidas, contribuindo para a transmissão cruzada pelas mãos dos profissionais de saúde.

Uma vez que o período do trabalho desta tese compreendeu o tempo da pandemia COVID-19, e dado que o impacto da pandemia promoveu mudança de ações, no sentido de encontrar soluções que impedissem ou minimizassem o avanço do vírus, houve a necessidade de avaliar estratégias de desinfeção dos dispositivos de proteção respiratória (DPRs). A necessidade de proteger a saúde pública e mitigar o impacto ambiental associado ao uso massificado dos DPRs de modo a sensibilizar para reutilização segura de máscaras descontaminadas por indivíduos e organizações motivou a realização do trabalho publicado em revista científica e apresentado no quarto capítulo. Assim, o quarto

capítulo da tese intitulado “Avaliação da eficácia microbiológica de três métodos de descontaminação de máscaras e o seu impacto na filtração, permeabilidade ao ar e propriedades físico-químicas” teve por objetivo avaliar a eficácia de três métodos de descontaminação de máscaras por peróxido de hidrogénio, lixívia comercial e sacos de vapor, de forma a reduzir a demanda de DPRs e mitigar o impacto ambiental prejudicial do seu uso excessivo e descarte concomitante. Este estudo procurou aumentar o atual estado da arte nos métodos de descontaminação de máscaras, ao fornecer uma imagem abrangente dos efeitos do uso de vários ciclos de tratamento.

## **Lista de publicações**

A tese é baseada em artigos publicados ou manuscritos:

**Lordelo, R., Botelho, J. R. S., Morais, P. V., de Sousa, H. C., Branco, R., Dias, A. M. A., & Reis, M. S.** Evaluation of the Microbiological Effectiveness of Three Accessible Mask Decontamination Methods and Their Impact on Filtration, Air Permeability and Physicochemical Properties. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2022 May 27; 19 (11), 1–20. <https://doi.org/10.3390/ijerph19116567>

**Lordelo, R., Branco, R., Morais, P. V.** The microbiological index application in the environment microbiological quality control in the hospitals. (Draft finalizado em submissão).

**Lordelo, R., Branco, R., Morais, P. V.** Assessment of Antimicrobial Resistance, Biofilm Formation, and Surface Modification Potential in *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* Hospital Isolates. (Submetido HELIYON-D-23-61983).



**Capítulo II: Importância da aplicação de índices microbiológicos no  
controle de qualidade microbiológico ambiental em hospitais**





## Resumo

O Centro Europeu de Prevenção e Controlo de Doenças (CECD) estima um total de quatro milhões de infeções associadas aos cuidados de saúde (IACS) por ano na Europa. A monitorização dos parâmetros microbianos nos serviços de saúde e a especificação de índices microbiológicos de monitorização para um ambiente hospitalar mais seguro surgem como alternativas úteis que podem auxiliar no acompanhamento e controlo das IACS e na gestão do risco de aquisição dessas infeções. O presente estudo teve por objetivo identificar pontos de dispersão microbiana presentes nos equipamentos e superfícies hospitalares não críticas a partir do uso dos índices qualitativo e quantitativo de Dancer e, em seguida, comparar estes resultados numa perspetiva temporal. Pretendeu-se assim, identificar locais propensos à criação de reservatórios microbianos nos equipamentos e superfícies não críticas. Durante 4 meses, equipamentos e superfícies hospitalares não críticas de três enfermarias (Cardiologia, Pneumologia, Hematologia) de um hospital da região Centro de Portugal foram amostradas, num total de 264 amostras. Destas, 116 amostras apresentaram microrganismos capazes de crescer nos meios de cultivo utilizados, *Pseudomonas* Isolation Ágar (PIA) e/ou *Klebsiella* Selective Ágar (KSA). Do total de microrganismos recuperados no meio PIA, representado como Unidades Formadoras de Colónia (UFC), 43% foram recuperadas de amostras provenientes da enfermaria da Cardiologia, 28,5% da Pneumologia e 28,5% da Hematologia. O meio KSA recuperou menor número de microrganismos cultiváveis que o meio PIA, tendo as amostras da Pneumologia apresentado o maior número de isolados (41% do total), seguido da Hematologia e da Cardiologia com 32% e 27%, respetivamente.

O índice quantitativo de Dancer, calculado a partir das contagens das UFC/ cm<sup>2</sup>, considerou a concentração de 5 UFC/ cm<sup>2</sup> nos equipamentos e superfícies não críticas como valor limite indicador de qualidade. Na enfermaria da Cardiologia, verificou-se uma colonização bacteriana superior ao limite em diversas áreas, listadas por ordem decrescente: a cadeira de

apoio ao banho (127 vezes acima do índice), a parte interna da mangueira do chuveiro (120 vezes) e a parte interna do dispersor do chuveiro (94 vezes). Na enfermaria da Pneumologia excederam o limite, a parte interna da mangueira do chuveiro (2.800.000 vezes), a torneira do lavatório do quarto (185 vezes) e a cadeira de apoio ao banho (77 vezes). Na Hematologia, a torneira da sala de enfermagem (22.000 vezes), a parte interna da mangueira do chuveiro (37 vezes) e o chuveiro da casa de banho (18 vezes) excederam o índice. Os meios PIA e KSA recuperaram *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*, e outros 14 géneros bacterianos, todos Gram-negativos, que foram identificados ao nível de género e/ou da espécie através da análise da sequência do gene que codifica o RNA ribossómico 16S. Entre as estirpes isoladas foram identificadas bactérias indicadoras de infeção, segundo o índice qualitativo de Dancer, incluindo as pertencentes ao grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp.). Todas as três enfermarias apresentaram bactérias indicadoras de infeção, tendo a maior diversidade sido observada na Cardiologia, onde foram isoladas estirpes das espécies *P. aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter* sp. e *K. pneumoniae*. Estirpes de *P. aeruginosa* foram também encontradas na Hematologia e na Pneumologia, tendo esta última evidenciado maior número destas estirpes. Estirpes de *K. pneumoniae* foram também isoladas a partir de amostras recolhidas da enfermaria da Hematologia. Ao comparar os equipamentos e superfícies não críticas do mesmo hospital, em períodos diferentes, é possível constatar um padrão de repetição de colonização dos equipamentos em contato com as zonas húmidas.

A presença de bactérias do grupo ESKAPE nos equipamentos e superfícies não críticas do hospital indica que estes podem constituir potenciais reservatórios de infeções associadas aos cuidados de saúde, conclusão que realça a necessidade da monitorização periódica desses itens através da pesquisa microbiológica e aplicação dos índices de Dancer.

## 2.1 Introdução

O Centro Europeu de Prevenção e Controlo de Doenças (CECD) estima um total de quatro milhões de infeções associadas aos cuidados de saúde (IACS) por ano na Europa. De 2011 a 2012, 10,8% dos doentes internados em Portugal adquiriram pelo menos uma infeção durante o período de internamento, enquanto no resto da Europa o valor foi de 6,0%. Em 2017, apesar deste valor em Portugal ter diminuído para 7,8%, continuou superior à média europeia (PPCIRA, 2017).

A monitorização dos parâmetros microbianos nos serviços de saúde e a especificação de índices de controlo de qualidade surgem como estratégias úteis que podem auxiliar no acompanhamento e controlo das IACS e, na gestão do risco de aquisição dessas infeções (Bogusz et al., 2013; Claro et al., 2015; Dancer, 2004; Dolan et al., 2011; Moore & Griffith, 2007). A monitorização da carga microbiana em ambientes hospitalares não faz parte da rotina do hospital e é considerado um trabalho árduo, sendo muitas vezes difícil de aplicar (Bogusz et al., 2013; Claro et al., 2015; Dancer, 2004; Dolan et al., 2011; Moore & Griffith, 2007; Rawlinson et al., 2019; Schulster et al., 2004). Para além disso, a metodologia é considerada dispendiosa e utilizada apenas quando ocorre a propagação de surtos (Robakowska et al., 2021; Schulster et al., 2004), apesar de ser amplamente utilizada em outras áreas, nomeadamente, no controlo de qualidade na indústria alimentar (Dancer, 2004).

O entendimento dos riscos de transmissão de agentes patogénicos resulta na adoção de medidas para limpeza e desinfeção do ambiente hospitalar. As zonas não críticas são consideradas locais que oferecem baixo risco de transmissão e, conseqüentemente há redução natural das medidas adotadas para limpeza (Doll et al., 2018; Weldegebreal et al., 2019) e ausência de programas de monitorização definidos (Dancer, 2004). Entretanto, estudos relatados na literatura referem a ocorrência significativa de bactérias do grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter*

*baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp.) em áreas não críticas, nomeadamente em torneira dos quartos dos utentes, tubagens de duche, cortinas das camas das enfermarias, luvas, bem como telemóveis dos funcionários do hospital e, esses microrganismos estão envolvidos em episódios de infeções associadas aos cuidados de saúde (Caselli et al., 2016; de Abreu et al., 2014; Geadas Farias et al., 2017; Otter et al., 2011; Pendleton et al., 2013; Rutala & Weber, 2021; Squeri et al., 2012; Weber et al., 2013). O surgimento dos reservatórios de microrganismos em áreas não críticas facilita a transmissão secundária, através do contato das mãos dos profissionais de saúde e/ou do contato com equipamentos médicos (Arnold, 2014; Caselli et al., 2016; de Abreu et al., 2014; Geadas Farias et al., 2017; Han et al., 2015; Klassert et al., 2022; Mora et al., 2016; Otter et al., 2011; Pendleton et al., 2013; Rutala & Weber, 2019; Shek et al., 2018; Squeri et al., 2012; Weber et al., 2013).

A colonização microbiana em áreas não críticas do ambiente hospitalar pode ser interpretada de forma qualitativa ou quantitativa. Organismos pertencentes ao grupo ESKAPE (Geadas Farias et al., 2017; Pendleton et al., 2013) e *Clostridium difficile* (Dancer, 2004) são considerados indicadores de risco para infeções associadas aos cuidados de saúde (Dancer, 2004; Robakowska et al., 2021). Consequentemente, a presença de um ou mais organismos indicadores de infeção por  $\text{cm}^2$  estabelece uma medida qualitativa e suscita atenção para a monitorização de infeções associadas aos cuidados de saúde (Dancer, 2004; Robakowska et al., 2021). A identificação de um microrganismo indicador em superfícies é frequentemente representada pela expressão Unidade Formadora de Colónias/  $\text{cm}^2$  (UFC/  $\text{cm}^2$ ) (Dancer, 2004; Robakowska et al., 2021).

O critério de avaliação quantitativa consiste na enumeração total de microrganismos aeróbios presentes numa área amostrada. O valor igual ou superior de 5 UFC/ $\text{cm}^2$  de qualquer organismo em superfícies hospitalares indica que estas áreas oferecem condições para o

desenvolvimento de qualquer microbiota devido à ausência de métodos de desinfecção eficazes (Dancer, 2004; Dolan et al., 2011; Rutala & Weber, 2021).

Como ferramenta de pesquisa, os mesmos indicadores foram utilizados para determinar potenciais reservatórios ambientais de patógenos e a fonte de contaminação do ambiente. Hutchins e colaboradores (2017) realizaram o primeiro estudo de investigação da contaminação cruzada entre um pano de microfibras e um dispersor de torneira durante o processo de limpeza. Os resultados apresentados demonstraram que os dispersores de torneira podem ficar contaminados com *P. aeruginosa* quando limpos por um pano contaminado e esta contaminação pode persistir (Hutchins et al., 2017). Ekrami e colaboradores (2011) identificaram estirpes de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* em instrumentos médicos e superfícies inanimadas em enfermarias de diferentes hospitais universitários no Irão. A pesquisa concluiu que estas bactérias contribuíram para o alto nível de contaminação nas superfícies hospitalares e representavam um importante problema para o hospital (Ekrami et al., 2011).

O presente estudo teve por objetivo identificar pontos de dispersão microbiana presentes nos equipamentos e superfícies hospitalares não críticas a partir da determinação do número total de microrganismos cultiváveis e da presença de microrganismos das espécies *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*. A aplicação dos índices de Dancer permitiu comparar estes resultados numa perspectiva temporal dentro do mesmo hospital e determinar os locais propensos à criação de reservatórios microbianos.

## 2.2 Metodologia

### 2.2.1 Área de Estudo

O Centro Hospitalar utilizado neste estudo é um Centro de referência do Sistema Nacional de Saúde. Esta instituição atua na área da saúde e no desenvolvimento de atividades de ensino,

investigação e extensão. O hospital conta com 1849 camas e 13 enfermarias, onde 3 delas, enfermarias da Cardiologia, Pneumologia e Hematologia, foram visitadas mensalmente durante 4 meses para a amostragem. A amostragem teve início pela manhã, antes dos serviços de limpeza.

Foram selecionados equipamentos e superfícies não críticas propícias a serem tocados com maior frequência por utentes, profissionais de saúde ou visitantes, incluindo interruptores de luz, controlo remoto da cama, suporte da cabeceira da cama, maçaneta da sala de enfermagem, torneira do lavatório da sala de enfermagem, mesa de cabeceira e grade da cama (Claro et al., 2015; Dancer, 2004; Geadas Farias et al., 2017). Além disso, foram selecionadas amostras de superfícies de ambientes húmidos, locais mais propícios ao crescimento microbiano (Gajdács et al., 2021; Geadas Farias et al., 2017; Mena & Gerba, 2009; Ong et al., 2020; Suleyman et al., 2018; Taudien et al., 2023). Aqui, as amostras incluem o ralo do lavatório do quarto do utente, chuveiro da casa de banho, cadeira de apoio ao banho, parte interna do dispersor do chuveiro, parte interna da mangueira do chuveiro, parede do duche e torneira do lavatório da sala de enfermagem (Geadas Farias et al., 2017).

A cada tempo de amostragem, foram colhidas 66 amostras totais dos equipamentos e superfícies não críticas das enfermarias da Cardiologia (C), Pneumologia (P) e Hematologia (H). No final do período de 4 meses, totalizaram 264 amostras.

### 2.2.2 Metodologia de amostragem

Cada amostra consistiu em esfregar uma área de 5 x 5 cm<sup>2</sup> na superfície dos equipamentos e superfícies não críticas que foram amostrados utilizando swabs estéreis (Dolan et al., 2011; Jansson et al., 2020; Moore & Griffith, 2007) pré-molhados em Água Peptonada (Peptone Water - PW) e, em seguida, armazenados em tubos com 3 ml de PW (Rawlinson et al., 2019). As amostras foram mantidas a 4 °C e transportadas para o laboratório, onde foram colocadas em agitação a 110 rpm, a 4 °C, durante à noite (Geadas Farias et al., 2017; Gilbert et al.,

2014). Locais como ralo do lavatório do quarto, chuveiro da casa de banho, torneira da sala de enfermagem, parte interna da mangueira do chuveiro e parte interna do dispersor do chuveiro foram adicionalmente testados para a remoção do biofilme.

### 2.2.3 Determinação da carga microbiana e isolamento bacteriano

Alíquotas de 0,1 ml do tubo original ou de diluições decimais foram espalhadas nos meios de cultura sólidos *Pseudomonas* Isolation Agar (PIA) e *Klebsiella* Selective Agar (KSA). Após a incubação durante 24 h a 37 °C, foram contadas as unidades formadoras de colónia (UFC) e os resultados expressos em UFC/ cm<sup>2</sup> (Claro et al., 2015; da Silva et al., 2022). Colónias cultivadas em meios de cultura PIA e KSA exibindo as características fenotípicas de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*, respetivamente, foram repicadas em meio sólido Luria Bertani (LB).

Devido à quantidade de *P. aeruginosa* presumíveis isoladas, foi realizada a técnica de tipagem por Amplificação ao Acaso do DNA Polimórfico/ Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), devido a sua simplicidade, baixo custo e capacidade de tipar uma ampla variedade de estirpes de bactérias num curto espaço de tempo (Abou-Dobara et al., 2010). Inicialmente, o DNA de cada estirpe isolada foi extraído utilizando o protocolo de Pitcher e colaboradores (1989) aplicável a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Pitcher et al., 1989). Após a extração, o DNA foi amplificado de acordo com o método modificado (Abdel-Rhman & Rizk, 2021; Hematzadeh & Haghkhah, 2021; Parsa et al., 2020). A amplificação foi feita utilizando um termociclador (Bio-Rad, EUA) e uma mistura com o volume final de 30 µl, contendo 7,5 µl de Master Mix (Taq-DNA Polimerase, tampão de reação, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs) (Parsa et al., 2020), 2 µl do primer OPA3 (5'-AGTCAGCCAC-3'), 17,5 µl de água ultrapura e 3 µl do DNA. As condições do PCR foram: 1 ciclo de 5 minutos a 94 °C, seguido de 30 ciclos de amplificação constituídos por desnaturação a 94 °C por 1 minuto, emparelhamento dos oligonucleótidos a 45 °C por 1 minuto, extensão a 72 °C por 1 minuto, e

finalmente uma extensão a 72 °C por 7 minutos. *Pseudomonas aeruginosa* (UCCCB 116) foi utilizada como controlo positivo e a água ultrapura como controlo negativo.

Os produtos RAPD-PCR foram colocados em gel de agarose a 2% preparado com 10 µl de brometo de etídio e separados por eletroforese a 120 V (Hematzadeh & Haghkhah, 2021). Foi utilizado 4 µl do padrão de corrida Nzytech Ladder para monitorização das bandas. Os padrões de bandas foram observados sob luz ultravioleta no sistema de documentação de gel Bio Rad. Os perfis digitais do DNA foram registados e comparados visualmente e as bactérias isoladas foram agrupadas em perfis com base na semelhança em tamanho e número das bandas amplificadas (Hesham, 2019). Perfis que diferiram entre si por apenas uma banda principal ou por uma ou duas bandas fracas foram considerados como variações menores que representam um subtipo de uma estirpe comum (Hematzadeh & Haghkhah, 2021).

#### 2.2.4 Identificação da sequência do gene 16S rRNA dos isolados

Isolados selecionados por perfil RAPD foram usados para amplificar o gene que codifica o RNA ribossómico 16S (gene 16S rRNA) usando os primers universais 27 F e 1525 R (Deurenberg et al., 2017; Geadas Farias et al., 2017). As reações de amplificação ocorreram no termociclador (Bio-Rad, EUA) num volume final de 30 µl contendo 7,5 µl de Master Mix, 1 µl de cada primer (27 F e 1525 R), 18,5 µl de água ultrapura e 2 µl do DNA.

As condições de amplificação foram: 5 minutos a 95 °C, 30 ciclos de PCR consistindo em desnaturação a 95 °C por 1 minuto, anelamento a 54 °C por 1 minuto, extensão a 72 °C por 1,5 minutos, uma extensão final a 72 °C por 7 minutos e em seguida, mantida a 10 °C. *Pseudomonas aeruginosa* (UCCCB 116) foi utilizada como controlo positivo e a água ultrapura como controlo negativo (de Abreu et al., 2014; Geadas Farias et al., 2017). Os amplificadores foram visualizados após eletroforese em gel de agarose a 1%. A purificação dos produtos de PCR a partir do gel foi feita utilizando o kit de purificação ENZNA gel (OMEGA- VWR), conforme as recomendações do fabricante (Geadas Farias et al., 2017).



O DNA purificado foi sequenciado pela empresa MacroGen e as sequências de 16S rDNA (Figura S1) obtidas foram alinhadas pelo programa Windows CLUSTAL X (Geadas Farias et al., 2017), gerando uma sequência final de rDNA (Abdel-Rhman & Rizk, 2021; Deurenberg et al., 2017; Hesham, 2019; Saxena et al., 2014). A homologia das sequências finais foi então comparada com a base de dados NCBI através do BLAST (Geadas Farias et al., 2017; Saxena et al., 2014).

### 2.2.5 Análise estatística

A análise estatística de significância das diferenças foi realizada para investigar a relação entre os grupos de dados selecionados. Usando o programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software; San Diego, CA, EUA), os locais de amostragem foram analisados em grupos de acordo com o número de UFC/ cm<sup>2</sup> obtido por enfermaria (Cardiologia, Pneumologia, Hematologia) e a UFC/ cm<sup>2</sup> obtida por equipamentos e superfícies não críticas.

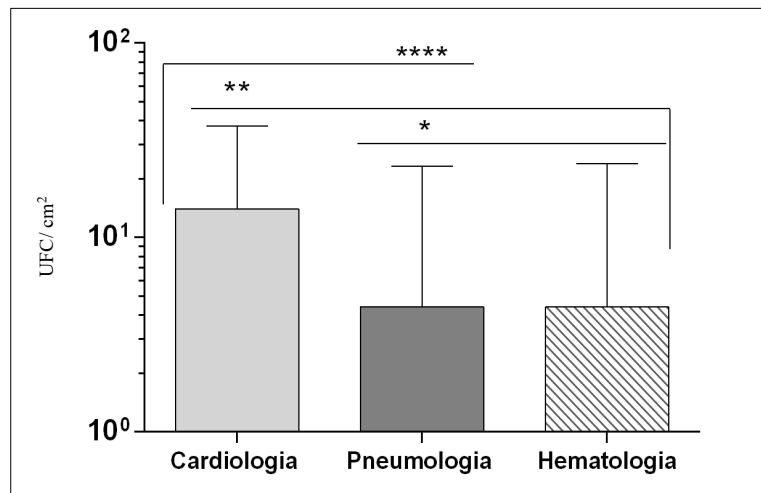
## 2.3 Resultados

### 2.3.1 Amostras obtidas e UFCs recuperadas

Durante o período da amostragem, foram processadas 264 amostras, dentre as quais 116 apresentaram presença de microrganismos. Devido à grande variedade e diferença entre os valores de UFC/ cm<sup>2</sup> por enfermaria coletada, foi feita a análise não paramétrica dos dados. A normalização dos resultados foi realizada para remover o erro resultante da variação interexperimental, possivelmente devido as diferenças inevitáveis no processamento da amostra e execuções experimentais que podem estar separadas por dias ou semanas (Ting et al., 2009).

A análise de variância unidirecional de Kruskal-Wallis para dados normalizados foi usada para comparar as UFCs/cm<sup>2</sup> dos equipamentos e superfícies não críticas por enfermaria.

A análise estatística não paramétrica mostrou que a concentração média de UFC/cm<sup>2</sup> por enfermaria foi maior na Cardiologia, seguidos pela Pneumologia e finalmente Hematologia (Figura 2.1).



**Figura 2.1** Recuperação das unidades formadoras de colónia ([UFC]/cm<sup>2</sup>) das superfícies não críticas amostradas nas áreas de **Cardiologia (C)**, **Pneumologia (P)** e **Hematologia (H)**. A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis (ANOVA não paramétrica de uma via) com teste de comparação múltipla de Dunn: \*\*\*\* P<0,0001.

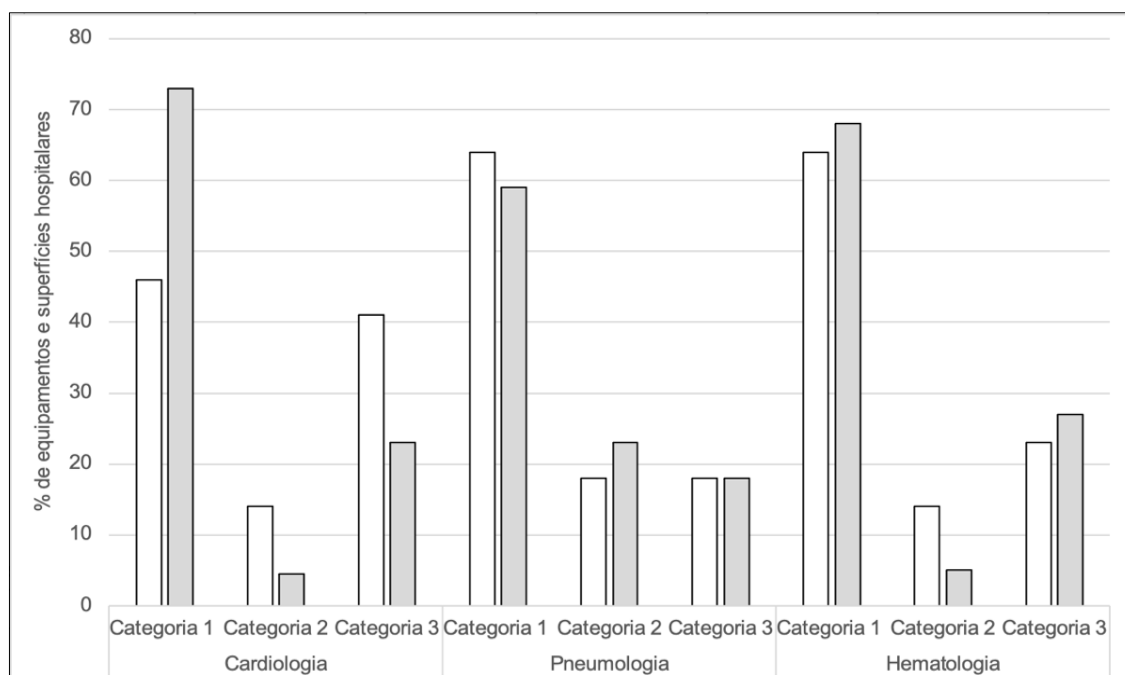
Considerando a carga microbiana, foram criadas três categorias para agrupar os equipamentos e superfícies não críticas de cada enfermaria amostrada (Figura 2.2). A categoria 1 incluiu amostras sem carga bacteriana. Das 3 enfermarias amostradas, a Pneumologia e a Hematologia foram as que apresentaram maior número de equipamentos e superfícies não críticas sem registos de UFC/cm<sup>2</sup> nos meios de cultivo utilizados. Relativamente à recuperação em meio KSA, a Cardiologia apresentou maior número de amostras sem microrganismos recuperados.

As categorias 2 e 3 foram estabelecidas com base nos indicadores microbiológicos de controlo de qualidade ambiental para superfícies não críticas e, expressos em UFC/cm<sup>2</sup>, (Dancer, 2004; Dolan et al., 2011), adaptado de Dancer (Bogusz et al., 2013; Dancer, 2004) a

partir do índice utilizado na indústria de alimentos. A categoria 2 incluiu as amostras com valores de UFC/cm<sup>2</sup> entre 0 e 5 e, 23% dos equipamentos e superfícies não críticas da Pneumologia (meio KSA) obtiveram essa classificação, seguidos da Cardiologia e Hematologia, ambos com 14% (meio PIA).

A categoria 3 incluiu as amostras com carga bacteriana maior do que 5 UFC/cm<sup>2</sup> e, a enfermaria da Cardiologia obteve 41% (meio PIA) das suas amostras nesta categoria, enquanto a Hematologia registou 27% e a Pneumologia 18% (ambos para o meio KSA).

Dentre os meios de cultivo utilizados, o PIA recuperou maior número de microrganismos. O número de amostras que apresentou valores nesta categoria foi 55% na Cardiologia, 36% na Pneumologia e 36% na Hematologia. O meio KSA registou contagens de cultiváveis em 41% na enfermaria da Pneumologia, seguidos por 32% na Hematologia e 27,5% na Cardiologia.

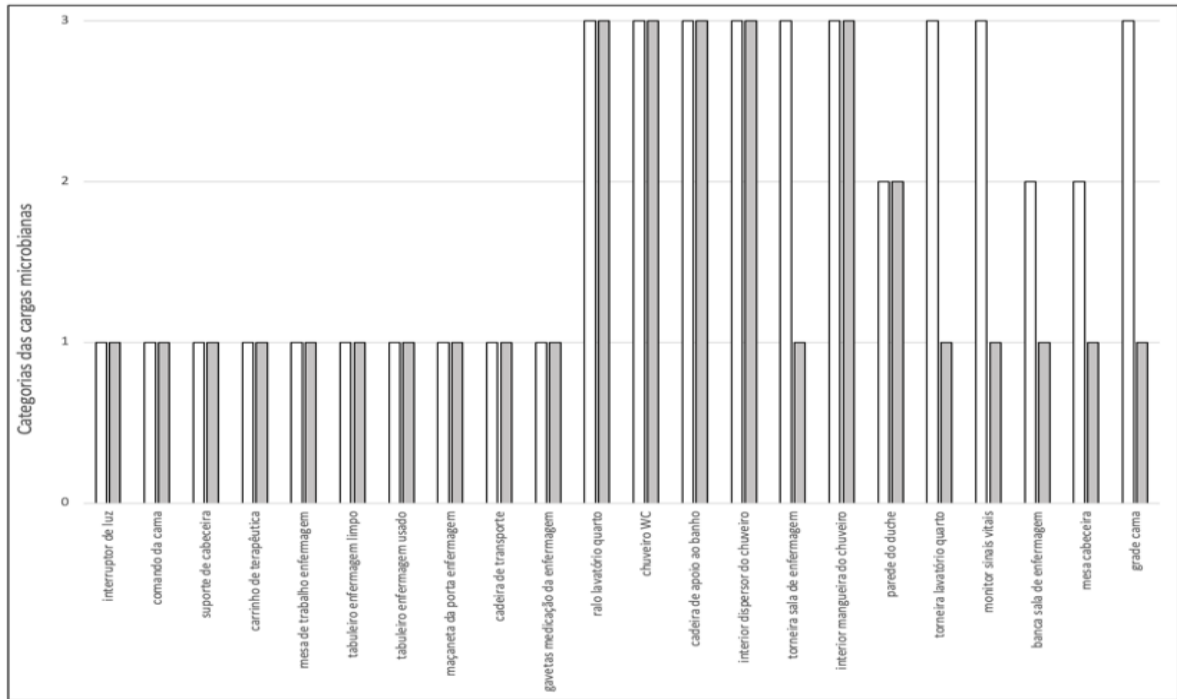


**Figura 2.2 Níveis de carga microbiana por unidades formadoras de colônia (UFC/cm<sup>2</sup>) nas enfermarias amostradas durante 4 meses.** Percentual de superfícies amostradas de cada enfermaria por três categorias de carga bacteriana. As categorias representam diferentes níveis de carga bacteriana para os meios seletivos PIA (branco) e KSA (cinza). A categoria 1 incluiu amostras sem UFC, a categoria 2 conteve amostras com contagens de UFC/cm<sup>2</sup> entre 0 e 5; e a categoria 3 compreendeu contagens de amostras maiores que 5 UFC/cm<sup>2</sup>.

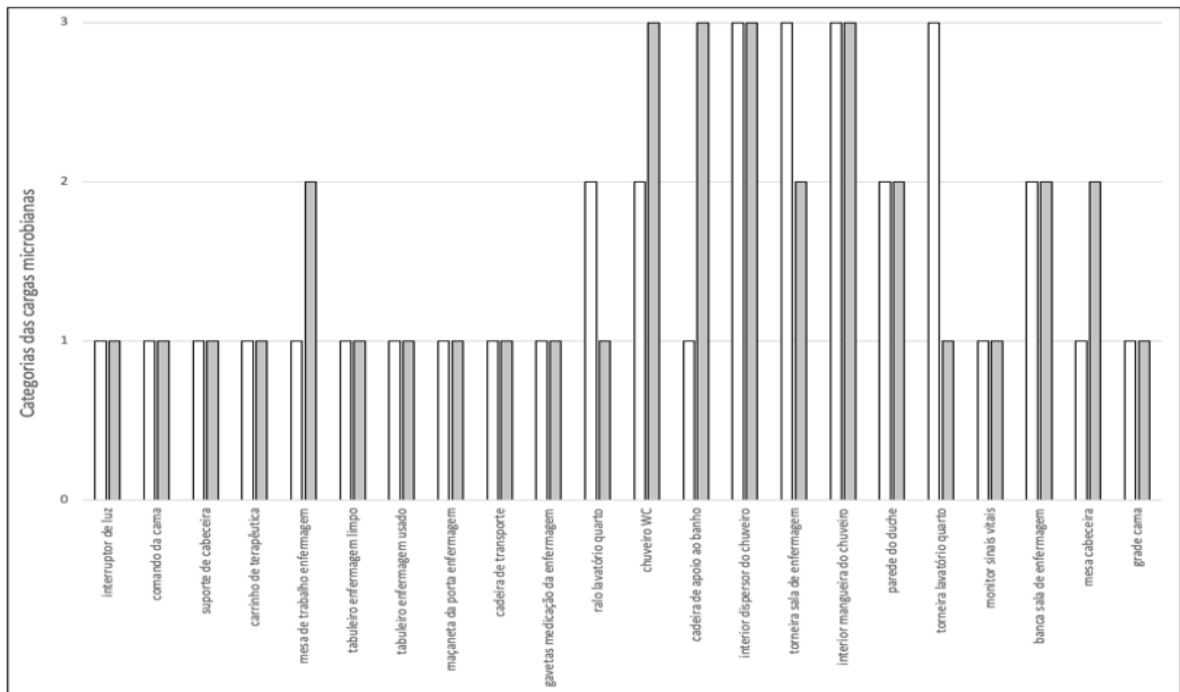
No propósito de evidenciar quais os equipamentos e superfícies não críticas tiveram contagens de UFCs/cm<sup>2</sup>, a classificação por categorias foi também aplicada a cada um deles por enfermaria e por meio seletivo (Fig. 2.3). Em relação ao uso do meio seletivo, houve situações do equipamento ter sido classificado na categoria 1 para o meio PIA e na categoria 2 para o meio KSA. Assumiu-se a de maior contagem de UFCs para a classificação final do equipamento na categoria 2 de acordo com o objetivo do trabalho. A Pneumologia foi a enfermaria com o maior número destas ocorrências.

Ao considerar a contagem total de 66 equipamentos e superfícies não críticas das 3 enfermarias, os resultados revelaram contagens na categoria 2 em 15,2% das amostras. Pertencem a este grupo, as amostras da parede do duche, da bancada da sala de enfermagem e da mesa de cabeceira (C, P), da mesa de trabalho da enfermagem e do ralo do lavatório do quarto (P), do tabuleiro da enfermagem usado e da cadeira de apoio ao banho (H).

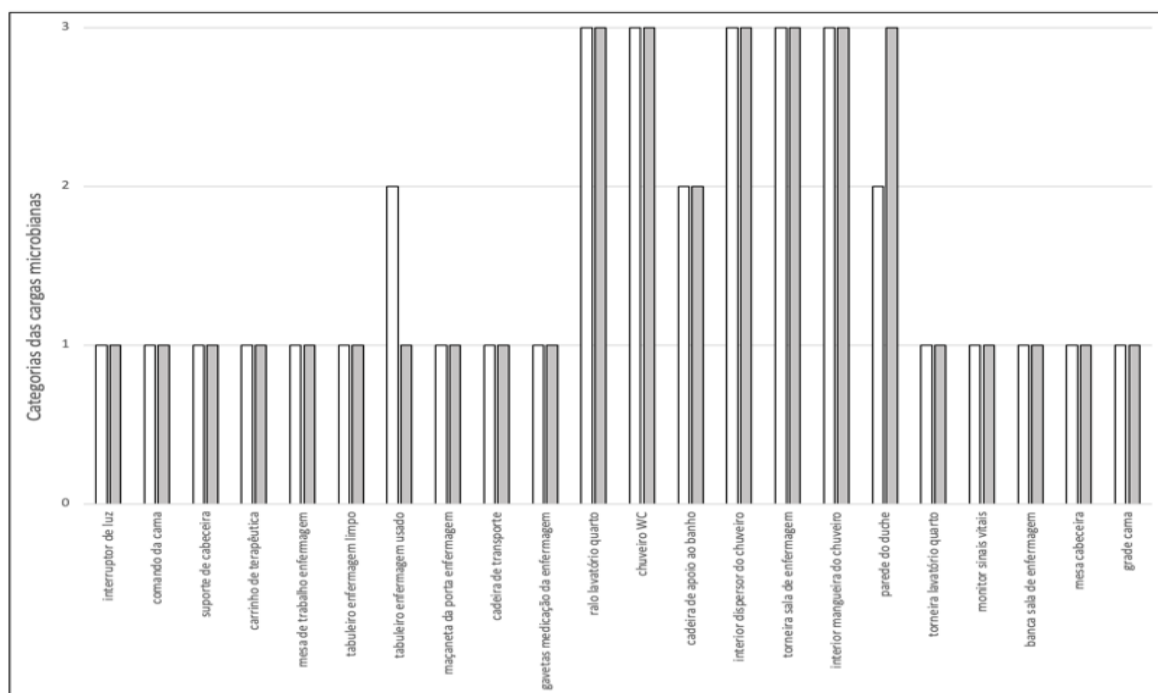
A categoria 3 inclui amostras do chuveiro da casa de banho, da parte interna do dispersor do chuveiro, da torneira da sala de enfermagem e da parte interna da mangueira do chuveiro (C, P, H), da cadeira de apoio ao banho e da torneira do lavatório do quarto (C, P), do ralo do lavatório do quarto (C, H), do monitor de sinais vitais e da grade da cama (C) e da parede do duche (H). Os equipamentos e superfícies não críticas tiveram mais amostras classificadas na categoria 3, quando comparados com a categoria 2, em torno de 32%, e inclui predominante equipamentos e superfícies que estão ou têm áreas húmidas.



(a)



(b)

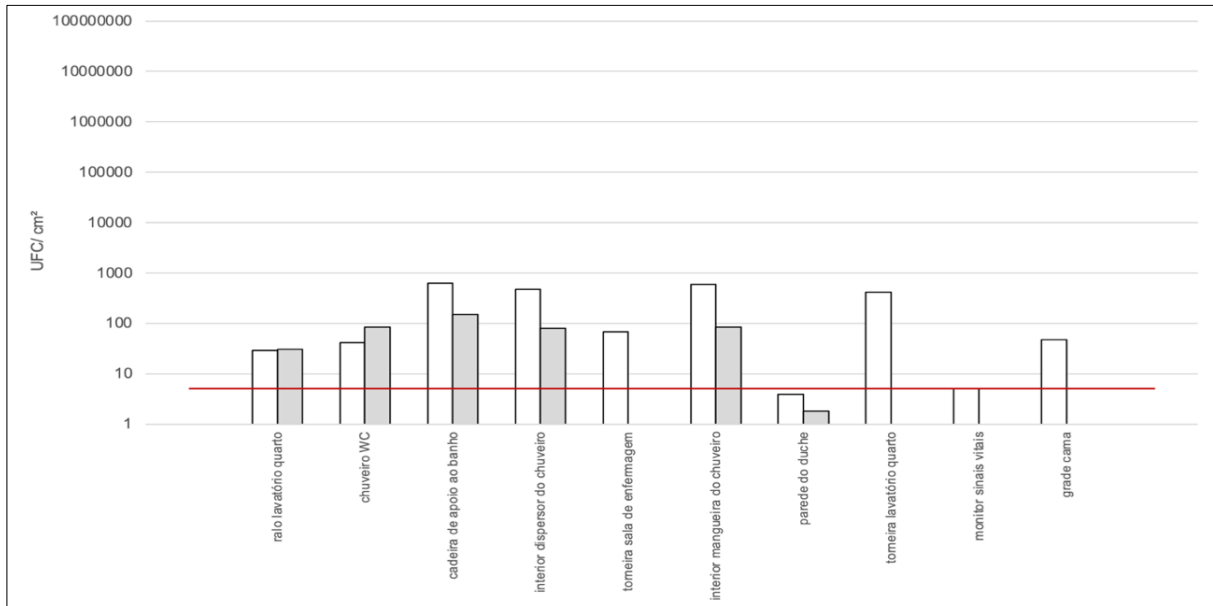


(c)

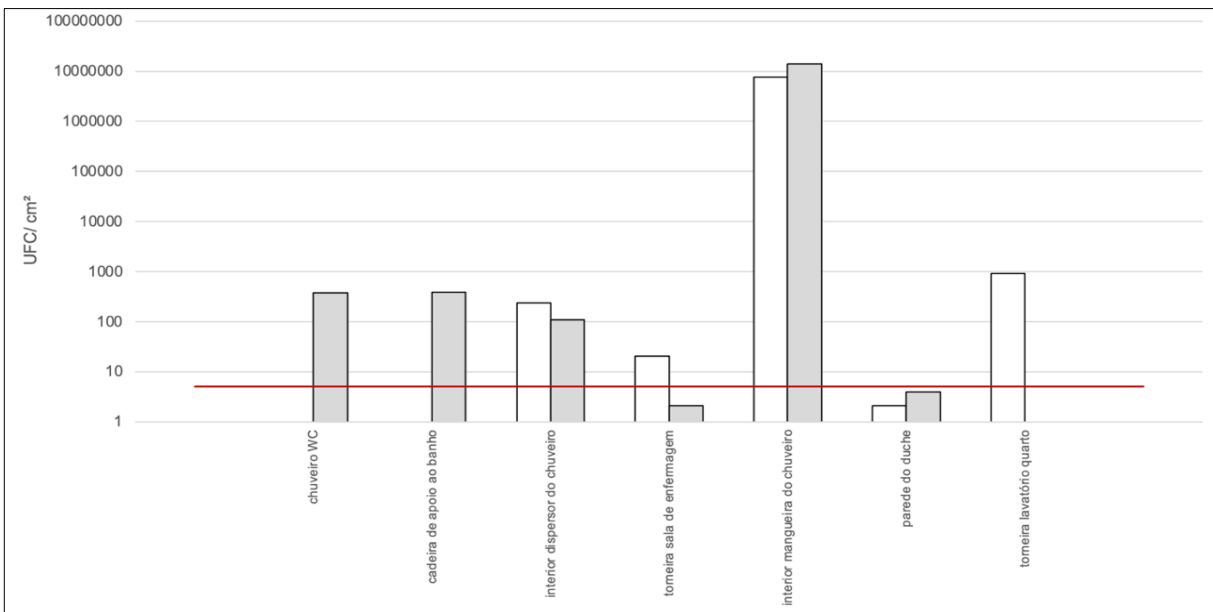
**Figura 2.3** Categorias de cargas bacterianas definidas com base nas unidades formadoras de colónias (UFC/cm<sup>2</sup>) nos equipamentos e superfícies hospitalares amostradas nas enfermarias da Cardiologia (a), Pneumologia (b) e Hematologia (c), em meios seletivos PIA (branco) e KSA (cinza). A categoria 1 inclui equipamentos e superfícies sem UFCs; a categoria 2 contém contagens de UFC/cm<sup>2</sup> entre 0 e 5; e a categoria 3 compreende contagens superiores a 5 UFC/cm<sup>2</sup>.

### 2.3.2 Carga microbiana recuperada dos equipamentos e superfícies não críticas

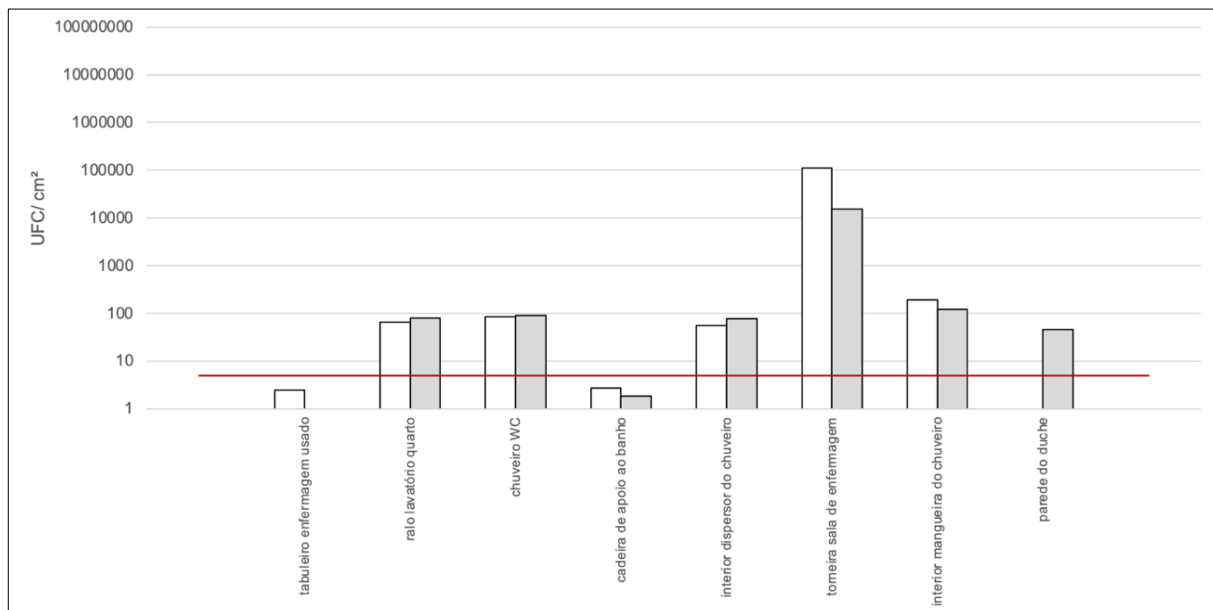
A Figura 2.4 mostra as contagens em UFC/cm<sup>2</sup> de equipamentos e superfícies não críticas de cada enfermaria classificados nas categorias 2 e 3. A linha vermelha nos gráficos indica o valor de 5 UFC/cm<sup>2</sup>. Este valor foi adotado pela indústria alimentar como um indicador no controlo de qualidade microbiológica das superfícies, a fim de evitar que estas venham a constituir pontos de infeção quando os alimentos são manipulados (Dancer, 2004; Dolan et al., 2011).



(a)



(b)



(c)

**Figura 2.4 Contagens bacterianas médias (UFC/cm<sup>2</sup>) dos equipamentos e superfícies não críticas das enfermarias da Cardiologia (a), Pneumologia (b) e Hematologia (c) em meios seletivos PIA (branco) e KSA (cinza).** O limite de 5 UFC/cm<sup>2</sup> corresponde ao índice proposto por Dancer (Dancer, 2004) e as contagens que o ultrapassa sugerem a possibilidade do risco de infecção (Dancer, 2004; Dolan et al., 2011). \*\* P<0,05; ANOVA uma-va, seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey.

Os resultados obtidos na Figura 2.4 revelaram, segundo o índice de Dancer (Dancer, 2004), que a Cardiologia foi a enfermaria que apresentou maior número de equipamentos e superfícies não críticas com pontos de dispersão microbiana.

Com base no índice de 5 UFC/cm<sup>2</sup> como referência (Dancer, 2004), os equipamentos e superfícies não críticas que excederam o limite proposto e apresentaram em ordem decrescente as maiores contagens da Cardiologia foram: a cadeira de apoio ao banho (127 vezes acima do índice), a parte interna da mangueira do chuveiro (120 vezes) e a parte interna do dispersor do chuveiro (94 vezes). Relativamente à Pneumologia, a ordem foi: a parte interna da mangueira do chuveiro (2.800.000 vezes), a torneira do lavatório do quarto (185 vezes) e a cadeira de apoio ao banho (77 vezes). Quanto à Hematologia, os resultados



revelam: a torneira da sala de enfermagem (22.000 vezes), a parte interna da mangueira do chuveiro (37 vezes) e o chuveiro da casa de banho (18 vezes).

### 2.3.3 Isolados identificados através da sequência do gene que codifica o 16S rRNA

Os meios PIA e KSA recuperaram *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* mas também recuperam estirpes de outros 14 géneros bacterianos, como apresentado na Tabela 2.1. As estirpes bacterianas presentes nos meios seletivos de isolamento que apresentaram morfologia colonial semelhante às colónias típicas foram avaliadas como presuntivas, e identificadas por sequenciação do gene 16S rRNA (Figura S1). A Tabela 2.1 mostra as espécies identificadas e sua ocorrência em termos quantitativos (UFC/cm<sup>2</sup>) por enfermaria.

Estes isolados podem ser divididos em bactérias indicadoras de infeção (Dancer, 2004; Dolan et al., 2011) e organismos patógenos de importância clínica (Aujoulat et al., 2015; Brooke, 2012; Guentzel, 1996; Ranc et al., 2018; Ryan & Adley, 2010; Visca et al., 2011). As três enfermarias apresentaram bactérias indicadoras de infeção, tendo a Cardiologia apresentado a maior diversidade, através da identificação de *P. aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter* sp. e *K. pneumoniae*.

Estirpes de *P. aeruginosa* foram também encontradas em amostras na Hematologia e, em maior número, na Pneumologia. A Hematologia registou também a presença de estirpes pertencentes à espécie *K. pneumoniae*.

Também foram detetadas outras estirpes de importância clínica, nomeadamente estirpes das espécies *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas* sp., *Rhizobium pusense*, *Delftia tsuruhatensis*, *Acinetobacter junii*, *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas putida*. Na Hematologia foi onde se detetou uma maior diversidade de espécies, com um total de 5, enquanto na Cardiologia e a Pneumologia detetaram-se 4 e 3 espécies diferentes, respetivamente (Tabela 2.1).

**Tabela 2.1 Distribuição e identificação dos isolados amostrados nas 3 enfermarias.**

	Cardiologia	Pneumologia	Hematologia	Isolados
<i>Pseudomonas</i> Isolation Agar	4,82			<i>Acinetobacter parvus</i>
	3,61			<i>Cytophaga sp.</i>
		3,41 x 10 <sup>1</sup>	2,41	<i>Delftia sp.</i>
		3,33		<i>Delftia tsuruhatensis*</i>
			2,93 x 10 <sup>5</sup>	<i>Flavobacterium lindanitolerans</i>
	8,43		3,73 x 10 <sup>1</sup>	<i>Pseudomonas sp.*</i>
	2,09 x 10 <sup>3</sup>	1,53 x 10 <sup>7</sup>	8,84 x 10 <sup>2</sup>	<i>Pseudomonas aeruginosa**</i>
	2,41			<i>Pseudomonas citronellolis</i>
			8,43 x 10 <sup>1</sup>	<i>Pseudomonas fluorescens*</i>
	9,64			<i>Pseudomonas multiresinivorans</i>
	9,24			<i>Pseudomonas nitroreducens</i>
			8,43 x 10 <sup>1</sup>	<i>Pseudomonas parafulva</i>
			2,41	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>
			8,98 x 10 <sup>1</sup>	<i>Pseudomonas putida*</i>
	8,43		1,49 x 10 <sup>5</sup>	<i>Rhizobium pusense*</i>
	9,24			<i>Serratia marcescens**</i>
	2,61 x 10 <sup>2</sup>			<i>Sphingobium sp.</i>
	5,62 x 10 <sup>2</sup>			<i>Sphingomonas paucimobilis*</i>
	5,62 x 10 <sup>2</sup>			<i>Sphingomonas pseudosanguinis</i>
			1,12 x 10 <sup>1</sup>	<i>Sphingobacterium sp.</i>
		8,43	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	
		8,43	<i>Sphingobacterium siyangense</i>	
4,53 x 10 <sup>1</sup>	1,51 x 10 <sup>7</sup>	9,24 x 10 <sup>1</sup>	<i>Stenotrophomonas maltophilia*</i>	
		3,73 x 10 <sup>1</sup>	<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	
<i>Klebsiella</i> Selective Agar		8,84 x 10 <sup>1</sup>		<i>Acinetobacter junii*</i>
	2,20 x 10 <sup>2</sup>			<i>Agrobacterium sp.</i>
			1,00 x 10 <sup>2</sup>	<i>Cupriavidus metallidurans</i>
	1,89			<i>Enterobacter sp.**</i>
			2,01 x 10 <sup>4</sup>	<i>Enterobacter ludwigii</i>
	3,84 x 10 <sup>2</sup>			<i>Herbaspirillum aquaticum</i>
			8,03 x 10 <sup>4</sup>	<i>Herbaspirillum huttiense</i>
	6,92 x 10 <sup>1</sup>		1,20	<i>Klebsiella pneumoniae**</i>
	2,39 x 10 <sup>2</sup>	2,81 x 10 <sup>7</sup>		<i>Pseudomonas aeruginosa**</i>
		5,22 x 10 <sup>2</sup>		<i>Pseudomonas veronii</i>
6,60 x 10 <sup>2</sup>		3,05 x 10 <sup>2</sup>	<i>Rhizobium pusense*</i>	
	2,81 x 10 <sup>7</sup>		<i>Stenotrophomonas maltophilia*</i>	
1,32 x 10 <sup>2</sup>			<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	

\* patógenos de importância clínica (Aujoulat et al., 2015; Brooke, 2012; Guentzel, 1996; Ranc et al., 2018; Ryan & Adley, 2010; Visca et al., 2011)

\*\* microrganismos indicadores de infecção (Dancer, 2004; Dolan et al., 2011)

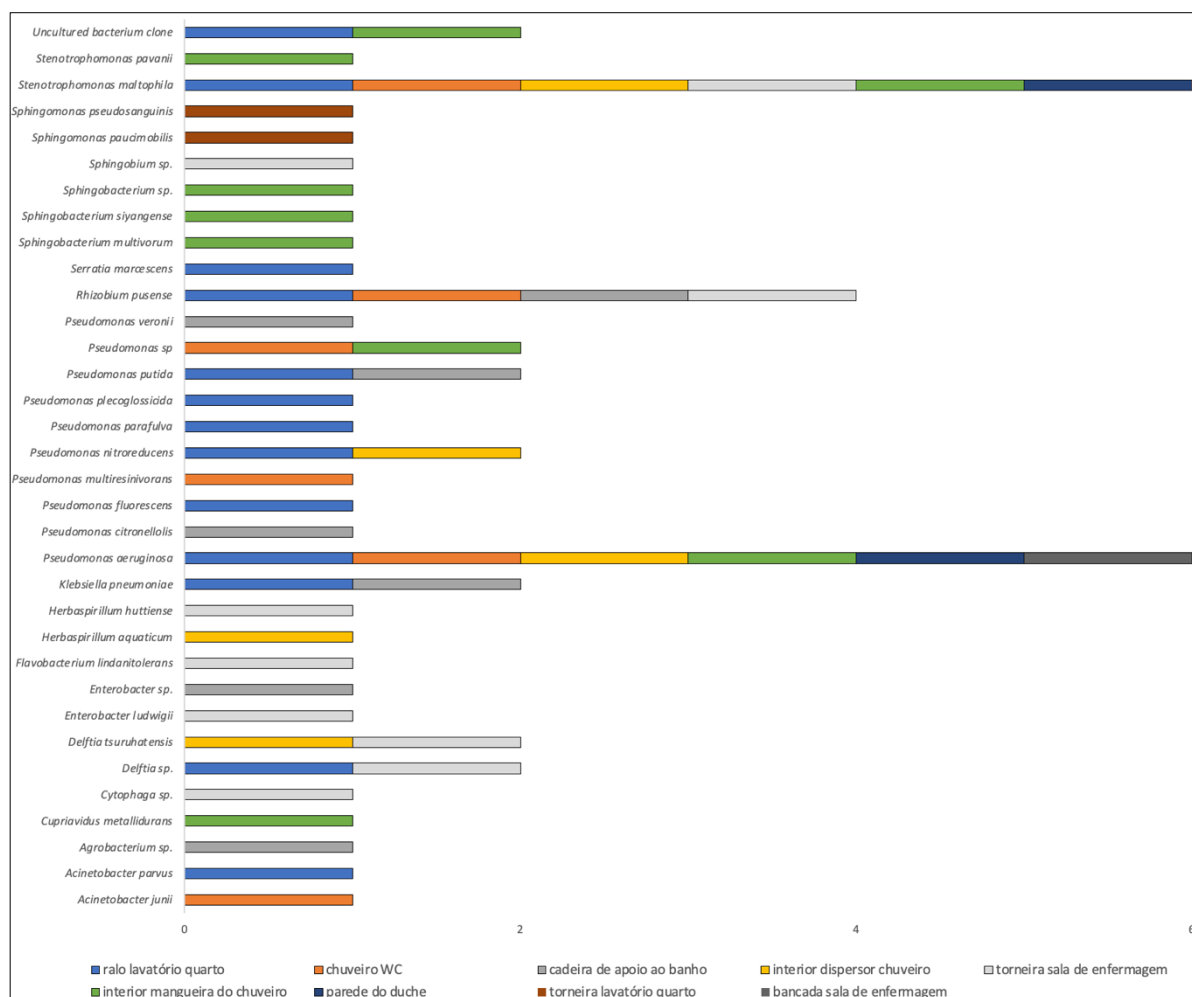
A análise das sequências de 16S rRNA (Figura S1) permitiram identificar os locais de ocorrência de *P. aeruginosa*, que foram no biofilme da parte interior da mangueira do chuveiro e da parte interior do dispersor do chuveiro nas três enfermarias amostradas. Estes dois equipamentos não críticos também aparecem na Figura 2.4 e apresentaram UFC/cm<sup>2</sup> acima do aceitável, considerando o índice quantitativo de Dancer (Dancer, 2004). Isolados de *P. aeruginosa* foram também identificados no ralo do lavatório do quarto na Cardiologia, na parede do duche, no chuveiro da casa de banho e na bancada da sala de enfermagem na Pneumologia.

Estirpes de *K. pneumoniae* e *Serratia marcescens*, indicadoras de infecção (Dancer, 2004; Dolan et al., 2011), foram igualmente recuperadas do ralo do lavatório do quarto na Cardiologia. A cadeira de apoio ao banho das enfermarias da Cardiologia e Hematologia também apresentaram estirpes de *Enterobacter* sp. e *K. pneumoniae*, respetivamente.

A aplicação do índice qualitativo de Dancer apontou para pontos de dispersão microbiana no ralo do lavatório do quarto, no chuveiro da casa de banho, na cadeira de apoio ao banho, na parte interna do dispersor do chuveiro, na parte interna da mangueira do chuveiro, na parede do duche e na bancada da sala de enfermagem (Dancer, 2004; Dolan et al., 2011). Estes equipamentos e superfícies não críticas foram também indicados como potenciais fontes de dispersão microbiana quando aplicado o índice quantitativo, exceto no caso da bancada da sala de enfermagem, o que reforça a importância de uso dos dois índices. A Figura 2.5 mostra as espécies identificadas e sua ocorrência nos equipamentos e superfícies não críticas.

*Stenotrophomonas maltophilia*, *P. aeruginosa* e *Rhizobium pusense* foram as estirpes bacterianas recuperadas em maior número das amostras nos equipamentos e superfícies do hospital. As torneiras da sala de enfermagem e do lavatório do quarto apresentaram patógenos de importância clínica (Aujoulat et al., 2015; Brooke, 2012; Guentzel, 1996; Ranc et al., 2018; Ryan & Adley, 2010; Visca et al., 2011) e foram também identificadas como

pontos de dispersão microbiana pelo índice quantitativo. *Stenotrophomonas maltophilia* foi identificada nesses dois equipamentos não críticas, *Sphingomonas paucimobilis* na torneira do lavatório do quarto e, *Delftia tsuruhatensis* e *Rhizobium pusense* na torneira da sala de enfermagem.



**Figura 2.5** Espécies bacterianas recuperadas dos equipamentos e superfícies hospitalares.

### 2.3.4 Perspetiva temporal da aplicação do índice quantitativo de Dancer

O presente trabalho aplicou o índice quantitativo de Dancer (Dancer, 2004) aos resultados da avaliação da contaminação microbiana dos equipamentos e superfícies não críticas amostradas no mesmo hospital em 2013 (Geadas Farias et al., 2017). Os itens não críticas que

apresentaram contagens iguais e superiores a 5 UFC/cm<sup>2</sup> para os dois períodos foram o ralo dos lavatórios do quarto, os chuveiros da casa de banho e as torneiras da sala de enfermagem na Hematologia. A Tabela 2.2 apresenta a comparação qualitativa desses resultados com o presente estudo.

**Tabela 2.2 Equipamentos e superfícies hospitalares não críticas que atingiram contagens iguais e superiores a 5UFC/cm<sup>2</sup>.** As amostragens foram realizadas em 2013 e 2020 na enfermaria da Hematologia.

	2013 categoria igual ou superior a 5 UFC/cm <sup>2</sup>	2020 categoria igual ou superior a 5 UFC/cm <sup>2</sup>
Torneira do lavatório quarto	+	-
Ralo do lavatório do quarto	+	+
Chuveiro da casa de banho	+	+
Mesa de cabeceira	-	-
Bancada da sala de enfermagem	-	-
Torneira sala de enfermagem	+	+
Tabuleiro da enfermagem usado	-	-
Tabuleiro da enfermagem limpo	-	-
Maçaneta da sala de enfermagem	-	-
Interruptor de luz	-	-
Grade da cama	-	-

## 2.4 Discussão

Existe um consenso quanto à necessidade da monitorização microbiológica para avaliação de superfícies hospitalares (Bogusz et al., 2013; Claro et al., 2015; Dancer, 2004; Dolan et al., 2011; Moore & Griffith, 2007; Rawlinson et al., 2019). A avaliação da presença microbiana é considerada dispendiosa, longa e injustificada pela ausência de uma norma aceite e comprovada que estabeleça a relação entre a contaminação ambiental e o risco de infeção

(Bogusz et al., 2013; Claro et al., 2015; Dancer, 2004; Dolan et al., 2011; Moore & Griffith, 2007; Rawlinson et al., 2019; Schulster et al., 2004).

A monitorização microbiológica está indicada para quando existe um surto ou propagação de uma doença infecciosa, ou quando uma situação ambiental potencialmente perigosa está a ser monitorizada ou utilizada para investigação (Schulster et al., 2004).

A contagem do número de colónias de microrganismos aeróbios totais através de amostragem da superfície mede a carga microbiológica de uma área e tem sido utilizada para a avaliação de superfícies hospitalares. Esta estratégia é atualmente aplicada no controlo de qualidade das superfícies utilizadas na preparação de alimentos (Bogusz et al., 2013; Claro et al., 2015; Dancer, 2004; Dolan et al., 2011; Moore & Griffith, 2007; Rawlinson et al., 2019).

O valor de 5,0 UFC/cm<sup>2</sup> foi adotado como valor máximo admissível na avaliação da eficiência de limpeza e controlo do risco de contaminação (Bogusz et al., 2013; Dancer, 2004; Dolan et al., 2011). No caso das superfícies hospitalares, existem estudos que sugerem valores abaixo de 2,5 UFC/cm<sup>2</sup> para avaliar a eficiência do processo de limpeza das superfícies (Claro et al., 2015; Moore & Griffith, 2007). Como as amostras foram colhidas antes do momento de limpeza que decorria neste hospital ao fim da manhã, utilizou-se como referência para a categorização das amostras quanto à carga microbiana, o valor de 5,0 UFC/cm<sup>2</sup>.

O presente trabalho não teve por objetivo avaliar a eficácia da limpeza de equipamentos e superfícies hospitalares. No entanto, o cálculo do índice de Dancer (Dancer, 2004) revela a necessidade de discutir quais os valores aceitáveis de carga microbiana em superfícies na avaliação do risco de contaminação em ambiente hospitalar.

Considerando o limite sugerido pelo índice de Dancer de 5,0 UFC/cm<sup>2</sup>, 41% dos equipamentos e superfícies hospitalares não críticas apresentaram valores superiores de carga microbiana na Cardiologia, seguidos por 27% na Pneumologia e na Hematologia.

A organização das superfícies analisadas em categorias proporcionou uma visão geral ao distinguir a ausência ou a presença dos reservatórios microbianos nos equipamentos e superfícies hospitalares não críticas, mostrando que as três enfermarias estudadas apresentaram pontos de dispersão microbiana.

A utilização de um índice de controle de qualidade com base em 5,0 UFC/cm<sup>2</sup> nos equipamentos e superfícies hospitalares não críticas complementou a análise feita em categorias, ao fornecer um limite quantitativo para as quantidades de carga microbiana existentes e identificar os potenciais reservatórios de dispersão. Os locais mais fortemente colonizados foram, as cadeiras de apoio ao banho, a parte interna das mangueiras dos chuveiros e a parte interna dos dispersores do chuveiro na Cardiologia; a parte interna das mangueiras dos chuveiros, as torneiras do lavatório do quarto e as cadeiras de apoio ao banho na Pneumologia; as torneiras da sala de enfermagem, a parte interna das mangueiras dos chuveiros e os chuveiros da casa de banho na Hematologia. Os resultados destes equipamentos e superfícies não críticas identificaram o elevado nível de carga microbiana que não têm o seu ciclo interrompido pelos métodos de limpeza e desinfecção adotados pelo hospital. Existem estudos que relatam a deficiência no processo de limpeza e desinfecção dos quartos hospitalares (Caselli et al., 2016; Otter et al., 2011; Rutala & Weber, 2021) e equipamentos médicos portáteis (Rutala & Weber, 2021), contribuindo para a manutenção de patógenos nosocomiais (Caselli et al., 2016; Gebel et al., 2013; Otter et al., 2011; Rutala & Weber, 2021).

Os dados apresentados não permitem confirmar um único ponto como origem da dispersão, especialmente quando se comparam as ocorrências de UFCs dos equipamentos e superfícies não críticas de cada enfermaria entre si. O que se pode registrar é a facilidade de os microrganismos criarem reservatórios em equipamentos das zonas húmidas, condição que

normalmente favorece o seu trajeto de dispersão (Gajdács et al., 2021; Geadas Farias et al., 2017; Mena & Gerba, 2009; Ong et al., 2020; Suleyman et al., 2018; Taudien et al., 2023).

Os meios de cultura seletivos para a recuperação de *P. aeruginosa* - *Pseudomonas* Isolation Agar (PIA) e de *K. pneumoniae* – *Klebsiella* Selective Agar (KSA) - permitiram também recuperar estirpes de outras espécies bacterianas, indicadoras de infecção ou clinicamente importantes. Outros estudos que utilizaram meios seletivos específicos conseguiram recuperar diferentes géneros bacterianos (de Abreu et al., 2014; Geadas Farias et al., 2017) e consideram que os organismos obtidos são resistentes ao biocida presente nos meios de cultivo utilizados (de Abreu et al., 2014; Geadas Farias et al., 2017). O biocida presente no meio PIA é o Irgassan, normalmente exteriorizado pelas estirpes *P. aeruginosa* através de sistemas de efluxo (de Abreu et al., 2014). A carbenicilina usada no meio KSA é um agente antimicrobiano, para o qual as estirpes de *K. pneumoniae* possuem resistência intrínseca devido à produção da enzima betalactamase (Brisse et al., 2006; Paterson et al., 2014).

Os 16 géneros identificados dos isolados nos meios seletivos utilizados foram de bactérias Gram-negativas, sendo 9 considerados bactérias patogénicas. Estes organismos patogénicos Gram negativos podem apresentar multirresistência devido a vários mecanismos tais como, bombas de efluxo a múltiplas drogas, plasmídeos que contêm genes de resistência antimicrobiana e mecanismos de transferência desses genes de resistência (Brooke, 2012).

A presença de *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens* e *Enterobacter* sp. é uma indicação para avaliação do risco de infecção para utentes e funcionários em ambiente hospitalar (Dancer, 2004; Robakowska et al., 2021) enquanto a ocorrência de *S. maltophilia*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *R. pusense*, *S. paucimobilis*, *A. junii* e *D. tsuruhatensis* corresponde à presença de patógenos de importância clínica (Aujoulat et al., 2015; Brooke, 2012; Guentzel, 1996; Ranc et al., 2018; Ryan & Adley, 2010; Visca et al., 2011).



No índice que foi considerado, existe um valor mínimo para a presença de organismos patogênicos que causam infecção hospitalar (Dancer, 2004; Robakowska et al., 2021). A presença de 1 UFC/cm<sup>2</sup> indica a necessidade de serem revistas as práticas de higiene e desinfecção. O processo de limpeza e desinfecção adequado reduz os reservatórios de patógenos (Claro et al., 2015; Dancer, 2004; Dolan et al., 2011) e deve ser submetido a uma avaliação científica a incluir a inspeção visual das áreas clínicas e a análise microbiológica para presença de organismos indicadores e as contagens totais de colônias aeróbias (Dancer, 2009; Dolan et al., 2011; Jabłońska-Trypuć et al., 2022).

A presença de um organismo indicador de infecção em equipamentos e superfícies hospitalares possibilita riscos de sua disseminação em utentes hospitalizados e imunocomprometidos (Aujoulat et al., 2015; Brooke, 2012; Dancer, 2004; Dolan et al., 2011; Guentzel, 1996; Ranc et al., 2018; Ryan & Adley, 2010; Visca et al., 2011), uma vez que são patógenos oportunistas que podem apresentar perfil de multirresistência (Dancer, 2004; Dolan et al., 2011; Guentzel, 1996). A disseminação dessas bactérias em ambiente hospitalar ocorre entre pacientes que são manipulados pela equipa hospitalar, através do contato direto dos pacientes com reservatórios contaminados e pela ingestão de alimentos contaminados (Aujoulat et al., 2015; Brooke, 2012; Dancer, 2004; Dolan et al., 2011; Guentzel, 1996; Ranc et al., 2018; Ryan & Adley, 2010; Visca et al., 2011).

*P. aeruginosa* é uma bactéria Gram-negativa de vida livre encontrada em ambientes húmidos (de Abreu et al., 2014), descrita como exemplo de microrganismo multirresistente que causa infecções nosocomiais, a exemplo de infecções respiratórias em pacientes com fibrose cística (FC) ou com doenças pulmonares crónicas (Brooke, 2012). Apesar de ter ocorrido nas três enfermarias, suas maiores concentrações foram registadas na enfermaria da Pneumologia; constatação que vem a reforçar à necessidade de medidas de monitorização periódica desses espaços.

A capacidade de *P. aeruginosa* formar biofilme também explica sua ocorrência na parte interna da mangueira do chuveiro e na parte interna do dispersor do chuveiro das três enfermarias. Os patógenos que habitam naturalmente a água e crescem nesses sistemas hídricos fez com fossem denominados por alguns autores, de patógenos de canalização de premissas oportunistas (OPPPs) e estão associados a biofilme e amebas de vida livre que os protegem de biocidas e desinfetantes no sistema de água (Suleyman et al., 2018).

Os géneros *Klebsiella*, *Serratia* e *Enterobacter* são bastonetes Gram-negativos que vivem na água, no solo, ocasionalmente nos alimentos (Guentzel, 1996), e podem ser encontrados no microbioma intestinal (de Abreu et al., 2014). A ocorrência das espécies deste género em equipamentos e superfícies de zonas húmidas confirma a preferência por um ambiente com maior humidade relativa e menor temperatura (Jabłońska-Trypuć et al., 2022). Enquanto patógenos nosocomiais, estes organismos são causadores frequentes de bacteremia em alguns centros cirúrgicos, infeções respiratórias, do trato urinário e da corrente sanguínea (Guentzel, 1996).

Ao comparar os equipamentos e superfícies não críticas do mesmo hospital e em períodos diferentes pode-se constatar um padrão de repetição de colonização dos equipamentos em contato com as zonas húmidas, exceto pela torneira do lavatório do quarto em 2013.

O tempo de persistência do patógeno em uma superfície hospitalar inanimada é proporcional ao tempo que ele tem como fonte de transmissão (Kramer et al., 2006; Wißmann et al., 2021).

Muitas espécies Gram-negativas, nomeadamente *Acinetobacter* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *P. aeruginosa*, *S. marcescens* ou *Shigella* spp. podem sobreviver em superfícies inanimadas até mesmo por meses (Kramer et al., 2006). Condições húmidas melhoram a persistência para a maioria das bactérias como é o caso de *P. aeruginosa*. Alguns estudos sugerem que a maior concentração de bactéria numa superfície pode estar associada a um período de persistência mais longo (Kramer et al., 2006).

## 2.5 Conclusões

Em conclusão podemos dizer que neste hospital, os equipamentos e superfícies hospitalares não críticas são reservatórios de bactérias pertencentes ao grupo ESKAPE.

Este facto faz com que os equipamentos e as superfícies não críticas possam constituir potenciais reservatórios de infeção associados aos cuidados de saúde.

Neste estudo, os chuveiros da casa de banho, a parte interna dos dispersores dos chuveiros e a parte interna das mangueiras dos chuveiros, e também as torneiras da sala de enfermagem foram os equipamentos não críticos com maior potencial de dispersão microbiana nas três enfermarias amostradas com os meios seletivos utilizados.

A Cardiologia foi a enfermaria com maior diversidade de bactérias indicadoras de infeção. Por seu lado, a Pneumologia mostrou valores significativos de UFC/cm<sup>2</sup> de *P. aeruginosa*, uma espécie bacteriana potencialmente envolvida em infeções hospitalares, incluindo infeções respiratórias.

As áreas hospitalares sujeitas à humidade favorecem a colonização dos equipamentos não críticos aí dispostas com microrganismos, atingindo a biomassa na superfície desses equipamentos concentrações médias iguais ou superiores a 5 UFC/cm<sup>2</sup>. Este resultado realça a necessidade da monitorização periódica destes equipamentos.

Finalmente, este trabalho fornece informação para estabelecer uma ligação entre a concentração e as espécies bacterianas presentes nas superfícies, e o potencial risco que representam os equipamentos e superfícies hospitalares não críticas, nas infeções associadas aos cuidados de saúde.



**Capítulo III: Avaliação da resistência antimicrobiana, formação de biofilme e potencial de modificação de superfície em isolados hospitalares de *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae***



## Resumo

A natureza multifatorial da contaminação do espaço hospitalar por bactérias do grupo ESKAPE, nomeadamente, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* contribuiu significativamente para as infeções associadas aos cuidados em saúde e, conseqüentemente no aumento de investimentos em saúde. Este trabalho teve como objetivo a avaliação da capacidade de resistência a agentes antimicrobianos, a produção de biofilme e o potencial para degradação de material polimérico de uso hospitalar, de 33 estirpes de *P. aeruginosa* e de 2 *K. pneumoniae*, isoladas a partir de equipamentos e superfícies não críticas hospitalares. Testes de sensibilidade antimicrobiana realizados por difusão em disco mostraram que nenhum dos isolados foi classificado como multirresistente (não MDR). A capacidade de produção de biofilme avaliada pela metodologia do cristal violeta revelou que 97% dos isolados foram considerados produtores de biofilme, sendo 67% das estirpes testadas de *P. aeruginosa* e 50% de *K. pneumoniae* classificadas como fortes produtoras de biofilme, respetivamente. As estirpes foram também avaliadas quanto ao seu potencial em modificar dispositivos médicos, tais como tubos de infusão de soro, cânula nasal e cateter urinário. As estirpes foram incubadas na presença desses materiais poliméricos, como fontes únicas de carbono, e o seu crescimento foi acompanhado ao longo do tempo. Duas fortes produtoras de biofilme, as estirpes *P. aeruginosa* 440Pi e 440Pa e uma moderada produtora de biofilme, a estirpe 244Pa, apresentaram os crescimentos mais significativos em presença dos materiais poliméricos, sugerindo maior potencial na degradação desses materiais. Adicionalmente, as imagens de microscopia eletrónica de varrimento revelaram que a cânula nasal e o tubo de infusão do soro apresentaram alterações morfológicas nas superfícies quando colonizados por essas estirpes.

O teste qui-quadrado utilizado para avaliar o grau de significância dos isolados bacterianos com a rede de distribuição de água potável mostrou uma relação de alta significância com as

estirpes de *P. aeruginosa*, indicando a possibilidade de *P. aeruginosa* ambiental formar biofilme nas tubagens do sistema de distribuição de água potável e consequente dispersão para o ambiente hospitalar.

### 3.1 Introdução

*Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* são bactérias do grupo ESKAPE e estão listadas como potenciais causadoras de infeções nosocomiais (Biondo, 2023; Mulani et al., 2019; Santajit & Indrawattana, 2016). Embora as estirpes de *P. aeruginosa* sejam bactérias comumente encontradas no ambiente, são também responsáveis por infeções respiratórias graves em pacientes imunocomprometidos (Biondo, 2023; Brooke, 2012; Gajdács et al., 2021; Mena & Gerba, 2009; Schulster et al., 2004; Suleyman et al., 2018; Taudien et al., 2023). Estirpes de *K. pneumoniae* são reconhecidas como causadoras de pneumonia, infeções do trato urinário e da corrente sanguínea (Biondo, 2023; Brisse et al., 2006; Guentzel, 1996; Paterson et al., 2014). Em Portugal, em 2020, 11% e 24% das estirpes de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* apresentaram um perfil de multirresistência antimicrobiana (Paiva et al., 2022).

As infeções por estes agentes microbianos resultam tanto de fontes exógenas como de endógenas. Estes microrganismos são frequentemente transferidos por contato direto ou indireto entre pacientes, profissionais de saúde, objetos contaminados, visitantes ou mesmo com o meio ambiente (Santajit & Indrawattana, 2016). Superfícies inanimadas no ambiente hospitalar estão entre os locais mais críticos no aparecimento e disseminação de infeções hospitalares (Zahornacký et al., 2022). Alguns estudos relatam a ocorrência significativa de bactérias nas grades das camas, piso, luvas e manípulos das torneiras dos quartos dos utentes (Geadas Farias et al., 2017; Lax et al., 2017). A água é também listada como um reservatório de bactérias ambientais, especialmente *P. aeruginosa* (Vaz-Moreira et al., 2014). Assim, a grande área de superfície de torneiras e tubagens é reconhecida como um excelente local para



o crescimento de microrganismos, para o desenvolvimento de biofilmes e, conseqüentemente, para abrigar potenciais patógenos como a *P. aeruginosa* (Hutchins et al., 2017).

A colonização do espaço hospitalar por estirpes de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* envolve muitos fatores. Por exemplo, a capacidade de resistir a antibióticos e produzir biofilmes pode contribuir para a persistência de ambas as espécies em superfícies não críticas do ambiente hospitalar, o que torna a ação dos biocidas ineficaz (Jones & Joshi, 2021) e permite contaminações cruzadas contínuas pelas mãos dos profissionais de saúde (Allegranzi et al., 2013).

O principal objetivo deste trabalho consistiu em avaliar 33 estirpes de *P. aeruginosa* e 2 de *K. pneumoniae*, isoladas a partir de equipamentos e superfícies não críticas de um hospital português, quanto à capacidade de resistência a agentes antimicrobianos, produção de biofilme e potencial para degradação de material polimérico de uso hospitalar. A identificação de bactérias patogênicas resistentes a antibióticos, assim como o conhecimento da capacidade dessas estirpes em persistirem em ambientes específicos é de grande utilidade na avaliação da sua potencial ameaça à saúde humana.

## 3.2 Metodologia

### 3.2.1 Estirpes selecionadas

Foram utilizados 35 isolados bacterianos, sendo 33 estirpes de *P. aeruginosa* e 2 de *K. pneumoniae* (Tabela 3.1).

**Tabela 3.1** Estirpes selecionadas usadas no presente estudo.

ESTIRPES	LOCAL DA AMOSTRAGEM	ENFERMARI A
<i>P. aeruginosa</i> 118Pa	parte interna do dispersor do chuveiro	cardiologia
<i>P. aeruginosa</i> 133Pb	parte interna do dispersor do chuveiro	pneumologia
<i>P. aeruginosa</i> 140Ka	parte interna da mangueira do chuveiro	pneumologia
<i>P. aeruginosa</i> 140Kd		
<i>P. aeruginosa</i> 140P bf		
<i>P. aeruginosa</i> 140b pol		
<i>P. aeruginosa</i> 152 pol	parte interna da mangueira do chuveiro	hematologia
<i>P. aeruginosa</i> 218P pol	parte interna da mangueira do chuveiro	cardiologia
<i>P. aeruginosa</i> 227P pol	parte interna do dispersor do chuveiro	cardiologia
<i>P. aeruginosa</i> 244Pa	parte interna do dispersor do chuveiro	pneumologia
<i>P. aeruginosa</i> 244P pol		
<i>P. aeruginosa</i> 247P pol	parte interna da mangueira do chuveiro	pneumologia
<i>P. aeruginosa</i> 266Pb pol	parte interna da mangueira do chuveiro	hematologia
<i>P. aeruginosa</i> 266Pi'		
<i>P. aeruginosa</i> 266Pa pol		
<i>P. aeruginosa</i> 266Pa'		
<i>P. aeruginosa</i> 326Pa	parede do duche	hematologia
<i>P. aeruginosa</i> 335Pa bf	parte interna do dispersor do chuveiro	pneumologia
<i>P. aeruginosa</i> 337Ka	bancada da sala de enfermagem	pneumologia
<i>P. aeruginosa</i> 349Pa bf	parte interna do dispersor do chuveiro	hematologia
<i>P. aeruginosa</i> 364Pa	parte interna da mangueira do chuveiro	hematologia
<i>P. aeruginosa</i> 364pol		
<i>P. aeruginosa</i> 410Pb	parte interna da mangueira do chuveiro	cardiologia
<i>P. aeruginosa</i> 410Pa		
<i>P. aeruginosa</i> 417P	parte interna do dispersor do chuveiro	cardiologia
<i>P. aeruginosa</i> 417Ppol		
<i>P. aeruginosa</i> 427Pa	ralo do lavatório do quarto	cardiologia
<i>P. aeruginosa</i> 440Pa	parte interna do dispersor do chuveiro	pneumologia
<i>P. aeruginosa</i> 440Pi		
<i>P. aeruginosa</i> 440P pol		
<i>P. aeruginosa</i> 443P	chuveiro da casa de banho	pneumologia
<i>P. aeruginosa</i> 454Pa	parte interna do dispersor do chuveiro	hematologia
<i>P. aeruginosa</i> 462P pol	parte interna da mangueira do chuveiro	hematologia
<i>K. pneumoniae</i> 104Ke	ralo do lavatório do quarto	cardiologia
<i>K. pneumoniae</i> 337Ka	cadeira de apoio ao banho	hematologia

Estas estirpes bacterianas foram isoladas, de acordo com a metodologia descrita em Lordelo e colaboradores (2023), de superfícies e equipamentos de um hospital do Centro de Portugal, entre novembro de 2019 e março de 2020. O mapa dos pontos de amostragem foi utilizado na análise dos resultados. Os isolados foram criopreservados a -80°C com glicerol a 15% na Coleção de Cultura de Bactérias da Universidade de Coimbra (UCCCB).

### 3.2.2 Testes de sensibilidade antimicrobiana

Seguindo o procedimento operacional padrão, testes de suscetibilidade antimicrobiana foram realizados usando o método de difusão em disco de Kirby-Bauer (CLSI, 2020; EUCAST, 2020). Resumidamente, suspensões bacterianas de cada estirpe testada foram preparadas em 5 mL de solução salina a 0,85% na escala de McFarland a 0,5 e posteriormente, 0,1 mL das suspensões foi espalhado sobre o meio Mueller-Hinton (Oxoid, Hampshire, Inglaterra). Na superfície dos meios inoculados, foram colocados discos impregnados com os agentes antimicrobianos, levofloxacina (5 µg), ciprofloxacina (5 µg), ofloxacina (5 µg), amicacina (30 µg), tobramicina (10 µg), gentamicina (10 µg), netilmicina (10 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), cefepima (30 µg), ceftazidima (10 µg), polimixina B (50 µg). Enquanto a ofloxacina foi usada exclusivamente no ensaio com *K. pneumoniae*, netilmicina e polimixina B foram usadas nos ensaios de estirpes de *P. aeruginosa* (EUCAST, 2020; Gajdács et al., 2021). As placas de Petri foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, as áreas de inibição bacteriana foram medidas e os resultados interpretados de acordo com o Comitê Europeu de Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana (EUCAST, 2020) e Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI, 2020). As estirpes *P. aeruginosa* DSM 1117 e *E. coli* ATCC 25922 foram utilizadas como as estirpes de referência para *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* (EUCAST, 2020), respetivamente.

### 3.2.3 Produção de biofilme

A capacidade dos isolados de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* em formar biofilme foi avaliada usando um ensaio em placa de microtitulação (Gajdács et al., 2021; Kunwar et al., 2021). Células de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* cultivadas em meio LB sólido (ágar Luria-Bertani) foram utilizadas para inocular 3 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH = 7,4) a 0,5 da escala de McFarland. A partir de cada suspensão bacteriana, uma diluição de dez vezes foi realizada em meio líquido de Triptona de Soja (TSB).

As suspensões foram colocadas em placas de microtitulação de 96 poços com volume de 0,2 mL por poço e incubadas a 37 °C por 48 h. O meio TSB sem células foi utilizado como controlo negativo. Após a incubação, a densidade ótica (DO 600 nm) dos ensaios foi medida utilizando-se um leitor de placas em espectrofotômetro - TECAN, Infinite M200.

Para quantificar a formação de biofilme, os sobrenadantes (crescimentos bacterianos) foram descartados sem perturbar o biofilme presente nos poços. O biofilme foi lavado três vezes com 200 µl de água ultrapura para remoção de células planctónicas, não aderidas aos poços das placas. Em seguida, 200 µl de solução de cristal violeta (CV) a 0,1% foram adicionados para corar as células. Após 15 min de coloração, o CV foi descartado e os poços foram lavados três vezes com 200 µl de água ultrapura. O conteúdo do poço foi suspenso novamente com 250 µl de ácido acético a 30% por 15 min. Finalmente, a absorbância a 570 nm foi medida com um leitor de placas. O ensaio de biofilme para cada estirpe foi realizado no mínimo com 6 réplicas (Gajdács et al., 2021; Kunwar et al., 2021; Stepanović et al., 2007). Os resultados foram interpretados considerando o ponto de corte entre as médias das DO do controlo negativo (DOc) e as estirpes testadas (DO). Os isolados foram classificados como não produtores de biofilme ( $DO \leq DOc$ ), fraco ( $DOc < DO \leq 2 \times DOc$ ), moderado ( $2 \times DOc < DO \leq 4 \times DOc$ ) e fortes produtores de biofilmes ( $4 \times DOc < DO$ ) (Stepanović et al., 2007).

### 3.2.4 Avaliação da capacidade de modificação de superfícies poliméricas

O potencial das estirpes, em degradar ou modificar os dispositivos médicos, foi avaliado através da análise do crescimento bacteriano na presença do material polimérico como fonte de carbono. Três dispositivos médicos foram escolhidos com base na sua grande utilização em hospitais, tubo de infusão do soro, cânula nasal e cateter urinário. O tubo de infusão do soro possui policloreto de vinilo (PVC) na sua constituição, a cânula nasal é constituída por PVC associado ao di(2-etilhexil) ftalato (DEHP) e o cateter urinário possui látex revestido com silicone. Os três materiais foram cortados em amostras de 0,8 cm<sup>2</sup>, lavadas em álcool a 70% durante 10 min e secas por 30 min à temperatura ambiente (Rani et al., 2020).

O meio basal livre de carbono foi preparado dissolvendo-se em 1 L de água ultrapura, 0,06 g Tris (pH 7,2 – 7,3), 4,68 g NaCl, 1,49 g KCl, 1,07 g NH<sub>4</sub>Cl, 0,43 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,2 g MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 0,03 g CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, e 0,23 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O.

As suspensões bacterianas utilizadas como inóculo foram preparadas em solução salina 0,85%. Os ensaios de crescimento foram realizados em placas de microtitulação de 12 poços contendo 3 ml de meio basal livre de carbono, 2 fragmentos de cada material polimérico e suspensão bacteriana ajustada de forma a iniciar o crescimento à DO<sub>600nm</sub> de 0,08 (Giacomucci et al., 2019).

Ensaio com apenas meio basal livre de carbono foram preparados para cada material polimérico (controlo negativo) e meios inoculados sem a presença do polímero também foram utilizados como controlo positivo. Cada ensaio foi realizado no mínimo em duplicado. As placas de microtitulação foram incubadas a 37 °C com agitação a 130 rpm durante 48h. As absorvâncias a 600nm foram lidas após períodos de incubação de 24h e 48h.

As estirpes que registaram as DOs mais elevadas nos ensaios anteriores, foram selecionadas para os ensaios de validação do seu potencial na biodegradação/modificação de polímeros. Para esses ensaios, suspensões das estirpes selecionadas e ajustadas de forma a iniciar o

crescimento à  $DO_{600nm}$  de 0,08 foram distribuídas, em duplicado, em tubos cônicos de 50 ml contendo 10 ml de meio basal livre de carbono e amostras de material polimérico. Assim como descrito anteriormente, foram também realizados controlos negativos e positivos. Os tubos foram incubados a 37 °C com agitação a 150 rpm durante 15 dias. Durante este período de incubação, a  $DO_{600nm}$  foi medida em tempos específicos (96 h, 168 h, 264 h, 360 h).

### 3.2.5 Microscopia eletrónica de varrimento (SEM)

A microscopia eletrónica de varrimento (SEM, Veja3 da Tescan GmbH) foi utilizada para verificar a colonização das estirpes selecionadas de *P. aeruginosa* na superfície dos dispositivos médicos testados e as alterações superficiais promovidas pelas bactérias, o que seria indicativo de uma provável degradação das superfícies. Assim, os materiais poliméricos, provenientes dos ensaios de crescimento anteriores, foram fixados com glutaraldeído 2,5% por 15 min, desidratados com soluções crescentes de etanol, 70, 80, 90, 95 e 100%, e secos à temperatura ambiente (H. M. Lee et al., 2020). Antes das observações, as amostras foram revestidas com um filme fino de 10 nm de ouro para eliminar o efeito de carga. Cada amostra foi observada em três áreas diferentes com uma tensão de aceleração de 20 keV, no modo eletrônico secundário (Caldeira et al., 2021).

### 3.2.6 Análise Estatística dos Dados

O teste qui-quadrado foi aplicado para avaliar o nível de significância dos isolados bacterianos testados, estirpes de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*, com os pontos de uso da rede de distribuição de água. Os pontos da rede de distribuição de água potável foram considerados como os locais onde a água flui antes de ter o contacto direto com as mãos de profissionais de saúde, utentes ou visitantes; nomeadamente a parte interna do dispensor do chuveiro e a parte interna da mangueira do chuveiro. O teste consistiu na determinação da diferença entre cada conjunto de valores observados e esperados para as estirpes de *P.*

*aeruginosa* e *K. pneumoniae*, ao quadrado e dividido pelos respectivos valores esperados (Mchugh, 2013). Além disso, esse teste foi utilizado para verificar se há associação entre a produção de biofilme e a resistência aos antibióticos (Kamali et al., 2020; Kibret & Abera, 2014).

Para o ensaio de crescimento com os materiais poliméricos, as análises estatísticas das diferenças entre o grupo selecionado de estirpes de *P. aeruginosa* cultivadas, com e sem material polimérico, foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 6 (Graph-Pad Software, San Diego, CA, EUA). A comparação ao longo do tempo para uma mesma estirpe foi realizada com o mesmo software. Os valores de p foram calculados usando um teste t de amostras independentes para comparar as DOs dos ensaios teste com a do controle positivo.

### 3.3 Resultados

#### 3.3.1 Testes de sensibilidade antimicrobiana

Os perfis de sensibilidade antimicrobiana dos isolados bacterianos são apresentados na Tabela 3.2. Verificou-se que os isolados de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* apresentaram sensibilidade à maioria dos antimicrobianos testados. Todas as estirpes bacterianas foram sensíveis à amicacina, gentamicina e meropenem. Os controles positivos para *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* mostraram que os resultados foram todos consistentes com os indicadores EUCAST (EUCAST, 2020; Leclercq et al., 2013).

As estirpes de *K. pneumoniae* foram sensíveis a levofloxacina, ciprofloxacina, tobramicina, imipenem, cefepime e ceftazidima e, as estirpes de *P. aeruginosa* apresentaram perfil intermediário (sensível sob alta dosagem) a levofloxacina, ciprofloxacina e imipenem.

Para as estirpes de *P. aeruginosa*, perfis de resistência foram observados para a tobramicina (6,6%), cefepima (9,7%) e ceftazidima (3,2%). A polimixina B foi testada apenas para as estirpes de *P. aeruginosa*, resultando em 100% de suscetibilidade.

**Tabela 3.2 Percentagens de resistência das 33 estirpes de *P. aeruginosa* e 2 estirpes de *K. pneumoniae* aos compostos antimicrobianos testados.**

Antibióticos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Frequência (%)			<i>Klebsiella pneumoniae</i> Frequência (%)		
	S (%)	I (%)	R (%)	S (%)	I (%)	R (%)
Levofloxacina		33 (100%)		2 (100%)		
Ciprofloxacina		33 (100%)		2 (100%)		
Ofloxacina**				1 (50%)	1 (50%)	
Amicacina	31 (93,9%)		2 (6,1%)***	2 (100%)		
Tobramicina	31 (93,9%)		2 (6,1%)	2 (100%)		
Gentamicina	33 (100%)			2 (100%)		
Netilmicina*	33 (100%)					
Imipenem		33 (100%)		2 (100%)		
Meropenem	33 (100%)			2 (100%)		
Cefepime		30 (90,9%)	3 (9,1%)	2 (100%)		
Ceftazidima		32 (97%)	1 (3%)	2 (100%)		
Polimixina B*	33 (100%)					

S: sensível; I: intermédio (sensível sob alta dosagem – EUCAST); R: resistente

\* antibiótico testado apenas em *Pseudomonas aeruginosa*

\*\* antibiótico testado apenas em *Klebsiella pneumoniae*

\*\*\* se resistente à Tobramicina e sensível à Gentamicina, resistente à Amicacina relacionada (Leclercq *et. al*, 2013)

Por outro lado, a ofloxacina foi testada exclusivamente em *K. pneumoniae*, mostrando que 50% das estirpes revelaram um padrão intermediário, tornando-se mais suscetíveis sob altas dosagens.

Com base no critério de multirresistência a antibióticos, que considera como multirresistentes os isolados resistentes a três ou mais classes de antibióticos com atividade anti-*Pseudomonas*, as estirpes estudadas não são consideradas multirresistentes, como pode ser observado na Tabela 3.3 (Gajdács *et al.*, 2021; Kunwar *et al.*, 2021).

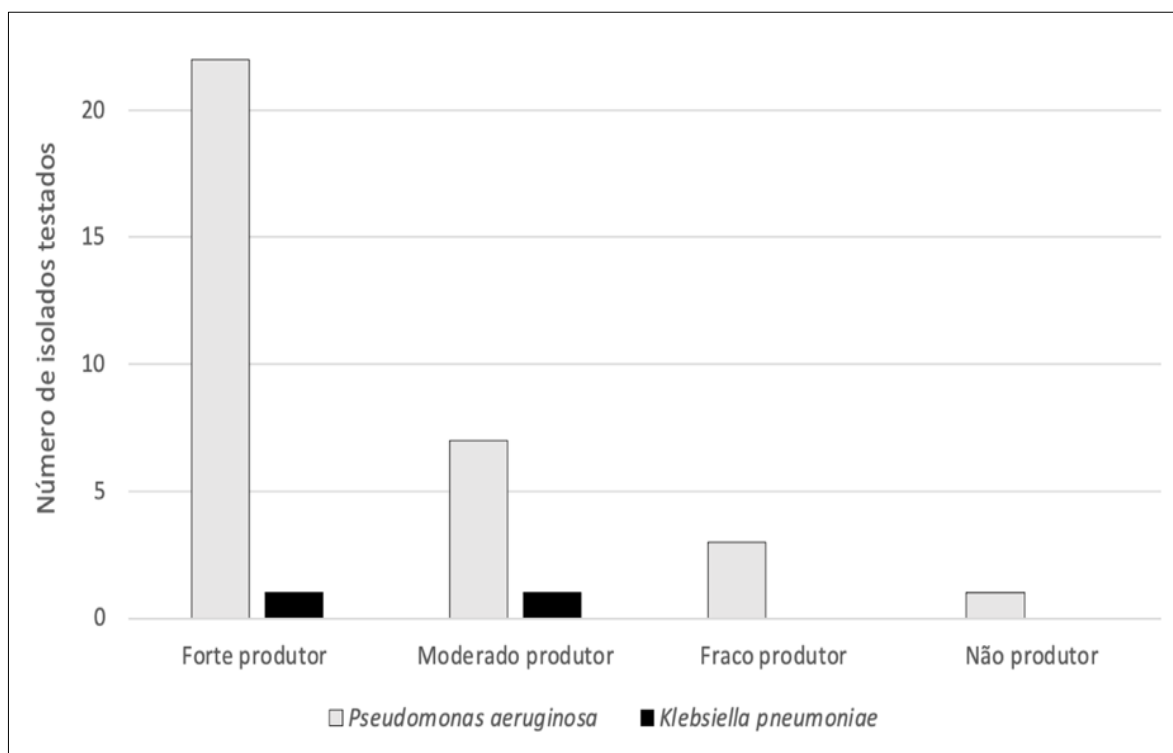


**Tabela 3.3 Classificação quanto à multirresistência (MDR) dos isolados resistentes a antibióticos com atividade anti-pseudomonas.**

Microrganismo	Agente antimicrobiano	Classes de antibióticos	Classificação
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> _266Pi'	tobramicina cefepime	aminoglicosídeos cefalosporinas	não-MDR
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> _247Pol	cefepime tobramicina cefepime	cefalosporinas aminoglicosídeos cefalosporinas	não-MDR
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> _427Pa	cefepime ceftazidima	cefalosporinas cefalosporinas	não-MDR

### 3.3.2 Produção de biofilme

Dos 35 isolados testados quanto à capacidade de produzir biofilme, 23 (65,7%) foram classificados como fortes produtores, 8 (22,9%) como moderados produtores, 3 (8,6%) como fracos produtores e apenas 1 (2,9%) como não produtor de biofilme. Entre as estirpes de *P. aeruginosa* testadas, 22 (66,7%) foram classificadas como fortes produtoras de biofilme, 7 (21,2%) como moderadas, 3 (9,1%) como fracas e 1 (3%) como não produtora de biofilme (Figura 3.1). Em relação aos isolados de *K. pneumoniae*, 1 estirpe foi considerada forte produtora e a outra como moderada produtora de biofilme.



**Figura 3.1** Classificação das estirpes com base na capacidade de produção de biofilme avaliada por ensaio CV.

### 3.3.3 Teste Qui-quadrado

O teste Qui-quadrado mostrou alta significância ( $\chi^2 = 10.36$ ,  $df = 1$ , valor de  $p = 0.0014$ ) entre a rede de distribuição de água potável e as estirpes de *P. aeruginosa* (Tabela 3.4). Dos 33 isolados de *P. aeruginosa*, aproximadamente 93% foram amostrados nos pontos de acesso da rede de distribuição de água potável. Este estudo considerou os pontos de acesso da rede de distribuição de água potável, os equipamentos amostrados no ambiente hospitalar que tiveram contato com a rede de distribuição de água potável, mas não tiveram contato com a equipa hospitalar, utentes e visitantes.

**Tabela 3.4 Ligação entre as estirpes de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* e o sistema de distribuição de água potável.**

	Rede de distribuição de água potável – N. (%)	(não) Rede de distribuição de água potável – N. (%)	Total
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29 (82,9%)	4 (11,4%)	33 (94,3%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0 (0%)	2 (5,7%)	2 (5,7%)
Total	29 (82,9%)	6 (17,1%)	35 (100%)
Valor de <i>p</i>	0,0014		

### 3.3.4 Avaliação da capacidade de modificação de superfícies poliméricas

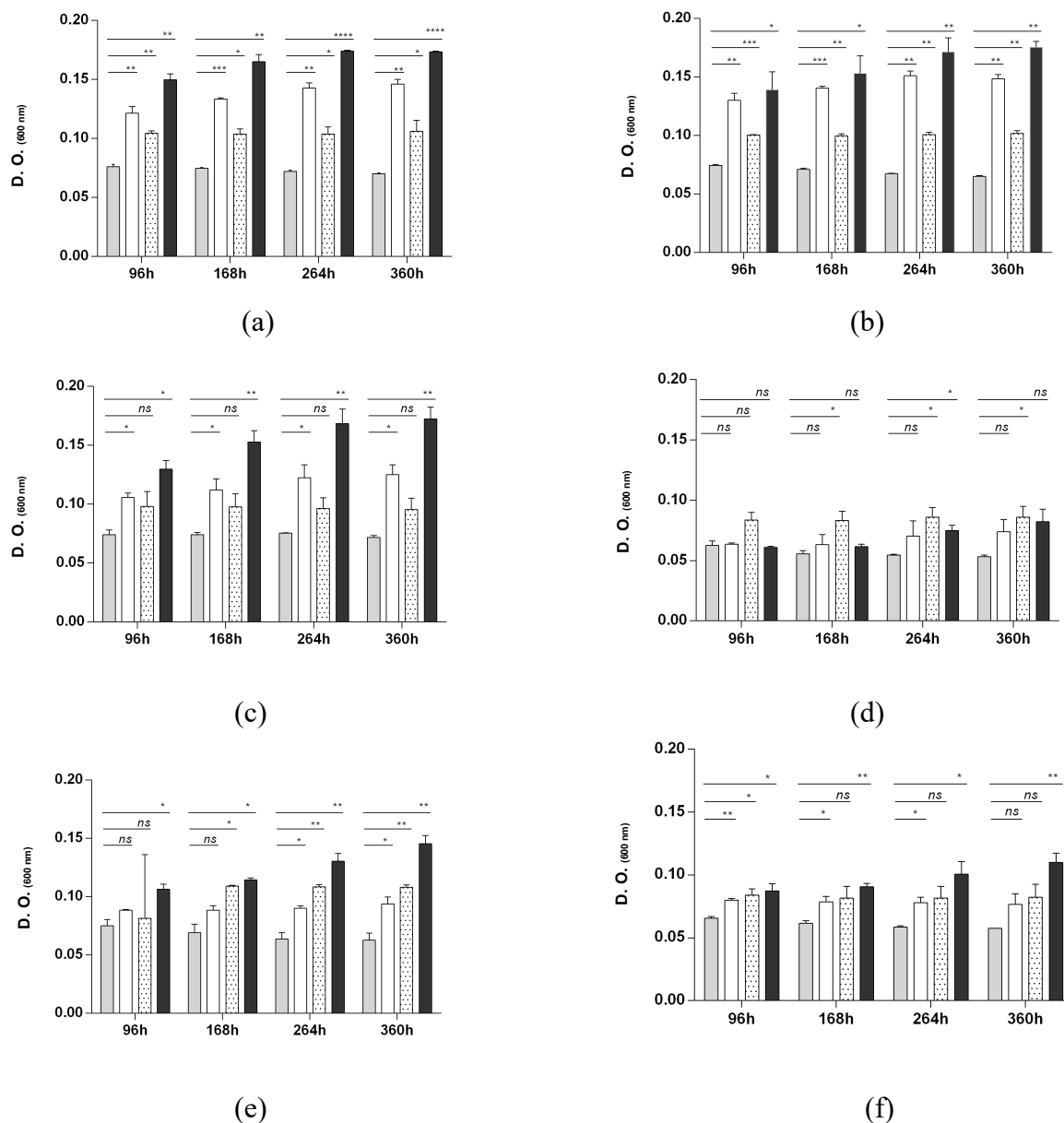
Foi realizada uma análise inicial para selecionar bactérias com maior potencial em modificar ou degradar polímeros, avaliando a capacidade de crescimento em meio não suplementado com qualquer fonte de carbono. A existência de crescimento significativo foi considerada parâmetro indicativo da capacidade bacteriana em obter carbono a partir dos dispositivos poliméricos. As estirpes mais promissoras, após 48 h de incubação, em meio basal livre de carbono foram apresentadas na Tabela 3.5.

O sinal + indica que a DO bacteriana medida no ensaio testado foi 1,5 vezes superior à do ensaio do controle (na ausência de material polimérico), enquanto o sinal – indica que a DO medida foi semelhante à do controle. As estirpes de *P. aeruginosa* que obtiveram as maiores DOs para os três dispositivos médicos utilizados no rastreo foram as estirpes 244 Pa, 266 Pa pol, 427 Pa, 440 Pa, 440 Pi e 462 P pol (Tabela 3.5).

**Tabela 3.5 Análise das bactérias com potencial de degradação de polímeros.**

ESTIRPE	DISPOSITIVO MÉDICO		
	CONJ. DE INFUSÃO SORO	CATETER URINÁRIO	CÂNULA NASAL
<i>P. aeruginosa</i> 118Pa	–	–	–
<i>P. aeruginosa</i> 133Pb	+	+	–
<i>P. aeruginosa</i> 140Ka	–	–	–
<i>P. aeruginosa</i> 140Kd	–	–	–
<i>P. aeruginosa</i> 140P bf	–	–	–
<i>P. aeruginosa</i> 140b pol	–	–	–
<i>P. aeruginosa</i> 152 pol	–	+	–
<i>P. aeruginosa</i> 218P pol	–	–	–
<i>P. aeruginosa</i> 227P pol	–	–	–
<i>P. aeruginosa</i> 244Pa	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> 244P pol	+	+	–
<i>P. aeruginosa</i> 247P pol	–	–	–
<i>P. aeruginosa</i> 266Pb pol	–	–	–
<i>P. aeruginosa</i> 266Pi'	–	–	–
<i>P. aeruginosa</i> 266Pa pol	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> 266Pa'	–	–	–
<i>P. aeruginosa</i> 326Pa	–	–	–
<i>P. aeruginosa</i> 349Pa bf	–	–	–
<i>P. aeruginosa</i> 364Pa	–	+	–
<i>P. aeruginosa</i> 364pol	–	–	–
<i>P. aeruginosa</i> 410Pb	–	–	–
<i>P. aeruginosa</i> 410Pa	–	–	–
<i>P. aeruginosa</i> 417P	–	–	–
<i>P. aeruginosa</i> 417Ppol	–	+	–
<i>P. aeruginosa</i> 427Pa	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> 440Pa	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> 440Pi	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> 440P pol	–	–	–
<i>P. aeruginosa</i> 443P	–	–	–
<i>P. aeruginosa</i> 454Pa	–	–	–
<i>P. aeruginosa</i> 462P pol	+	+	+

A fim de confirmar o seu potencial na degradação do material, estas 6 estirpes foram selecionadas para novos ensaios de crescimento em meio líquido. Após 7 dias de incubação, os crescimentos das estirpes *P. aeruginosa* 440Pa, 440Pi e 244Pa apresentaram as DOs mais elevadas (Figura 3.2).



**Figura 3.2** Densidades óticas dos crescimentos bacterianos, ao longo do período de incubação, na presença de diferentes materiais poliméricos. *Pseudomonas aeruginosa* 440Pa (a), 440Pi (b), 244Pa (c), 427Pa (d), 462Pol (e), 266Pa pol (f). Crescimentos foram

realizados em meio basal livre de carbono, sem os dispositivos médicos (barra cinza), com tubo de infusão do soro (barra branca), com cateter urinário (barras pontilhadas) e com cânula nasal (barras pretas). Os dados apresentados representam os valores médios ( $\pm$  desvio padrão) obtidos a partir de duas ou três réplicas. Ns – sem diferença significativa; \*, \*\*, \*\*\*, \*\*\*\* com diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo, em níveis de significância  $p < 0,04$ ,  $p < 0,009$ ,  $p < 0,0004$  e  $p < 0,0001$  respetivamente.

Com exceção do ensaio da estirpe *P. aeruginosa* 244Pa com o cateter urinário, todos os crescimentos desta estirpe na presença dos materiais poliméricos testados foram estatisticamente superiores ao ensaio controlo. Resultados sem diferença estatisticamente significativa foram obtidos nos ensaios da estirpe de *P. aeruginosa* 266Pa pol com o cateter urinário e com tubo de infusão do soro às 360h; da estirpe *P. aeruginosa* 462 pol, às 96h com o tubo de infusão do soro e o cateter urinário, e da estirpe de *P. aeruginosa* 427Pa com o tubo de infusão do soro e a cânula nasal (Figura 3.2).

Embora as estirpes de *P. aeruginosa* 266Pa pol e 462 pol tenham apresentado as menores DOs registadas, ambas as estirpes, na presença dos materiais apresentaram valores mais elevados em relação ao controlo. Este comportamento não foi visível para *P. aeruginosa* 427Pa (Figura 3.2).

Entre os dispositivos médicos utilizados nestes ensaios, a cânula nasal resultou nas maiores DOs para as estirpes *P. aeruginosa* 244Pa, 440Pa e 440Pi, seguido do tubo de infusão do soro nos ensaios com estirpes *P. aeruginosa* 440Pa e 440Pi. As DOs dos crescimentos com cateter urinário foram mais constantes, mas ainda assim, foram superiores ao controlo (Figura 3.2).

Os dispositivos médicos utilizados nos ensaios com *P. aeruginosa* 440Pa, 440Pi e 244Pa foram examinados utilizando SEM para observar a capacidade de colonização dos microrganismos à superfície e analisar possíveis deformações causada por ação destas bactérias (Figuras 3.3 e 3.4). Todas as três estirpes de *P. aeruginosa* colonizaram as superfícies do tubo de infusão do soro, do cateter urinário e da cânula nasal (Figura 3.3). As

imagens de SEM mostram ainda que as superfícies do conjunto de infusão do soro e da cânula nasal apresentaram deformações e fissuras (Figura 3.4).

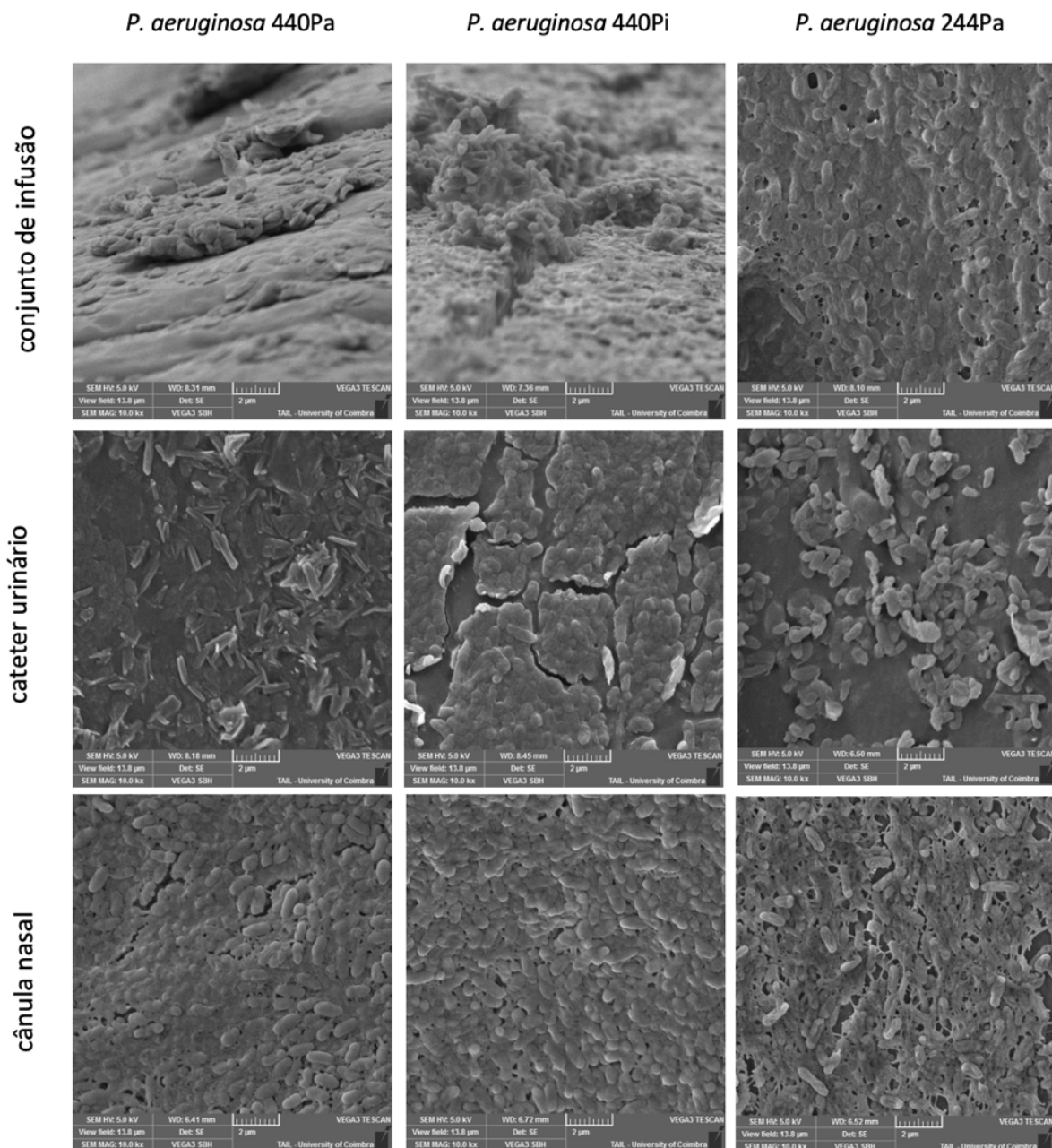
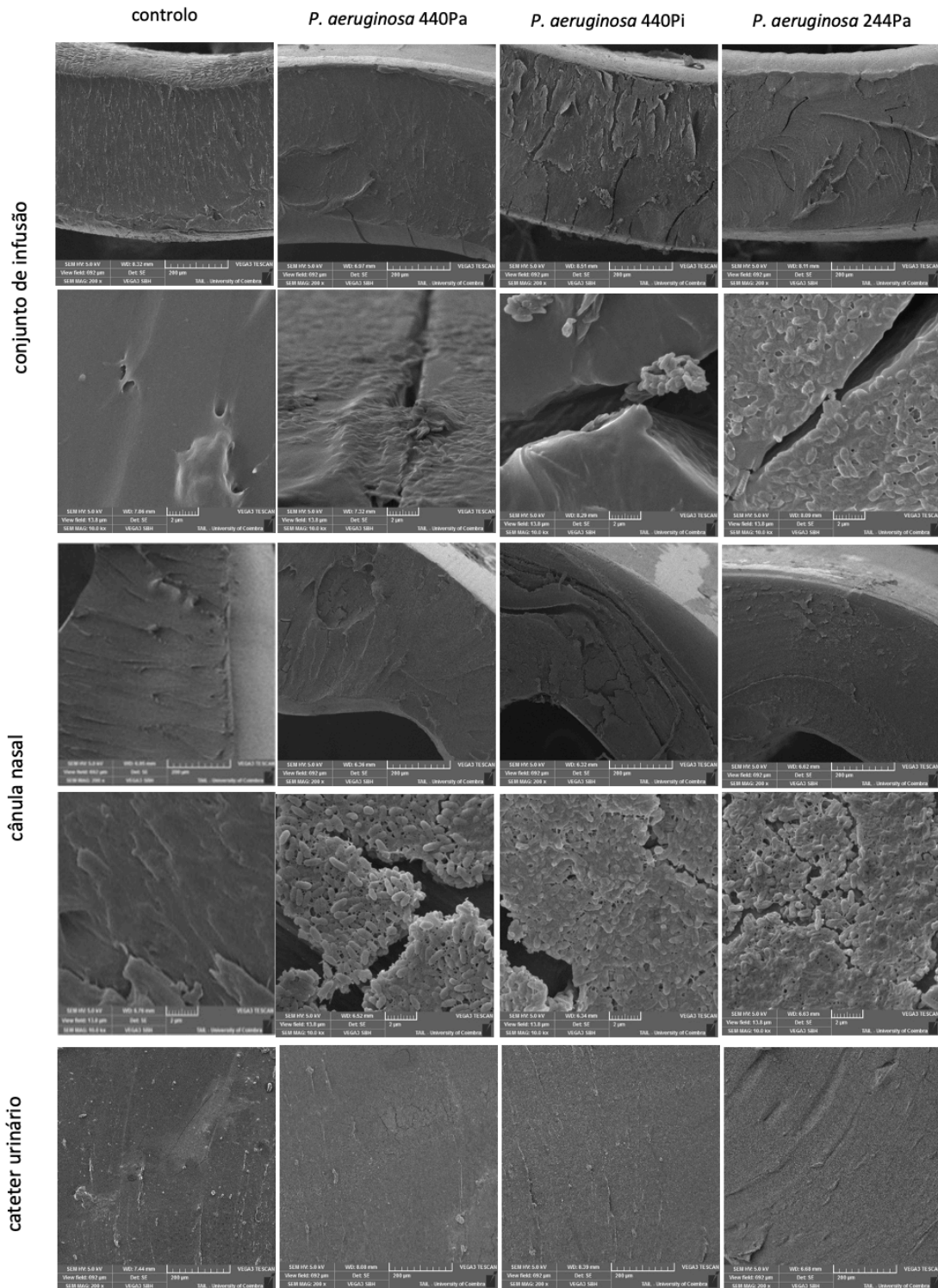


Figura 3.3 Imagens SEM das estirpes *P. aeruginosa* 440Pa, 440Pi e 244Pa em três diferentes superfícies de materiais – tubo de infusão do soro, cateter urinário e cânula nasal.



**Figura 3.4 –** Imagens SEM das estirpes *P. aeruginosa* 440Pa, 440Pi e 244Pa em três diferentes superfícies de materiais – tubo de infusão do soro, cateter urinário e cânula nasal. Controlos negativos foram utilizados para comparação com os dispositivos que foram colonizados.



### 3.4 Discussão

A ocorrência de estirpes de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* permitiu a identificação de potenciais reservatórios microbianos em ambiente hospitalar e a dinâmica nesse ecossistema. As maiores taxas de isolamento de *P. aeruginosa* ocorreram em áreas húmidas, o que está de acordo com estudos anteriores (Gajdács et al., 2021; Mena & Gerba, 2009; Mulcahy et al., 2014; Ong et al., 2020; Schulster et al., 2004; Suleyman et al., 2018; Taudien et al., 2023; Yin et al., 2022). Das 33 estirpes isoladas de *P. aeruginosa* selecionadas, 97% foram recuperadas de superfícies com elevada humidade (Tabela 3.1), tais como, a parte interna da mangueira do chuveiro (48,6%), a parte interna do dispersor do chuveiro (39,4%), o ralo do lavatório do quarto (3%), o chuveiro da casa de banho (3%), a parede do duche (3%) e a bancada da sala de enfermagem (3%).

A caracterização da suscetibilidade antimicrobiana das estirpes de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* foi realizada usando antibióticos de importância clínica. As estirpes testadas foram suscetíveis à maioria dos antibióticos, sendo diferente dos resultados de estudos reportados na literatura (Aleem et al., 2021; Cristina et al., 2021; Hu et al., 2021; Okafor et al., 2022; Zahornacký et al., 2022). Neste caso, pode-se levantar a hipótese de que os pontos de distribuição de água potável (tubagens, parte interna da mangueira do chuveiro e parte interna do dispersor do chuveiro) podem ser pontos críticos de entrada de bactérias ambientais no ambiente hospitalar. Estas estirpes transitórias presentes na água ainda não apresentam resistência a muitos antibióticos clínicos.

O teste do qui-quadrado corrobora a ideia de que a origem da *P. aeruginosa* está relacionada com os pontos de acesso da rede de distribuição de água potável. Os reservatórios de água potável são frequentemente apontados como fontes ambientais de *P. aeruginosa* (Schulster et al., 2004; Suleyman et al., 2018) que podem ser transmitidas dentro do ambiente hospitalar em contato direto com a água ou indiretamente pelas mãos dos profissionais de saúde

(Council of the European Union, 2020; Khan et al., 2015; Schulster et al., 2004; Suleyman et al., 2018; Zahornacký et al., 2022).

Estirpes ambientais de *P. aeruginosa* foram encontradas em 2% ou menos das amostras de água potável (Vaz-Moreira et al., 2014). No entanto, sua frequência no ambiente hospitalar aumenta pela sua capacidade de produzir biofilme. Esta capacidade bacteriana é crucial para garantir a sua sobrevivência em ambientes com baixa disponibilidade de nutrientes (Gajdács et al., 2021; Mena & Gerba, 2009; Suleyman et al., 2018). Considerando a distribuição de *P. aeruginosa*, o risco de transmissão existe quando os utentes são expostos durante o banho e através do contato com dispositivos contaminados (Schulster et al., 2004; Suleyman et al., 2018).

É de grande relevância detetar e enumerar organismos patogênicos presentes em ambientes hospitalares e também avaliar suas características para persistirem nesses locais. Neste sentido, analisou-se a relação entre resistência a antibióticos e a formação de biofilme. No nosso grupo de isolados, a maioria das estirpes de *P. aeruginosa* (~67%) e 50% das estirpes de *K. pneumoniae* foram identificadas como fortes produtoras de biofilme e não-MDR. Diversos estudos reportados na literatura correlacionam a resistência aos antibióticos com a produção de biofilme (Abdulhaq et al., 2020; Aleem et al., 2021; Cristina et al., 2021; Gajdács et al., 2021; Hu et al., 2021; Kamali et al., 2020; Okafor et al., 2022; Zahornacký et al., 2022). Um estudo realizado com 302 estirpes de *P. aeruginosa*, isoladas de diferentes locais, identificou ~59,3% destas como fortes produtoras de biofilme, nos grupos MDR, mas também nos grupos não-MDR (Gajdács et al., 2021).

Devemos salientar que todos os isolados deste estudo foram submetidos a testes de suscetibilidade antimicrobiana como células planctónicas e não como biofilme. A comunidade de bactérias que cresce como biofilmes é no entanto referida como sendo capaz de expressar diferentes genes que dificultam a ação dos antibióticos (Ciofu & Tolker-Nielsen,

2019; Hall & Mah, 2017; Khatoon et al., 2018; Thi et al., 2020). Portanto, uma vez inseridos e mantidos no ambiente hospitalar, os biofilmes bacterianos podem ser menos suscetíveis a agentes antimicrobianos do que as células planctônicas geneticamente idênticas (Ciofu & Tolker-Nielsen, 2019; Hall & Mah, 2017; Lebeaux et al., 2014; P. K. Taylor et al., 2014; Thi et al., 2020; Yin et al., 2022).

A capacidade colonizadora de estirpes de *P. aeruginosa* em dispositivos médicos pode ser utilizada para avaliar o potencial das bactérias em biodegradar estes materiais. Normalmente, a formação de biofilme precede a biodegradação dos materiais poliméricos (Ghosh et al., 2019). Durante a fase de fixação bacteriana na superfície do polímero, as bactérias podem libertar enzimas extracelulares capazes de capturar o carbono essencial ao seu crescimento (Ghosh et al., 2019; Mohanan et al., 2020).

Todos os três dispositivos são compostos por materiais que podem ser usados pelas bactérias como fonte de carbono. O cloreto de polivinilo é um polímero termoplástico (Lewandowski & Skórczewska, 2022), formado por carbono, hidrogênio e cloro  $(C_2H_3Cl)_n$  (Kotova et al., 2021; Wilkes & Aristilde, 2017). O DEHP é constituído por carbono, hidrogênio e oxigênio  $(C_{24}H_{38}O_4)$  (DiGangi et al., 2002; Faessler et al., 2017). O látex tem aproximadamente 35% de hidrocarbonetos na sua constituição  $(C_5H_8)_n$  (Agostini, 2009).

Estirpes de *P. aeruginosa* 440Pi, 440Pa e 244Pa foram as mais promissoras em modificar os materiais poliméricos, uma vez que apresentaram melhores crescimentos em meio basal livre de carbono na presença destes materiais. Este resultado sugere que estas estirpes poderão remover o carbono necessário ao seu crescimento, a partir dos materiais médicos testados.

As imagens de SEM mostram que as amostras controlo, sem bactérias, exibiram superfícies íntegras. No entanto, estas superfícies sofreram modificações com o crescimento das estirpes de *P. aeruginosa* testadas. Os materiais com maior colonização bacteriana, cânula nasal e

tubo de infusão do soro, foram os dispositivos que mostraram alterações mais visíveis na sua superfície.

O tubo de infusão do soro e o cateter urinário são ambos constituídos por PVC, um termoplástico cuja estrutura é constituída exclusivamente por átomos de carbono, referenciado como resistente à degradação (Mohan et al., 2020; Wilkes & Aristilde, 2017; Zheng et al., 2005), embora possa ser colonizada por bactérias formadoras de biofilme (Maurice et al., 2018). A presença de DEHP, um plastificante utilizado em produtos de PVC, parece facilitar a modificação da cânula nasal por *P. aeruginosa*. Um estudo anterior utilizou *P. aeruginosa* em dois reatores com solo contaminado por DEHP, em que um continha apenas *P. aeruginosa* e o outro continha *P. aeruginosa* adicionada à comunidade nativa da estação de tratamento de efluentes (Linos et al., 2000). Em ambos os reatores, a presença de *P. aeruginosa* contribuiu para taxas de degradação do DEHP.

O cateter urinário é constituído por látex revestido com silicone, cuja degradação é estudada há mais de 100 anos (Ali Shah et al., 2013; Andrade et al., 2022; Rose & Steinbüchel, 2005). Em publicações que abordam a biodegradação da borracha, há um consenso de que bactérias, assim como fungos, são capazes de degradá-la, sendo, no entanto, o processo extremamente lento (Ali Shah et al., 2013; Andrade et al., 2022; Rose & Steinbüchel, 2005). A estirpe *P. aeruginosa* AL98, obtida a partir de amostras ambientais de água suja dos pneus de automóveis deteriorados, é relatada como capaz de degradar a borracha natural e vulcanizada (Linos et al., 2000).

### 3.5 Conclusões

Neste trabalho, mostramos que a distribuição das estirpes de *P. aeruginosa* no ambiente hospitalar pode estar relacionada a pontos de acesso à água potável do hospital. Estas estirpes apresentaram um perfil de sensibilidade à maioria dos agentes antimicrobianos testados (>90%) e foram classificados como fortes produtores de biofilme (66,7%).

Amostras obtidas da parte interna da mangueira do chuveiro e da parte interna do dispersor do chuveiro, do ralo do lavatório do quarto, do chuveiro da casa de banho, da parede do duche e da bancada da sala de enfermagem indicam que estes foram importantes pontos de dispersão de *P. aeruginosa* no hospital.

Os dispositivos médicos utilizados neste estudo mostraram colonização por biofilme. Uma vez aderidos à superfície destes dispositivos, os biofilmes bacterianos podem desempenhar um papel importante na dispersão das células, o que pode contribuir para a propagação de doenças.

A estirpe *P. aeruginosa* 440Pi apresentou o maior potencial para modificar as superfícies poliméricas, sugerindo que a estirpe poderá ter a capacidade de remover carbono dos dispositivos médicos que poderá levar à degradação destes materiais.



**Capítulo IV: Avaliação da eficácia microbiológica de três métodos de descontaminação de máscaras e o seu impacto na filtração, permeabilidade ao ar e propriedades físico-químicas**





## Resumo

A necessidade de proteger a saúde pública e de mitigar o impacto ambiental associado ao uso massificado de dispositivos de proteção respiratória (DPRs) tem vindo a sensibilizar indivíduos e organizações para a reutilização segura de máscaras descontaminadas. Entre os tratamentos de descontaminação propostos neste trabalho, foram analisados três métodos com potencial para serem adotados em residências e organizações de diferentes dimensões: contacto com peróxido de hidrogénio nebulizado ( $H_2O_2$ ); imersão em lixívia comercial (NaClO) (hipoclorito de sódio, 0.1% p/v); e contacto com vapor em sacos de vapor para micro-ondas. A eficácia de descontaminação dos métodos foi avaliada usando microrganismos de referência seguindo normas internacionais (emitidas pela ISO e FDA). Além disso, o impacto na eficiência de filtração, a permeabilidade ao ar e várias características físico-químicas e estruturais das máscaras foram avaliadas em máscaras não tratadas e após 1, 5 e 10 ciclos de tratamento. Três tipos de DPR foram analisados: máscaras cirúrgicas, KN95 e de pano. Os resultados obtidos demonstraram que a metodologia do  $H_2O_2$  utilizada esterilizou as máscaras KN95 e cirúrgicas, tendo apresentado uma redução  $> 6 \log_{10}$  UFCs. Esta técnica foi ainda capaz de desinfetar as máscaras de pano, as quais apresentaram uma redução  $> 3 \log_{10}$  UFCs. O tratamento com NaClO esterilizou máscaras cirúrgicas e desinfetou máscaras KN95 e de pano. Os sacos de vapor esterilizaram máscaras KN95 e desinfetaram máscaras cirúrgicas e de pano. Com todas as metodologias testadas, não foi observado qualquer impacto relevante na eficiência da filtração das máscaras.

### 4.1 Introdução

Os dispositivos de proteção respiratória (DPRs) desempenharam um papel crucial no controlo e mitigação da pandemia de COVID-19. Durante os surtos, o uso destes equipamentos

tornou-se obrigatório ou altamente recomendado, tanto em contextos profissionais como sociais. Contudo, a massificação do uso dos DPRs originou dois problemas principais: (i) escassez local, principalmente no início do primeiro surto e até os produtores reconfigurarem a sua produção e adaptarem as cadeias de abastecimento; (ii) o descarte em massa de máscaras, produtos à base de fibra plástica, o que constitui um grave problema ambiental, uma vez que são recolhidas e processadas como lixo doméstico indiferenciado (lixo comum). O primeiro problema, ainda que circunstancial e limitado no tempo, pode ter um impacto significativo na saúde pública e em operações críticas. Embora o aumento da produção possa resolver este problema, certamente não atenua o segundo. Uma solução, para ambos os problemas, consiste na reutilização dos DPRs, sob determinadas condições e após um tratamento de descontaminação adequado. Esta linha de ação poderia, de facto, suprir a escassez local, pois a reutilização única é equivalente a um aumento de 100% na disponibilidade de máscaras. Por outro lado, uma única reutilização também reduzirá a pegada ambiental em 50%. Estes argumentos motivaram a pesquisa de métodos de descontaminação eficientes e eficazes para DPRs, bem como a análise de situações em que poderiam ser consideradas viáveis.

Duas linhas de investigação sobre a aplicação de métodos de descontaminação para a reutilização de DPRs podem ser encontradas na literatura. A primeira ocorreu em 2010, após o surto de influenza A (H1N1) (gripe A), e a segunda começou em 2020, em consequência da pandemia de SARS-CoV-2. Durante a pandemia de gripe A, um estudo reportou o impacto de cinco métodos de descontaminação na integridade e desempenho de máscaras KN95, cirúrgicas e P100, avaliando a penetração de aerossóis e resistência ao fluxo de ar, entre outros aspetos (Viscusi et al., 2009). Os autores apontaram a radiação ultravioleta (UV), o óxido de etileno e o peróxido de hidrogénio como os métodos de descontaminação mais promissores. Por outro lado, o uso de lixívia levantou algumas preocupações devido ao cheiro

remanescente perceptível após a secagem durante a noite e à presença de níveis baixos de cloro encontrados em ensaios de desgaseificação. A radiação com micro-ondas também não foi recomendada devido ao risco de comprometer as camadas da máscara. Outro estudo testou o uso de três ciclos de tratamento para oito métodos de descontaminação, incluindo alguns dos procedimentos supramencionados (Bergman et al., 2010). Assim como no estudo anterior, a penetração do filtro por aerossóis e a resistência do filtro ao fluxo de ar foram avaliados juntamente com vários aspectos da integridade dos DPRs. Contudo, a eficiência da filtração ou a capacidade de inativar organismos biológicos infecciosos não foram avaliadas. Os efeitos de três métodos de descontaminação – radiação UV, incubação com calor húmido e vapor gerado por micro-ondas – nas características de adaptação, odor, conforto e colocação dos DPRs também foram explorados (Viscusi et al., 2011). Também a capacidade de três métodos energéticos – vapor gerado por micro-ondas, calor húmido quente e radiação UV – para descontaminar o vírus influenza H1N1 foi avaliada (Heimbuch et al., 2011). Todos esses métodos originaram uma redução  $> 4 \log_{10}$  do vírus H1N1 viável. No entanto os autores usaram um método de contaminação por aerossóis em detrimento do procedimento mais comum de adição de gotículas (*spiking*), semelhante ao procedimento seguido por Fisher e colaboradores (E. Fisher et al., 2009). O uso de sacos de vapor para micro-ondas foi igualmente avaliado como metodologia para inativação de bacteriófagos MS2 em DPRs após três ciclos de contaminação-descontaminação (E. M. Fisher et al., 2011).

Com o surto de coronavírus, o interesse em métodos de descontaminação para a reutilização segura de DPRs foi reavivado, e diversos artigos de revisão foram publicados. Um relatório recente apresentou uma visão geral do uso de máscaras, a sua manufatura, ciclo de vida e descontaminação (Chua et al., 2020). Além disso, várias revisões recentes focaram-se em intervenções de descontaminação para máscaras cirúrgicas (Rubio-Romero et al., 2020; Zorko et al., 2020). Uma revisão da literatura sobre a persistência do coronavírus em

superfícies inanimadas e o uso de estratégias biocidas para descontaminação química sugeriu que a inativação química do coronavírus com hipoclorito de sódio (de uso comercial) com concentração de 0.1% (p/v) é eficaz em 1 min (Kampf et al., 2020). Este estudo recomenda uma diluição de 1:50 da formulação padrão de lixívia para uso durante a crise pandémica.

O efeito da descontaminação por radiação UV, peróxido de hidrogénio vaporizado e calor seco em máscaras cirúrgicas e KN95 também foi avaliado usando coronavírus suíno (Ludwig-Begall et al., 2020). Os resultados mostraram uma redução de mais de 3 ordens de grandeza do indicador (coronavírus respiratório suíno, PRCV) em máscaras contaminadas e, conseqüentemente, os autores consideraram o protocolo eficaz e reproduzível. Recentemente, foi desenvolvido um protocolo de descontaminação de máscara KN95 baseado em micro-ondas e usando materiais facilmente acessíveis (Zulauf et al., 2020). Neste trabalho 10 µL do fago MS2 à concentração de  $10^9$  UFP mL<sup>-1</sup> foram inoculados nas máscaras KN95 e, após exposição ao vapor em micro-ondas por 3 min, a carga viral foi reduzida de 5 para 6 log<sub>10</sub> em todos os testes, confirmando a eficácia do método de descontaminação.

A investigação realizada na década de 2010 contribuiu com novas e importantes informações acerca da viabilidade do uso de vários métodos de descontaminação para a reutilização dos DPRs. Contudo, algumas das soluções mais bem-sucedidas defendidas exigem equipamentos caros e profissionais bem treinados. Este é o caso da utilização de óxido de etileno, por exemplo, que também pode criar preocupação com a posterior utilização das máscaras devido à toxicidade do agente de descontaminação. Adicionalmente, a maioria dos estudos publicados destacou o impacto dos tratamentos no desempenho da filtração nos DPRs e, com algumas exceções, não avaliou simultaneamente a eficácia da inativação microbiológica.

No presente trabalho, retomámos a linha de investigação sobre a eficácia dos métodos de descontaminação para reduzir a pressão sobre a demanda de DPRs e mitigar o impacto ambiental nocivo do seu uso excessivo e descarte concomitante. Este estudo foi desenhado

considerando os seguintes critérios, selecionados com o objetivo de produzir conhecimento que ajudem os decisores a estruturar uma resposta eficaz às ameaças à saúde e ao meio ambiente mencionadas anteriormente: (i) os métodos de descontaminação devem ser acessíveis e os protocolos tecnicamente disponibilizados aos profissionais de pequenas e médias empresas (PME), serviços de saúde de pequenas dimensões, lares de idosos, serviços públicos (polícia, bombeiros, etc.), famílias e similares; (ii) contemplar as máscaras mais comuns para uso profissional e não profissional; (iii) contemplar a avaliação da eficácia da descontaminação microbiológica e os aspetos físico-químicos.

Estes critérios visam alcançar um efeito estimulador numa grande parte da sociedade, abrangendo contextos profissionais e não profissionais. Além disso, atendem às necessidades dos utilizadores com diferentes perfis e, por isso, usam máscaras com requisitos de proteção distintos. Finalmente, pretende-se também o aumento do estado da arte atual acerca de métodos de descontaminação, ao fornecer uma visão abrangente dos efeitos do uso de vários ciclos de tratamento.

De acordo com esses critérios, o presente estudo contemplou três tipos de DPRs, máscaras cirúrgicas, KN95 e de pano e três procedimentos de descontaminação: contacto com peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ); imersão em lixívia comercial ( $NaClO$ ) (hipoclorito de sódio, 0,1% p/v); e contacto com vapor em sacos de vaporização para micro-ondas (sacos de vapor).

## 4.2 Materiais e Métodos

### 4.2.1 Dispositivos de Proteção Respiratória (DPRs)

Três tipos de DPRs foram estudados neste trabalho: máscaras cirúrgicas (MC), máscaras KN95 (KN) e máscaras de pano (MP). As máscaras cirúrgicas com laços foram adquiridas ao produtor, Bastos Viegas (Ref.<sup>a</sup> 465-001, Bastos Viegas, S.A., Penafiel, Portugal). As máscaras de pano com elásticos nas laterais foram fabricadas pela Borgstena (Concept 2 B,

Borgstena Textile Portugal, Nelas, Portugal). As máscaras KN95 testadas eram do modelo GB2626-2006 9501 + KN95 da marca 3M. De acordo com a informação fornecida pelos fabricantes, todos os 3 tipos de máscaras incluem diferentes camadas de materiais de polipropileno (PP) e polietileno tereftalato (PET), do seguinte modo:

Máscaras cirúrgicas (MC): camada externa (E, tecido não tecido de PP); camada intermédia (M, tecido não tecido por fusão de PP); e camada interna (I', tecido não tecido de PP).

Máscaras KN95 (KN): camada externa (E, tecido não tecido de PP); camada intermédia (M, tecido não tecido fundido por fusão de PP de “algodão”); e camada interna (I', tecido não tecido de PP).

Máscaras de pano (MP): camada externa (E, tecido PET); camada intermédia próxima à camada externa (ME, tecido não tecido de PP); intermédia próxima à camada interna (MI, tecido não tecido de PP); e camada interna (I', tecido PET – diferente da camada externa).

#### 4.2.2 Tratamentos de descontaminação

Três metodologias de descontaminação distintas foram executadas para todos os DPRs estudados, nomeadamente: (i) contacto com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nebulizado; (ii) imersão em NaClO 0.1% p/v; e (iii) contacto com vapor em sacos de vapor para micro-ondas. Todos os DPRs estudados foram submetidos a 5 e 10 ciclos de tratamento consecutivos (designados por 5c e 10c, respetivamente; para os ensaios microbiológicos, também foi considerado 1 ciclo, referido como 1c), de acordo com os procedimentos detalhados abaixo. Grupos controlo (DPRs sem tratamento) foram igualmente incluídos de forma a serem usados como comparação.

### *Contacto com peróxido de hidrogénio nebulizado (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)*

Os DPRs foram colocados em contacto com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nebulizado numa sala selada (10 m<sup>3</sup>), à temperatura ambiente (18 ± 2 °C). A nebulização foi produzida por um nebulizador comercial (NOCOLYSE®, modelo Nocospray, Oxypharm, Champigny-sur-Marne, França), que pulverizou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> líquido na sala selada até atingir a concentração de 3 mL de líquido nebulizado por m<sup>3</sup>, de acordo com o protocolo do fabricante. Mais especificamente, cada tratamento consistiu na emissão de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em duas aplicações com um intervalo de 30 min entre ambas as aplicações, e um intervalo de 2 h 30 min após a segunda aplicação e o novo tratamento seguinte (recomendação do fabricante).

Após o período de contacto, os DPRs foram removidos da sala e guardados por 3 h para permitir a evaporação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> residual adsorvido/absorvido do DPR. O procedimento foi repetido para que os DPRs fossem processados por 1, 5 e 10 ciclos consecutivos de tratamento. No fim, os DPRs foram armazenados em sacos plásticos de polietileno (PE) para uso alimentar selados para futura caracterização. Foram realizadas cinco réplicas para caracterização físico-química.

Os DPRs sujeitos a ensaios microbiológicos foram inoculados antes dos 1º, 5º e 10º ciclos de tratamentos, com uma suspensão de endósporos de *Geobacillus stearothermophilus* DSM22. A inoculação consistiu na aplicação de 100 µL da dita suspensão em duas partes diferentes do DPR, de acordo com a norma ISO 14937 (Kotzekidou, 2014), que foi seca, à temperatura ambiente, numa câmara de fluxo laminar, antes da análise microbiológica.

### *Imersão em lixívia comercial (NaClO)*

A desinfecção com lixívia para caracterização físico-química seguiu o protocolo de Kampf e colaboradores (Kampf et al., 2020). Em suma, os DPRs foram imersos em soluções aquosas de lixívia (0,1% p/v de hipoclorito de sódio) diluídas com água ultrapura de 3% p/v de lixívia

engarrafada disponível comercialmente (Lixívia A Limpinha, Elismarc, Salreu, Portugal), usada apenas durante 3 dias após abertura. A imersão foi realizada por 1 min à temperatura ambiente ( $18 \pm 2$  °C), seguida de 10 lavagens com água ultrapura e secagem em estufa de circulação de ar a 30 °C por 4 h, para caracterização físico-química, ou à temperatura ambiente a  $18 \pm 2$  °C por 48 h, para ensaios microbiológicos. Todos os procedimentos descritos foram repetidos para obter DPRs processados com lixívia por 5 e 10 ciclos de tratamento consecutivos. As experiências foram realizadas com cinco réplicas. Finalmente, os DPRs foram armazenados sacos plásticos de PE para uso alimentar selados para futura caracterização.

Os DPRs para ensaios microbiológicos foram inoculados antes dos 1º, 5º e 10º ciclos de tratamentos, com uma suspensão de endósporos de *Bacillus atrophaeus* DSM675, seguindo o procedimento descrito na secção anterior.

#### *Contato com vapor em sacos de vapor para micro-ondas (Sacos de Vapor)*

Os DPRs para caracterização físico-química foram tratados como descrito na literatura (E. M. Fisher et al., 2011), com pequenos ajustes. Resumidamente, os DPRs sem componentes metálicos foram colocados dentro de sacos de vapor de plástico para micro-ondas, disponíveis comercialmente (saco para micro-ondas Quick Clean™, produzidos por Medela®, Barcelona, Espanha), com 60 mL de água desionizada e colocados no micro-ondas por 3 min a 800 W e 2450 MHz (MS23K3513AW, Samsung, Portugal). Após o processamento, os DPRs foram removidos dos sacos de vapor e secos ao ar, à temperatura ambiente. O mesmo procedimento foi repetido para obter DPRs processados por 5 e 10 ciclos de tratamento consecutivos em micro-ondas. As experiências foram realizadas com cinco réplicas e os DPRs foram armazenados em sacos plásticos de PE para uso alimentar selados para futura caracterização. Para os ensaios microbiológicos, os DPRs foram tratados de forma



similar ao descrito anteriormente no tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, usando esporos de *G. stearothermophilus*.

#### 4.2.3 Ensaios microbiológicos

##### *Produção de endósporos*

O presente estudo seguiu as diretrizes da norma ISO 14937 (Kotzekidou, 2014) e do Guia de Indicadores Biológicos da FDA (*Food and Drug Administration* – Administração de Alimentos e Medicamentos, em português) para a produção de endósporos de *G. stearothermophilus* e *B. atrophaeus*. Resumidamente, células de *G. stearothermophilus* DSM 22 foram inoculadas em meio TSB (*Tryptone Soy Broth*), incubadas a 55 °C durante 72 h a 160 rpm (Delbrück et al., 2021). Células de *B. atrophaeus* DSM 2277 foram crescidas em meio NB (*Nutrient Broth*) a 30 °C também por 72 h a 160 rpm. Após o crescimento, as células foram centrifugadas a 4 °C e pasteurizadas a 80 °C por 10 min; adaptado de Wells–Bennik *et al.* (2019) (Albert et al., 1998). Para a libertação dos endósporos, as células foram lisadas sob alta pressão (1500-2000 psi) (Marceneiro et al., 2022), e os endósporos foram concentrados por centrifugação usando um filtro de 100 kDa a 4000 rpm por 30 min. A qualidade da suspensão de endósporos foi avaliada por microscopia e a suspensão foi mantida a 4°C.

A concentração dos endósporos em suspensão foi determinada através do plaqueamento de diluições seriadas em meio sólido. Depois da incubação às respectivas temperaturas, as unidades formadoras de colónias (UFC) foram contadas. Cada suspensão foi diluída a fim de obter stock de suspensões com aproximadamente 10<sup>7</sup>, 10<sup>8</sup> e 10<sup>9</sup> células por mL<sup>-1</sup>, tendo sido usadas como concentrações microbianas para os estudos de descontaminação de máscaras. Os inóculos foram colocados em diferentes posições das máscaras e marcados para amostragem posterior, após terminada a sequência de tratamento.

### *Protocolo de descontaminação das máscaras*

A descontaminação dos DPRs foi avaliada, no mínimo em triplicado, após uma determinada sequência de ciclos de tratamento. Um ciclo de tratamento correspondeu à execução completa do método de descontaminação até à secura completa da máscara. O número de ciclos de tratamento foi 1, 5 e 10 ciclos. Com o intuito de proceder com a análise microbiológica, os DPRs correspondentes aos grupos 5c e 10c foram removidas ao fim do quarto e nono ciclos, respetivamente. Os DPRs (para tratamentos e controlos) foram inoculados com 100 µL de cada suspensão (Kanaan et al., 2020; Kotzekidou, 2014), secos durante a noite à temperatura ambiente e submetidos a tratamento. Os grupos controlo foram contaminados, secos durante a noite à temperatura ambiente, mas não foram sujeitos a tratamento.

### *Análise microbiológica*

Após passado o número alvo de ciclos de tratamento, as máscaras foram sujeitas a análise microbiológica. Para tal, a área inoculada de ambas as máscaras sujeitas a tratamento e de controlo foram removidas e suspensas em solução salina a 0,85% durante 1 h. Posteriormente, 100 µL desta solução foram plaqueados em meio NA (*Nutrient Agar*), ou meio TSA (*Tryptic Soy Agar*), e incubados por 24 h a 30 °C ou a 50 °C, de acordo com o microrganismo analisado. As UFCs foram contadas para determinar a eficiência do método de desinfeção, seguindo a norma ISO 14937 (Kotzekidou, 2014).

#### 4.2.4 Eficiência de Filtração e Permeabilidade ao Ar dos DPRs

Em todos os testes, três máscaras foram analisadas em duas posições cada, realizando 6 pontos experimentais para cada condição experimental sob análise.

### *Eficiência da filtração*

As medições da eficiência de filtração de partículas (EFP) foram realizadas de acordo com o Anexo D da norma CWA 17553:2020. As concentrações de partículas a montante (antes de passar pelo meio filtrante) e a jusante (depois de passar pelo meio filtrante) foram determinadas com recurso por um laser de diodo (esférico). Partículas sólidas não neutralizadas de látex de poliestireno (PSL) foram suspensas no ar a uma concentração de  $40 \pm 20$  partículas por  $\text{cm}^3$ . O fluxo de ar foi configurado a  $28.3 \text{ L}\cdot\text{m}^{-1}$  com tempo de teste de 1 min. A área de teste da amostra foi de  $80 \pm 12 \text{ cm}^2$ . A velocidade de filtração foi de  $6 \pm 1 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ . As medições EFP são obtidas a partir da percentagem de filtração, de acordo com as Equações (1) e (2):

$$\text{EFP (\%)} = 100\% - \text{Penetração (\%)} \quad (1)$$

$$\text{Penetração (\%)} = \frac{\text{Concentração de partículas a montante}}{\text{Concentração de partículas a jusante}} \times 100 \quad (2)$$

Nas equações acima, as concentrações a montante e a jusante são relacionadas às partículas com diâmetro de aproximadamente  $3 \pm 0,5 \mu\text{m}$ .

### *Permeabilidade ao ar*

As medições da permeabilidade ao ar foram realizadas de acordo com a norma ISO 9237:1995. A queda da pressão foi ajustada a 40 Pa. A área de teste da amostra foi de  $20 \text{ cm}^2$ . As condições ambientais foram mantidas a  $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $65 \pm 4 \%$  de humidade relativa (HR). As medições da permeabilidade ao ar são fornecidas em unidades de  $\text{Lm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  ou  $\text{mm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

#### 4.2.5 Caracterização Físico-Química dos DPRs

As superfícies de todas as camadas constituintes dos DPRs foram analisadas para as amostras não tratadas e amostras tratadas por todos os métodos para 5 e 10 ciclos de tratamento. Todas as amostras foram analisadas no mínimo em duplicado.

##### *Análise de Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier e Refletância Total Atenuada (EITF-RTA)*

A composição química foi estudada por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier e Refletância Total Atenuada (EITF-RTA) usando uma lente de diamante (Frontier, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Foram analisadas amostras de todas as camadas dos DPRs com força constante (65 N) e digitalizadas (64 varreduras) com uma resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$ . As análises foram efetuadas através de uma metodologia validada para materiais poliméricos com aditivos (Su-Velez et al., 2020). Os resultados foram analisados com o software Spectrum 10.

##### *Medições de ângulo de contacto*

As amostras (com forma retangular,  $6 \times 4\text{ cm}^2$ ) foram analisadas quanto aos ângulos de contacto da água (OCA 20, Dataphysics Instruments GmbH, Filderstadt, Alemanha), seguindo o método de gota séssil (Tsai, 2020). Os ângulos estáticos de contacto da água foram medidos à temperatura ambiente ( $18 \pm 2\text{ °C}$ ) usando gotas de  $10\text{ }\mu\text{L}$  de água ultrapura. Os valores do ângulo de contacto foram calculados pelo método de Laplace-Young (software SCA 20).

### *Taxas de Transmissão de Vapor de Água (TTVA)*

As taxas de transmissão de vapor de água (TTVA) foram determinadas de acordo com a Norma Internacional ASTM E96-90 (copo invertido, método D), com algumas modificações. Amostras circulares (1 cm diâmetro) obtidas de DPRs completos (todas as camadas) foram colocadas como uma membrana de permeação entre uma atmosfera de 95% de HR (gerada por uma solução aquosa saturada de sulfato de potássio) e uma amostra de gel de sílica seca contida num frasco de vidro (aproximadamente 0,2 g, evitando a saturação antes de 100 h de teste). As medições de permeação de vapor de água foram realizadas considerando duas direções de fluxo: (i) da camada externa para a camada interna do DPR para simular o fluxo da atmosfera para o utilizador (i.e., potencial contaminação ambiental para o utilizador); e (ii) da camada interna para a camada externa do DPR para simular o fluxo do utilizador para a atmosfera (i.e., respiração/tosse do utilizador). A massa de vapor de água permeada por cada DPR (em ambas as direções de fluxo) foi medida e correlacionada até 24 h. Os valores de TTVA foram calculados de acordo com a seguinte equação:

$$WVTR = \frac{m}{A \times \Delta t} \quad (3)$$

onde,  $m$  (g) é a massa de vapor de água permeado durante o período de tempo  $\Delta t$  (h) e  $A$  ( $\text{cm}^2$ ) representa a área efetiva de transferência.

### *Análise Termogravimétrica (ATG)*

As análises foram realizadas em amostras (aproximadamente 8 mg) de DPRs usando um analisador termogravimétrico (Q500, TA Instruments, Grimsby, ON, Canadá). As amostras foram aquecidas de 25 °C a 600 °C (a 10 °C/min) sob uma atmosfera inerte de azoto seco ( $100 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ). As temperaturas de degradação foram definidas como as temperaturas

iniciais extrapoladas, de acordo com a norma ISO 11358-1. Os resultados foram tratados com o software Universal Analysis 2000 (TA Instruments).

#### *Calorimetria Exploratória Diferencial Modulada (CEDM)*

Todas as camadas constituintes dos DPRs foram analisadas quanto aos seus fenômenos térmicos (temperaturas de fusão e cristalização) usando um calorímetro diferencial de varrimento (Q100, TA Instruments, Canadá) em modo modulado ( $\pm 0.64$  °C a cada 60 s). As amostras (aproximadamente 8 mg) foram seladas hermeticamente em cadinhos de alumínio e: (i) aquecidas de -80 °C a 200 °C a 10 °C/min (para camadas com PP); (ii) aquecidas de 0 °C a 350 °C, arrefecidos a 0 °C e reauecidos até 350 °C, sempre a uma taxa de 10 °C/min (para camadas com PET). Todas as amostras foram analisadas sob uma atmosfera inerte de azoto seco ( $50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ). Os resultados foram tratados com o software Universal Analysis 2000 (TA Instruments).

#### *Porosimetria por Intrusão de Mercúrio (PIM)*

Os valores médios de porosidade e tamanho médio dos poros dos DPRs (todas as camadas) foram determinados por porosimetria por intrusão de mercúrio (Autopore IV 9500, Micromeritics, Norcross, GA, USA). As experiências foram realizadas de acordo com a metodologia definida na norma ISO 15901-1:2016.

#### *Microscopia ótica e eletrônica*

Todas as camadas constituintes dos DPRs estudados (para amostras não tratadas) foram preliminarmente analisadas por microscopia ótica, usando um microscópio digital (X000PGOALR, Jiusion, 800x, China). Posteriormente, todos os DPRs (todas as camadas) foram analisados por Microscopia Eletrônica de Varrimento com Emissão de Campo (SEM-

FEG) (Merlin, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). As amostras dos DPRs foram revestidas com ouro por pulverização durante 15 s (cerca de 4 nm de espessura) e analisadas (a 2 kV) em várias ampliações (principalmente 62x a 2500x).

#### 4.2.6 Análises de dados e estatísticas

O software JMP-PRO (versão 15.0) (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA) foi usado para visualizar e realizar a análise estatística. As diferenças entre ciclos de tratamento para cada metodologia foram avaliadas com um teste não paramétrico. O teste Kruskal–Wallis bidirecional baseado em classificação foi aplicado às experiências sobre eficiência de filtração, permeabilidade ao ar e caracterização físico-química. Quanto às análises dos ensaios microbiológicos, as análises estatísticas das diferenças entre os grupos de máscaras inoculadas tratadas e não tratadas foram realizadas usando o software GraphPad Prism 6 (Graph-Pad Software, San Diego, CA, EUA). A comparação entre diferentes ciclos de tratamento do mesmo tipo de máscara também foi realizada com o mesmo software. Os valores de  $p$  (valores- $p$ ) foram calculados usando um teste T de amostras independentes (para comparar cada tratamento de interesse com o controlo), onde foi adotada a seguinte anotação: \*\*, \*\*\*, \*\*\*\* significa uma diferença estatisticamente significativa do controlo, em níveis de significância 0,01; 0,001 e 0,0001, respetivamente; “ns” representa uma diferença não significativa a um nível de significância de 0,05 (valor- $p > 0,05$ ).

### 4.3 Resultados e discussão

#### 4.3.1 Avaliação da eficácia microbiológica

Todos os procedimentos de descontaminação resultaram na redução de UFC quando comparado com os ensaios controlo, para todos os três níveis de ciclos de tratamento (1c, 5c, 10c) (Figura 4.1). O peróxido de hidrogénio nebulizado reduziu o indicador microbiológico inoculado de 4 a 5 ordens de grandeza nas máscaras de pano, e em mais de 6 ordens de

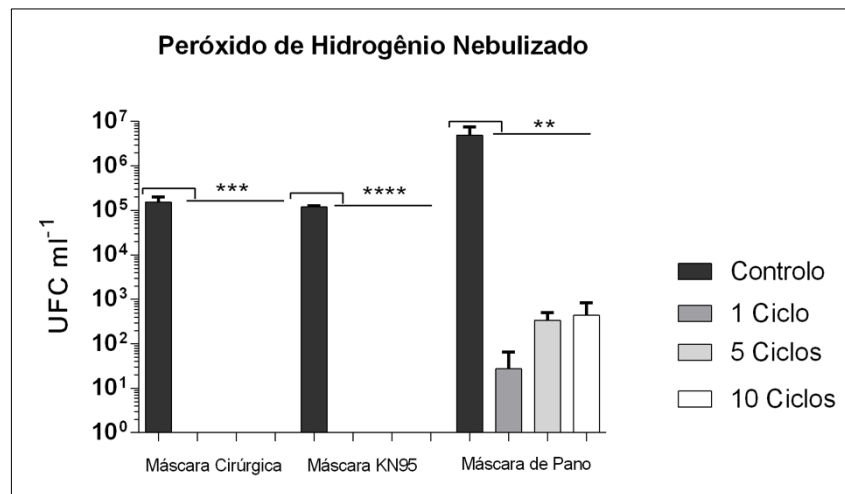
grandeza nas máscaras cirúrgicas e KN95 após os ciclos de tratamento. Portanto, o tratamento com peróxido de hidrogénio nebulizado resultou efetivamente numa redução significativa das UFCs recuperadas em comparação às UFCs obtidas das máscaras não tratadas (controlo), para todos os tipos de DPRs (Figura 4.1A).

A descontaminação por imersão em lixívia comercial reduziu de 7 e 5 a 6 ordens de grandeza, o total de endósporos inoculados nas máscaras cirúrgicas e KN95, respetivamente. A análise estatística dos resultados mostrou significância elevada (valor- $p < 0.0001$ ) para máscaras cirúrgicas e KN95. Os ciclos de tratamento realizados em máscaras de pano não apresentaram uma redução estatisticamente significativa de UFCs recuperadas (valor- $p = 0.1188$ ) comparativamente aos controlos (Figura 4.1B).

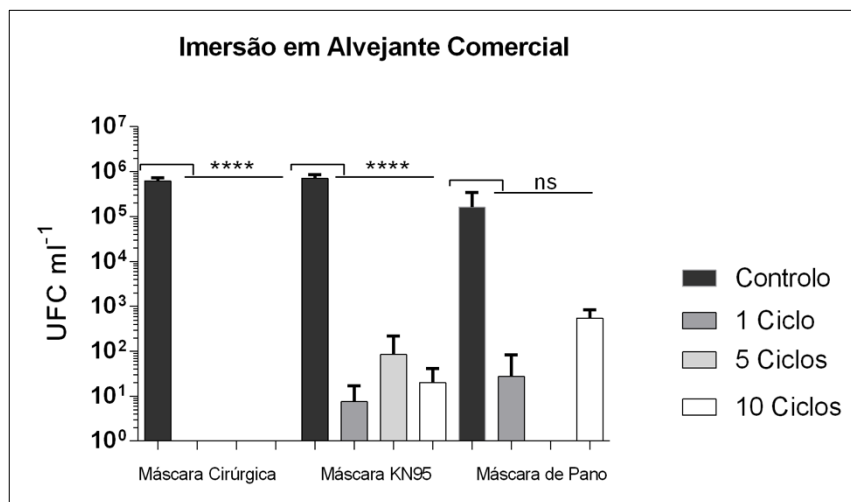
O tratamento por contacto com vapor gerado por micro-ondas reduziu as UFCs de máscaras KN95 e de pano em 5 ordens de grandeza, no geral. Por sua vez, este procedimento reduziu as UFCs em máscaras cirúrgicas em 4 ordens de grandeza para 1c e em 6 ordens de grandeza para 5c e 10c (Figura 4.1C).

O processo de inativação com peróxido de hidrogénio nebulizado foi 100% eficiente nas máscaras KN95, levando a uma redução de 6 ordens de grandeza, mas mostrou uma eficiência mais baixa para a descontaminação das máscaras de pano. A inativação com lixívia comercial resultou na redução de mais de 6 ordens de grandeza para todas as máscaras cirúrgicas, mas tem uma eficiência de 78% e 67% para as máscaras KN95 e de pano analisadas, respetivamente. A inativação por vapor gerado por micro-ondas demonstrou ser um processo de descontaminação muito eficiente para todas as máscaras KN95. Contudo, em 66% das máscaras cirúrgicas e em 55% das máscaras de pano, a inativação dos endósporos não foi completa.

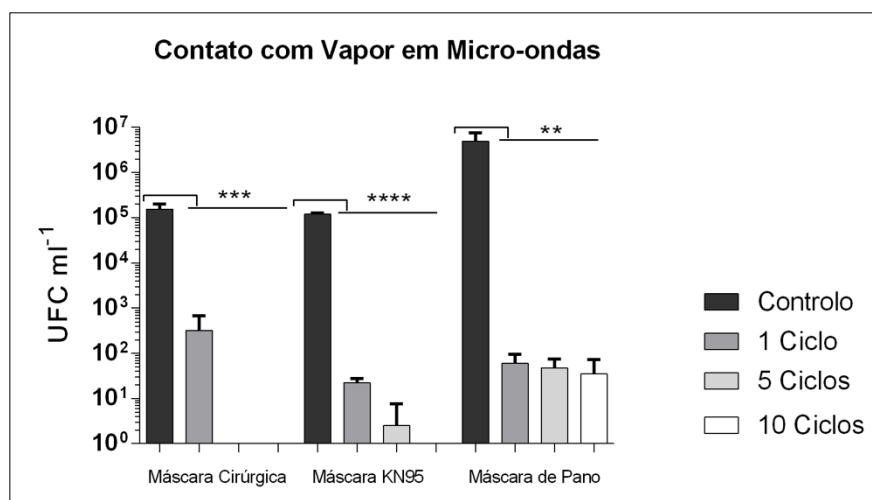




(A)



(B)



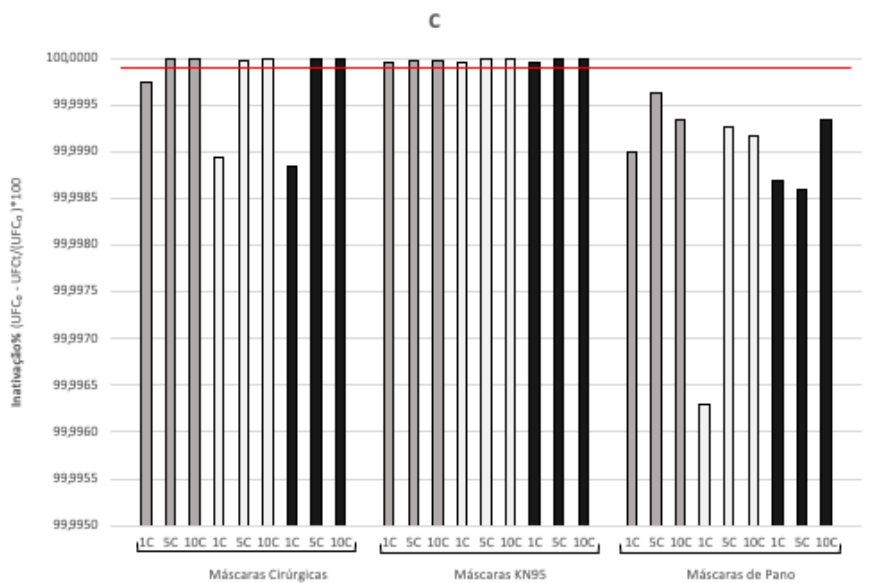
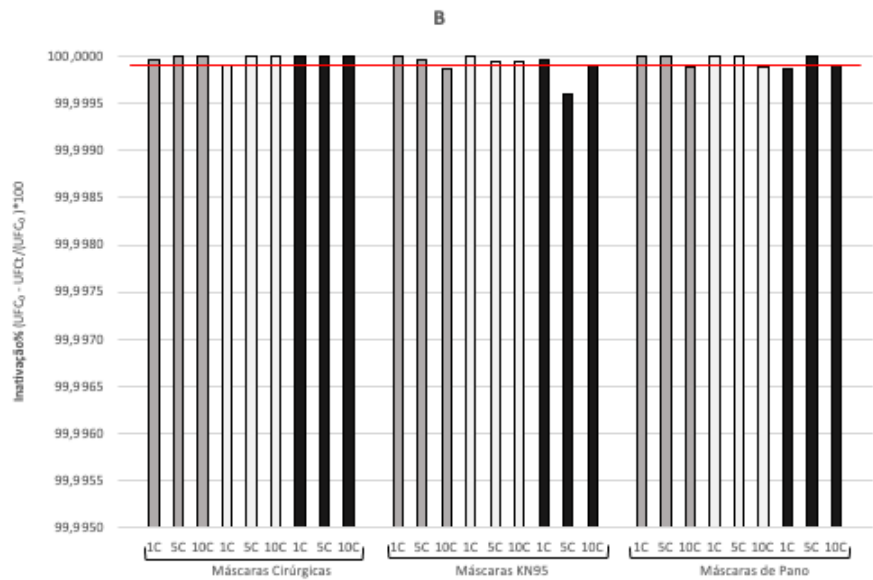
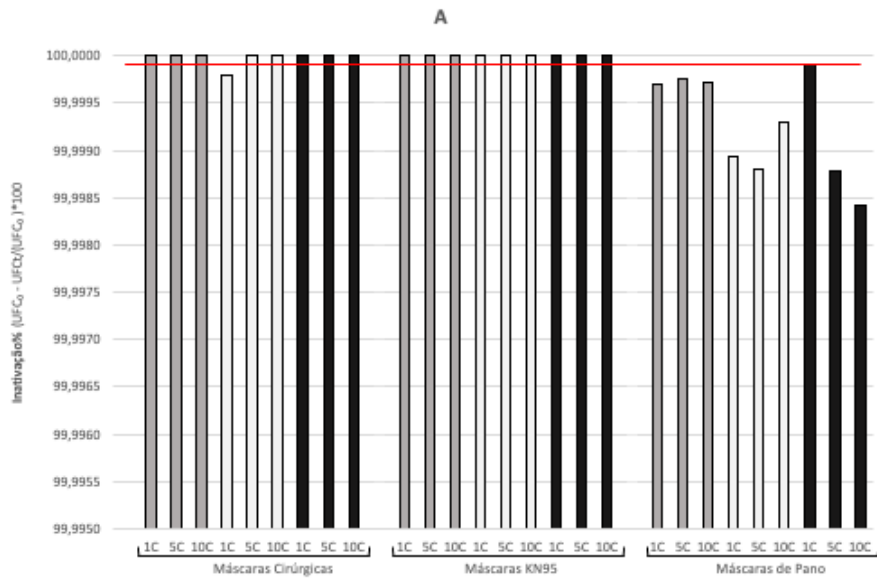
(C)

**Figura 4.1 Descontaminação de três tipos de DPR usando diferentes procedimentos: peróxido de hidrogênio nebulizado (A), imersão em lixívia comercial (B) e contacto com**

**vapor gerado por micro-ondas (C).** Máscaras cirúrgicas, KN95 e de pano foram inoculadas com suspensão de endósporos indicador com aproximadamente  $10^7$  endósporos  $\text{mL}^{-1}$ . Após os ciclos de tratamento (1c, 5c e 10c), a sobrevivência dos endósporos foi avaliada por plaqueamento. Os DPRs não tratados foram incluídos como controlos em todos os ensaios. Os dados apresentados são os valores médios ( $\pm$  desvio padrão) obtidos de três ou quatro réplicas. Ns – não significativamente diferente, \*\*, \*\*\*, \*\*\*\* simbolizam diferença estatisticamente significativas em relação ao controlo, com níveis de significância de 0.01, 0.001 e 0.0001, respetivamente.

Face à variação nos resultados obtidos consoante o DPR usado, não foi possível relacionar claramente o número de endósporos inoculados com maior ou menor eficiência do tratamento. No entanto, no geral, o número de ciclos da descontaminação afetou a eficiência das máscaras, tendo na maioria das vezes diminuído a eficiência das máscaras de pano. A eficiência da descontaminação deste tipo de máscaras variou ainda de acordo com o número de endósporos inoculados, o número de ciclos de desinfecção e a técnica utilizada.

Os tratamentos com peróxido de hidrogénio nebulizado resultaram na maior redução de UFCs recuperadas nas máscaras testadas, apresentando a maior eficácia de descontaminação. Outros estudos também referem que este procedimento apresenta várias vantagens na manipulação e uso (Bessesen et al., 2015; Kampf et al., 2020; Pascoe et al., 2020; Rubio-Romero et al., 2020). As máscaras cirúrgicas e KN95 mostraram total inativação do indicador microbiológico, de acordo com a norma ISO 14937 (Figura 4.2A).



**Figura 4.2 Eficácia da inativação dos endósporos usando três diferentes suspensões de número de endósporos ( $10^7$  (barras pretas),  $10^8$  (barras cinzentas) e  $10^9$  (barras brancas) pelos três processos de descontaminação para máscaras cirúrgicas, KN95 e de pano: peróxido de hidrogénio nebulizado (A), imersão em lixívia comercial (B) e contacto com vapor gerado por micro-ondas (C). A linha vermelha indica a Eficácia Padrão estabelecida na norma ISO 14937 (correspondente à redução de seis ordens de grandeza nas UFCs). Os valores de inativação foram obtidos através da razão entre a diferença das UFCs inoculadas e das UFCs recuperadas após o tratamento e as UFCs totais inoculadas.**

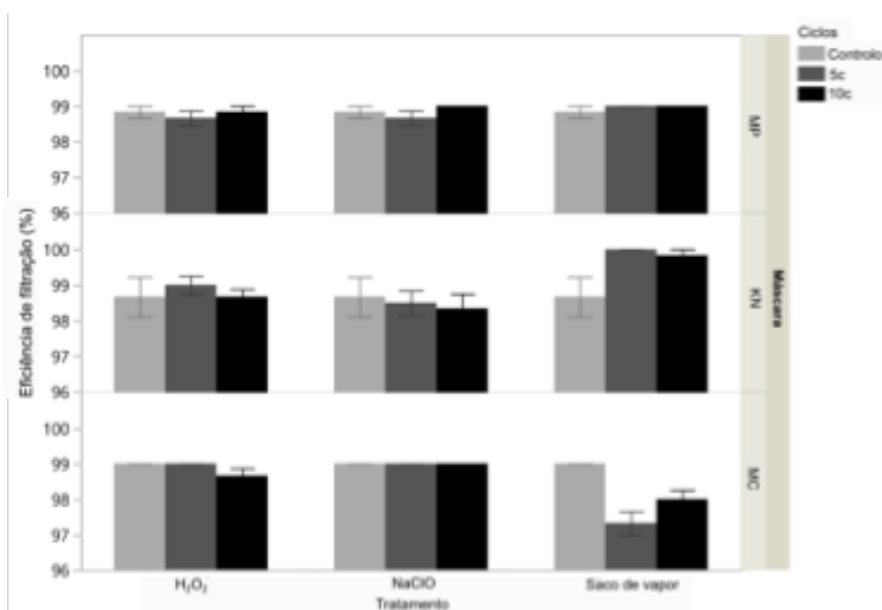
A segunda melhor estratégia de descontaminação em termos de eficácia de descontaminação microbiológica foi a imersão em lixívia comercial (Figura 4.2B), o que levou a uma eficiência de 99.9999% e 99.9990% para máscaras cirúrgicas e KN95, respetivamente (valor- $p < 0.0001$ ). Apesar da alta eficácia demonstrada nestes dois tipos de máscaras, apenas as máscaras cirúrgicas atingiram a meta de esterilização da norma ISO. A análise estatística dos tratamentos realizados em máscaras de pano não mostrou significância relativamente ao controlo, embora a eficácia geral da descontaminação dessa técnica tenha sido de 99.999%. Contudo, o tratamento por imersão em lixívia comercial apresenta algumas limitações, tais como o intervalo de concentrações de hipoclorito de sódio na lixívia comercial disponível no mercado e a dependência do tempo após a primeira utilização. Estes fatores precisam ser levados em consideração para garantir uma descontaminação eficiente e reprodutível (Eun et al., 2021; Pascoe et al., 2020).

A análise estatística realizada para todos os DPRs em contacto com vapor gerado por micro-ondas levou a uma redução significativa no número de UFCs. As máscaras KN95 obtiveram um alto grau de significância (valor- $p < 0.0001$ ), resultado confirmado pela análise da eficiência de todos os ciclos de tratamento. O processo atingiu a redução de 6 ordens de grandeza para máscaras KN95, o que corresponde a uma eficiência de inativação de 99.9999%, que significa que pode ser considerada eficaz, seguindo o critério de Eficácia Padrão estabelecido pela norma ISO 14937:2000 (Figura 4.2C). A descontaminação por

vapor gerado por micro-ondas de máscaras cirúrgicas (exceto para 1c) e de pano apresentou uma redução entre 4 e 5 ordens de grandeza. Trabalhos similares publicados consideraram a capacidade do vapor gerado pelo micro-ondas como efetiva, com a redução do número de microrganismos em cerca de 4-6 log (Parlin et al., 2020; Zulauf et al., 2020).

#### 4.3.2 Efeitos dos tratamentos na eficiência da filtração

O impacto dos diferentes tratamentos na eficiência de filtração das máscaras foi menor para as máscaras de pano testadas, que mantiveram um EFP próximo de 99% com pequenos impactos decorrentes do número de ciclos de descontaminação, que na maioria dos casos não são estatisticamente significativos (Figura 4.3, Tabela 4.1). A eficiência de filtração das máscaras KN95 apresentou maior variabilidade ao longo dos ciclos, mas ainda manteve um nível médio de 98% de eficiência ou mesmo acima desta linha de referência, como aconteceu para vários ciclos de descontaminação usando sacos de vapor, apresentado diferenças significativas relativamente ao controlo (baixo valor-*p* para o teste de Kruskal–Wallis – 0.0067). Os efeitos dos ciclos de tratamento ao usar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e NaClO foram comparativamente menores e sem significância estatística (Tabela 4.1). A eficiência de filtração das máscaras cirúrgicas não foi essencialmente afetada pelo número de ciclos aplicados para o tratamento com NaClO e pareceu sofrer apenas uma pequena e não significativa redução média para um maior número de ciclos de tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (valor-*p* = 0.1194). Contudo, uma redução estatisticamente significativa na eficiência das máscaras cirúrgicas foi observada quando foram usados sacos de vapor, tendo-se registado um decréscimo de 1-2% na eficiência.



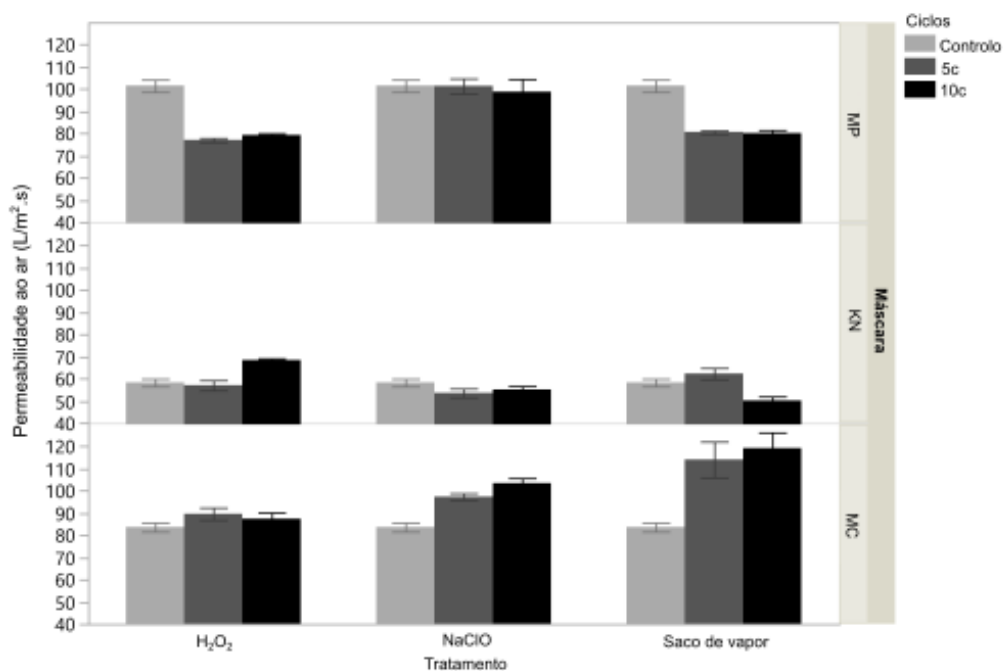
**Figura 4.3** Resultados experimentais obtidos para a eficiência de filtração, estratificada de acordo com o tipo de máscara (MP, KN, MC) e tratamento de descontaminação (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NaClO, Saco de Vapor). Cada barra corresponde à média de todas as medidas obtidas para cada nível de ciclos (6 réplicas); as barras de erro representam o erro padrão da média.

**Tabela 4.1** Análise unidirecional da eficiência de filtração (Kruskal–Wallis não paramétrico bicaudal usando classificações). Este teste estatístico foi realizado para cada combinação de DPR (MP, KN, MC) e tratamento de descontaminação (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NaClO, Saco de Vapor), i.e., num total de 9 casos distintos. A tabela apresenta o valor-*p* obtido em cada caso, comparando os resultados obtidos em diferentes ciclos (controlo, 5c, 10c); as condições nos dados da tabela seguem o mesmo padrão da Figura 4.3. O software usado foi o JMP® PRO versão 15.0 (SAS Institute Inc.). As diferenças estatisticamente significativas (nível de significância de 5%) são sinalizadas com um asterisco (\*).

Máscara/Tratamento	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	NaClO	Saco de Vapor
MP	0.7382	0.3220	0.3679
KN	0.5968	0.5750	0.0067*
MC	0.1194	1.000	0.0024*

### 4.3.3 Testes de permeabilidade ao ar

Os níveis base de permeabilidade ao ar (para as réplicas controlo) foram bastante diferentes para os diferentes tipos de máscara (Figura 4.4). As máscaras de pano apresentaram maior permeabilidade, seguidas pelas máscaras cirúrgicas, enquanto as máscaras KN95 apresentaram o menor nível de permeabilidade. O tratamento com NaClO exerceu baixo impacto na permeabilidade das máscaras de pano e KN95, sem significância estatística (Tabela 4.2). Ainda que este tratamento tenha levado a um aumento progressivo da permeabilidade ao ar das máscaras cirúrgicas, a sua eficiência de filtração manteve-se (Tabela 4.2). A permeabilidade ao ar após descontaminação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tendeu a diminuir para todas as máscaras de pano, mas aumentou para as máscaras KN95 submetidas a 5 ciclos de tratamento. As máscaras cirúrgicas foram as menos afetadas pelos tratamentos com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os sacos de vapor mostraram um impacto significativo na permeabilidade ao ar das máscaras: aumentando para as máscaras cirúrgicas (como aconteceu com o uso de NaClO) e diminuindo para as máscaras de pano. As máscaras KN95 também foram afetadas, mas apenas por um maior número de ciclos de contacto com o vapor, diminuindo a permeabilidade ao ar. Em geral, os tratamentos tenderam a aumentar a permeabilidade ao ar das máscaras cirúrgicas (NaClO e sacos de vapor). No entanto, no caso das máscaras de pano, a permeabilidade ao ar tendeu a diminuir com o aumento do número de ciclos de tratamento (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e sacos de vapor). Estas observações podem ser explicadas, pela deterioração progressiva da matriz no caso das máscaras cirúrgicas e colapso progressivo do tecido no caso das máscaras de pano. O comportamento das máscaras KN95 foi mais variável pois registou aumento e redução na permeabilidade ao ar nos tratamentos com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e sacos de vapor, respetivamente.



**Figura 4.4** Resultados experimentais obtidos para a permeabilidade ao ar, estratificada de acordo com o tipo de máscara (MP, KN, MC) e tratamento de descontaminação (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NaClO, Saco de Vapor). Cada barra corresponde à média de todas as medidas obtidas para cada nível de ciclos (6 réplicas); as barras de erro representam o erro padrão da média.

**Tabela 4.2** Análise unidirecional da permeabilidade ao ar (Kruskal–Wallis não paramétrico, bicaudal usando classificações). Este teste estatístico foi realizado para cada combinação de DPR (MP, KN, MC) e tratamento de descontaminação (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NaClO, Saco de Vapor), i.e., num total de 9 casos distintos. A tabela apresenta o valor-*p* obtido em cada caso, comparando os resultados obtidos em diferentes ciclos (controlo, 5c, 10c); as condições nos dados da tabela seguem o mesmo padrão da Figura 4.4. O software usado foi o JMP® PRO versão 15.0 do SAS Institute Inc.). As diferenças estatisticamente significativas (nível de significância de 5%) são sinalizadas com um asterisco (\*).

Máscara/Tratamento	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	NaClO	Saco de Vapor
MP	0.0014 *	0.5792	0.0033 *
KN	0.0030 *	0.1447	0.0041 *
MC	0.2501	0.0014 *	0.96



#### 4.3.4 Efeitos dos tratamentos nas propriedades físico-químicas e estruturas dos DPRs

##### *Análise EITF-RTA*

Os resultados do EITF-RTA (Figura S2, Tabela S1) confirmaram que todas as camadas de DPRs testadas correspondem às informações dos fornecedores relativamente às suas composições químicas. Os dados obtidos pela análise EITF-RTA foram igualmente confirmados após pesquisa em bibliotecas de bases de dados (e.g., *HR Nicolet Sampler Library*, *Cross Sections Wizard* e *Hummel Polymer Sample Library*). Os resultados mostraram que, aparentemente, não ocorreu qualquer alteração química nas superfícies de todas as camadas constituintes dos DPRs estudados, como resultado dos procedimentos de descontaminação e ciclos de tratamentos aplicados. Apenas pequenas variações foram observadas nos comprimentos de onda dos picos correspondentes aos grupos químicos de PP e PET (Tabela S1) considerando a resolução aplicada do EITF-RTA ( $4 \text{ cm}^{-1}$ ). Adicionalmente, nenhuma banda de absorção adicional após a aplicação dos procedimentos e ciclos de tratamento foi detetada, o que pode, eventualmente, dever-se a quaisquer novas substâncias que tenham sido produzidas por potenciais reações de degradação química.

##### *Medições de ângulo de contacto*

A hidrofobicidade da superfície dos materiais das camadas dos DPRs, especialmente nas suas camadas externas, desempenha um papel crítico na capacidade de bloquear gotículas líquidas que contenham microrganismos transportados pelo ar (Bhardwaj & Agrawal, 2020; Tcharkhtchi et al., 2021; Ullah et al., 2020). A Tabela S2 mostra que todos os ângulos de contacto medidos para as camadas distintas de todas as máscaras não processadas (controlo) foram bastante superiores a  $90^\circ$ , entre  $115.4^\circ$  e  $151.3^\circ$  para camadas à base de PP e  $132.9^\circ$  para camadas à base de PET. Estes dados indicam que, como esperado, todos os materiais das camadas aplicados nestes DPRs apresentavam originalmente uma elevada natureza

hidrofóbica (Bhardwaj & Agrawal, 2020; De Felice et al., 2022; De-la-Torre et al., 2021; Wibisono et al., 2020).

A comparação com os DPRs não controlo/não processados mostrou que as três metodologias de descontaminação utilizadas, para 10 ciclos de tratamento, originaram algumas mudanças nos valores medidos do ângulo de contacto com a água. Em termos gerais, estas variações foram tipicamente um aumento dos valores do ângulo de contacto para as distintas camadas de MC e MP (todas constituídas por PP e PET), o que normalmente é uma boa característica, e uma diminuição destes valores para as distintas camadas de máscaras KN (todas de PP). Contudo, a análise estatística indicou que apenas as alterações observadas para as camadas distintas das máscaras KN95 (resultantes de todos os tratamentos de descontaminação aplicados) e as alterações promovidas pelo método do saco de vapor (para todas as camadas de todos os DPRs testados) foram consideradas estatisticamente significativas (valor- $p < 0.05$ ). Assim, pudemos concluir que o ângulo de contacto, e consequentemente a molhabilidade, dos diferentes materiais das camadas das máscaras KN95 foram mais suscetíveis de serem afetados por todos os processos de tratamento de descontaminação aplicados (nomeadamente nas suas camadas interna e intermédia), e estes efeitos aparentaram ser mais pronunciados para os tratamentos com  $H_2O_2$  e  $NaClO$ . Por outro lado, entre todos os tratamentos aplicados, o método do saco de vapor conduziu a variações estatisticamente mais significativas nos valores do ângulo de contacto (valor- $p < 0.05$ ), nomeadamente para todos os materiais das camadas constituintes das máscaras KN e MP. Como os resultados do EITF-RTA não mostraram qualquer modificação/degradação química dos materiais constituintes das camadas, as alterações observadas nos valores do ângulo de contacto podem decorrer de algumas alterações físicas e/ou morfológicas pouco claras induzidas nos materiais das camadas pelos métodos de processamento (e.g., lixiviação de nano e microfibras, absorção/dessorção de água/vapor, procedimentos de secagem, variação da superfície das

cargas eletrostáticas da superfície, variação de temperatura, extração de aditivos de processamento específicos – por exemplo, repelentes, plastificantes), pela manipulação das amostras (e.g., forças/stresses durante o manuseamento das amostras que podem afetar a sua morfologia) ou pelo processo de preparação das amostras (e.g., a heterogeneidade dos materiais das camadas dos DPRs – em termos de densidade, porosidade, rugosidade e organização da fibra) (Charvet et al., 2022; Ju et al., 2021; K. P. Lee et al., 2020; Purdy, 2019).

#### *Taxas de Transmissão de Vapor de Água (TTVA)*

Além da segurança e das preocupações biológicas, as taxas de transmissão de vapor de água (TTVA), juntamente com a queda da pressão no DPR e a temperatura e humidade relativa dentro das máscaras, são aspetos importantes das propriedades funcionais relacionadas à respiração e ao conforto desses tipos de dispositivos médicos (Aragaw, 2020; Aragaw & Mekonnen, 2021; Ullah et al., 2020; Yang et al., 2017).

Os resultados das TTVA são apresentados na Figura S3 e na Tabela S3. Tal como o ocorrido com os resultados do ângulo de contacto, após 10 ciclos de tratamento, ocorreram algumas alterações nos valores de TTVA nas máscaras MC e KN, em geral, a maior parte dos tratamentos de descontaminação mantiveram ou aumentaram ligeiramente o TTVA (para ambas as direções do fluxo). Além disso, o tratamento com NaClO afetou mais as máscaras MC, aumentando a sua TTVA. O tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> afetou as máscaras KN mais extensivamente, aumentando ligeiramente a TTVA, em ambas as direções do fluxo; para o tratamento com saco de vapor, este tratamento diminuiu a TTVA no caso do fluxo do utilizador para a atmosfera e aumentou a TTVA para o fluxo da atmosfera para o utilizador. Finalmente, para máscaras MP observou-se que os tratamentos com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e NaClO diminuíram os valores de TTVA (para ambas as direções de fluxo), enquanto o tratamento

com saco de vapor diminuiu ou aumentou ligeiramente a TTVA para o fluxo da atmosfera para o utilizador ou o fluxo do utilizador para a atmosfera, respetivamente. No entanto, a partir da análise estatística (Tabela S3) dos resultados de TTVA, essas diferenças não foram consideradas estatisticamente significativas (todos os valores- $p > 0.05$ ), provavelmente devido ao baixo número de réplicas usadas.

#### *Análise Termogravimétrica (ATG)*

As análises termogravimétricas (ATG) das distintas camadas de DPRs não processados (controlo) foram realizadas principalmente para detetar possíveis diferenças químicas ou físicas entre camadas de PP e PET, bem como para determinar as condições analíticas a serem aplicadas posteriormente nos testes de CEDM (ver Tabela S4). Os resultados da ATG mostraram que as temperaturas de degradação térmica ocorrem entre 437,4 °C e 438,6 °C (para as camadas de tecido não tecido de PP nas máscaras MC, KN e MP), 438,6 °C (para as camadas não tecido de PP fundidas em máscaras MC), 372 °C (para o não tecido de algodão PP fundido com tratamento para propriedades de eletreto em máscaras KN) e 403,2 °C (para ambas as camadas de tecido PET em máscaras MP). Estes valores estão dentro dos intervalos normalmente encontrados na literatura para estes tipos de materiais/produtos (Arik et al., 2013; Battezzore et al., 2020; Larsen et al., 2021; Majewsky et al., 2016; A. P. D. S. Pereira et al., 2017; Suzuki et al., 2005; Üreyen & Kaynak, 2019). Uma concordância semelhante com a literatura foi também observada para as cinzas/massas residuais obtidas a 595 °C para os três tipos de materiais das camadas dos DPRs. Observou-se que as camadas à base de PET produziram quantidades muito maiores de cinzas/resíduos do que as camadas à base de PP (15-16%), o que certamente se deveu às diferentes reações de oxidação térmica envolvidas em cada caso, ou à presença de aditivos de processamento de base inorgânica (e.g., pigmentos e retardadores de chamas – que são bastante comuns em tecidos à base de

PET). Finalmente, a camada interna de PP das máscaras KN degradou-se a temperaturas muito mais baixas (372 °C) e produziu menos cinzas/resíduos do que todas as outras camadas à base de PP presentes nos DPRs estudados. Isto deveu-se, provavelmente, aos diferentes pesos moleculares do PP e a um maior grau de isotaticidade desta camada intermédia de PP fundida (Battezzore et al., 2020).

#### *Calorimetria Exploratória Diferencial de Modulada (CEDM)*

O contacto permanente ou temporário dos materiais das camadas dos DPRs com produtos químicos, água e vapor de água, isoladamente ou em conjunto com a temperatura, como ocorre na aplicação dos tratamentos de descontaminação estudados, pode afetar algumas propriedades termomecânicas dos materiais poliméricos envolvidos (e.g., por sorção e por reações de produtos químicos e água com fibras, por extração/lixiviação de aditivos de processamento/funcionais, ou simplesmente pela indução de modificações de base térmica na organização da cadeia e propriedades de cristalização). A CEDM foi aplicada para obter resultados relativos às temperaturas de fusão e cristalização das diferentes camadas das máscaras MC, KN e MP não processadas (controlo) e processadas (10 ciclos) (Tabela S5).

Os resultados da CEDM mostraram que, após 10 ciclos de tratamento para os tratamentos com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NaClO e sacos de vapor, apenas não foram observadas variações estatisticamente significativas para os valores de temperatura de fusão das camadas originais à base de PP. Os valores estão nos intervalos encontrados na literatura para estes tipos de materiais/produtos à base de PP e PET (Moradi et al., 2022; Nayak et al., 2013; Rodrigues et al., 2018; Wang et al., 2017, 2019).

Para as temperaturas de cristalização, que foram determinadas apenas no caso do DPR contendo camadas à base de PET, não foram observadas alterações relevantes quando utilizados os tratamentos de descontaminação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e saco de vapor. Mais uma vez, as

temperaturas de cristalização obtidas são semelhantes aos valores encontrados na literatura para materiais/produtos de tecido à base de PET (Crilley et al., 2021; Liu et al., 2020; Üreyen & Kaynak, 2019).

No entanto, ao aplicar o tratamento de descontaminação com NaClO, uma variação tangível foi observada nas temperaturas de cristalização das camadas à base de PET de 184.9 °C a 205.6 °C (para a camada externa de tecido PET) e de 193.4 °C a 209.6 °C (para a camada interna de tecido PET). Provavelmente, essa variação ocorreu devido à extração/lixiviação assistida por NaClO de alguns aditivos de processamento que são bastante comuns em tecidos à base de PET (e.g., pigmentos e retardadores, hipótese levantada anteriormente na discussão dos resultados da ATG), alterando assim o volume livre, interações em cadeia e o processo de cristalização. Além disso, o tratamento de descontaminação com NaClO extraiu algumas substâncias da MP uma vez que foi observado a alteração de cor da solução líquida remanescente. Surpreendentemente, a suposta remoção destas substâncias não causou nenhum efeito relevante nas temperaturas de fusão das camadas à base de PET tratadas com NaClO (como também era expectável). Porém, e tal como no caso dos resultados das TTVA, a análise estatística (análise unidirecional e teste de Wilcoxon/Kruskal–Wallis) dos resultados de temperatura de fusão e cristalização (Tabela S6) mostrou que todas as variações de propriedade acima discutidas (Tabela S5) não foram estatisticamente significativas (valor- $p > 0.05$ ), o que pode ser atribuído ao número reduzido de amostras analisadas, que limita a sensibilidade da análise estatística.

#### *Porosimetria por Intrusão de Mercúrio (PIM)*

Conforme supramencionado, os tratamentos de descontaminação estudados podem afetar algumas propriedades morfológicas dos materiais poliméricos, nomeadamente a porosidade, os diâmetros médios dos poros, as densidades e cargas das fibras das distintas camadas que

compõem os DPRs, afetando a segurança, a eficiência e outras propriedades funcionais e de conforto relacionadas a estes tipos de dispositivos de proteção (Aragaw, 2020; Bhardwaj & Agrawal, 2020; De Felice et al., 2022; Üreyen & Kaynak, 2019; Zhang et al., 2018). Neste contexto, os resultados da intrusão de mercúrio (Figura S4) mostraram que, após 10 ciclos de tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NaClO e sacos de vapor, foram observadas apenas variações relativamente pequenas para a porosidade geral (%) e tamanhos médios de poros do DPR original (Tabela S7). Todos estes DPRs incluem várias camadas com morfologias distintas e, portanto, os resultados mostraram que elas apresentam macroporos em diferentes intervalos de porosidade: (i) máscaras MC (0,6 µm; 15 µm; 110 µm); (ii) máscaras KN (0,5 µm; 22 µm; 65 µm); (iii) máscaras MP (0,15 µm; 6 µm; 15 µm; 110 µm). Por esta razão, decidiu-se apresentar os valores médios do tamanho de poro na Figura S4 e Tabela S7. Até à data, ao que sabemos, não foi reportado na literatura qualquer resultado sobre porosidade e tamanho de poros determinado por porosimetria por intrusão de mercúrio para estes tipos de dispositivos médicos. A maioria dos métodos utilizados com este propósito é baseada no uso de técnicas de microscopia e metodologias de análise de imagem. Por esta razão, os resultados deste trabalho não puderam ser comparados com outros dados descritos na literatura.

Finalmente, a análise estatística (análise unidirecional e teste Wilcoxon/Kruskal–Wallis) realizada nestes resultados (Tabela S7) mostrou que todas as mudanças observadas não foram estatisticamente significativas (valor-*p* > 0.05).

#### *Microscopia ótica e eletrônica*

Da análise de todas as micrografias SEM (Figuras S5-S7), não pudemos observar e/ou concluir quaisquer alterações relevantes que possam ter ocorrido nas morfologias superficiais das fibras PP/PET (que compõem a camada externa dos DPRs estudados) e que foram

originados pelos tratamentos de descontaminação aplicados. No entanto, o tratamento com NaClO pareceu introduzir pequenas alterações morfológicas nas fibras de superfície de PP (para máscaras MC e KN) e PET (para máscaras MP). Contudo, estas alterações poderão ser artefactos. As imagens de microscopia ótica de todas as camadas de DPR também foram recolhidas e analisadas, levando a observações semelhantes.





## **Capítulo V: Considerações Finais**



## Considerações finais

A ocorrência de microrganismos ESKAPE em equipamentos e superfícies não críticas do ambiente hospitalar é uma realidade que reforça a importância da monitorização microbiológica como parte integrante da rotina hospitalar. Essa abordagem é crucial para o controlo e prevenção eficaz das infeções associadas aos cuidados em saúde.

A persistência de reservatórios de microrganismos ESKAPE em equipamentos e superfícies não críticas do hospital representa um potencial vetor na propagação de IACS quando os profissionais de saúde e outros tocam as superfícies, contaminando as mãos. Neste sentido, existe a necessidade de conhecer a carga microbiana das diversas superfícies hospitalares e determinar índices microbiológicos e estipular limites. A aplicação de índices microbiológicos representará uma ferramenta de monitorização e controlo de qualidade nos hospitais, uma vez que coloca em evidência os locais que necessitam ser priorizados com protocolos de desinfeção e prevenção às IACS. A carga microbiana, determinada como o número de microrganismos cultiváveis presentes, poderá ser um indicativo de um local com potencial capacidade para a propagação de um surto.

Este trabalho mostrou que a enfermaria da Cardiologia ao apresentar maior carga microbiana nos equipamentos e superfícies não críticas amostradas, deve ser considerada como prioritária para avaliação do processo de limpeza e desinfeção com a possível adoção de protocolos mais eficazes de desinfeção.

No nosso estudo, as contagens totais de UFC/cm<sup>2</sup> de microrganismos aeróbios indicaram os locais correspondentes aos principais reservatórios de microrganismos como sendo: a cadeira de apoio ao banho, a parte interna da mangueira do chuveiro e a parte interna do dispersor do chuveiro na Cardiologia; a parte interna da mangueira do chuveiro, a torneira do lavatório do quarto e a cadeira de apoio ao banho na Pneumologia; a torneira

da sala de enfermagem, a parte interna da mangueira do chuveiro e o chuveiro da casa de banho na Hematologia.

Os equipamentos que apresentaram maiores contagens de UFCs/cm<sup>2</sup> nas três enfermarias estão concentrados em áreas húmidas, os quais são locais propícios à criação de reservatórios de microrganismos. Esta condição favorece a disseminação desses agentes patogénicos, contribuindo para o seu trajeto de dispersão. Um padrão consistente de colonização das zonas húmidas foi observado ao comparar os equipamentos e superfícies não críticas do mesmo hospital em períodos diferentes, indicando uma recorrência na formação desses reservatórios ao longo do tempo no mesmo hospital.

Este estudo mostrou ainda que a enfermaria da Cardiologia apresentou maior diversidade de microrganismos indicadores de infeção e a Pneumologia apresentou maiores ocorrências de UFC/cm<sup>2</sup> do patógeno nosocomial *P. aeruginosa*. Estes resultados não devem ser ignorados e apontam para a necessidade de implementar intervenções de controlo dos microrganismos responsáveis pelas IACS.

As estirpes de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* isoladas durante este estudo foram suscetíveis à maioria dos antibióticos de uso clínico. O baixo número de *K. pneumoniae*, apenas duas estirpes recuperadas dos equipamentos e superfícies hospitalares não críticas não permitiu a aplicação de testes que confirmassem a sua origem. Por outro lado, atendendo ao número de estirpes isoladas, foi possível discutir a dispersão das estirpes de *P. aeruginosa*. Foram considerados pontos críticos de dispersão destas bactérias no ambiente hospitalar, os pontos de distribuição de água potável (tubagens, parte interna da mangueira do chuveiro e a parte interna do dispersor do chuveiro).

A colonização de superfícies por estirpes do género *Pseudomonas* é naturalmente potenciada pela sua capacidade em formar biofilme. Dentre as estirpes de *P. aeruginosa* testadas, 97% apresentam capacidade de produção de biofilme. Em relação aos isolados

de *K. pneumoniae*, ambas as estirpes isoladas foram também catalogadas como produtoras de biofilme.

A capacidade em modificar materiais poliméricos é precedida pela capacidade de colonizar estes materiais e também pela capacidade de formação de biofilme. Algumas estirpes de *P. aeruginosa* testadas, sendo a mais promissora a estirpe 440Pi, apresentaram considerável crescimento na presença dos dispositivos médicos, mostrando a capacidade de remover carbono a partir destes materiais, o que poderá resultar na sua degradação. Os dispositivos médicos que registaram maior colonização bacteriana e modificações mais visíveis, através da análise SEM, foram a cânula nasal e o tubo de infusão do soro. O cateter urinário apresentou poucas alterações na sua superfície, após a realização do ensaio dos polímeros; apesar de ter o látex na sua composição e este ser referenciado com potencial para biodegradação. Para além destes testes, torna-se imperativo realizar estudos adicionais para investigar as diferentes etapas do processo de biodegradação, a fim de compreender melhor a interação entre estas estirpes bacterianas e os materiais dos dispositivos médicos.

Neste trabalho, a eficácia microbiológica de três tratamentos de descontaminação foi avaliada em três tipos de máscaras (cirúrgica, pano e KN95), assim como o seu impacto na eficiência de filtração, permeabilidade ao ar e integridade estrutural. Todos os três procedimentos são de implementação simples, relativamente baratos (tanto em termos de custos de capital como de custos operacionais) e podem ser realizados com rapidez. Estes aspetos práticos são fundamentais para a sua ampla aplicação (escalabilidade) e para alavancar uma resposta eficaz a futuras pandemias, onde se preveja a escassez de máscaras e se considere a mitigação do impacto ambiental da sua utilização massiva.

Em relação aos processos de descontaminação dos DPRs, o método que apresentou maior eficácia de descontaminação foi o peróxido de hidrogénio nebulizado. O tratamento

promoveu a desinfecção das máscaras de pano ao reduzir de 4 a 5 ordens de grandeza o indicador microbiológico inoculado e, esterilizou as máscaras cirúrgicas e KN95 ao reduzir 6 ordens de grandeza, após os ciclos de tratamento. A segunda melhor estratégia de descontaminação em eficácia microbiológica foi a imersão em lixívia comercial. O tratamento esterilizou as máscaras cirúrgicas ao reduzir 7 ordens de grandeza o número total dos endósporos utilizados e, promoveu a desinfecção das máscaras KN95 ao reduzir de 5 a 6 ordens de grandeza. Apesar da análise estatística dos resultados mostrar significância baixa para os ciclos de tratamento realizados em máscaras de pano, o método promoveu desinfecção dos dispositivos. O tratamento por contacto com vapor gerado por micro-ondas, no geral, promoveu desinfecção das máscaras cirúrgicas e de pano, ao reduzir o indicador microbiológico em 5 ordens de grandeza e, esterilizou as máscaras KN95. O número de ciclos não teve um efeito significativo na eficiência dos processos de descontaminação em análise.

Relativamente à eficiência de filtração, os ciclos de tratamento, usando qualquer um dos três métodos de descontaminação em análise, não tiveram um impacto estatisticamente significativo, com exceção do uso de sacos de vapor nas máscaras KN95 e cirúrgicas, onde se verificaram diferenças, ainda que estatisticamente significativas, não teve um grande impacto prático, uma vez que a eficiência final foi sempre superior a 97%. Os efeitos dos ciclos de tratamento foram mais visíveis na permeabilidade ao ar nas máscaras cirúrgicas que tenderam a exibir um aumento da permeabilidade ao ar com o aumento do número de ciclos, enquanto as máscaras de pano mostraram tendência oposta. Já as máscaras KN95 seguiram um padrão bastante indefinido, contudo com menor permeabilidade ao ar quando comparada às restantes. Em relação aos valores do ângulo de contato (e, portanto, na molhabilidade), algumas alterações foram detetadas nos materiais das camadas distintas das máscaras KN. Estas alterações podem dever-se a

algumas alterações químicas, físicas e/ou morfológicas induzidas nos materiais das camadas pelos tratamentos de descontaminação ou métodos experimentais, uma vez que os resultados de EITR-RTA não mostraram quaisquer alterações químicas dos materiais das camadas constituintes. Os métodos TTVA/WVTR, ATG/TGA, CEDM/MDSC e SEM não indicaram alterações substanciais após 10 ciclos de tratamentos, apenas apresentando variações estatisticamente não significativas.

Embora os resultados obtidos confirmem o potencial dos métodos, são necessários estudos adicionais, tais como testes de desgaseificação para garantir que os produtos químicos residuais não estejam presentes em níveis potencialmente prejudiciais.

### Perspetivas futuras

A avaliação da presença de microrganismos responsáveis pelas IACS é crucial para garantir a segurança dos utentes, profissionais de saúde e a eficácia dos sistemas de cuidados médicos. A identificação e avaliação dos microrganismos presentes em ambientes hospitalares, equipamentos médicos e nas próprias pessoas envolvidas nos cuidados de saúde são essenciais para prevenir a propagação de infeções.

Os dados apresentados neste estudo sugerem que a monitorização microbiológica é uma estratégia importante a ser considerada no controlo da qualidade ambiental hospitalar. Numa perspetiva futura, mais estudos são necessários para determinar a relação entre a carga microbiológica encontrada nos equipamentos e superfícies não críticas e o risco clínico. Neste sentido, a avaliação sistemática da presença de microrganismos deve ser parte integrante de programas abrangentes de controlo de infeções em instituições de saúde. Adicionalmente, é importante avaliar a carga microbiana em superfícies antes e após as operações de limpeza, a fim de verificar a eficácia dos procedimentos e estabelecer medidas corretivas quando necessário. Essa prática é essencial para garantir



que os ambientes de saúde estejam verdadeiramente livres de agentes patogénicos, reduzindo os riscos de IACS.

A realização de estudos específicos depende do estabelecimento de algumas parcerias, uma vez que em durante a nossa amostragem, o contacto com o utente não foi estabelecido, muito embora seja importante o desenvolvimento de uma investigação que pudesse verificar a relação existente entre as estirpes isoladas de infeções nos utentes e as estirpes amostradas nos equipamentos e superfícies não críticas do hospital.

Os métodos de cultura convencionais apresentam algumas limitações. Existem microrganismos patogénicos que não crescem em meios de cultura, sendo denominados não cultiváveis, embora estejam presentes no ambiente. Para essas situações, é possível realizar a extração do DNA total das amostras obtidas e identificar os seus nucleotídeos por meio da técnica de sequenciamento de nova geração (NGS - do inglês, Next-Generation Sequencing). Assim, é possível comparar os resultados obtidos dos microrganismos cultiváveis com os não cultiváveis.

A identificação das estirpes presentes em ambiente hospitalar, particularmente das estirpes patogénicas destacadas neste estudo, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*, assume uma importância crucial diante do desafio crescente imposto pelas estirpes multirresistentes. Nesse contexto, é fundamental realizar estudos mais abrangentes para diferenciar o perfil de resistência aos antimicrobianos dessas estirpes quando se encontram em biofilme ou em forma planctónica. Além disso, entender as possíveis associações bacterianas que podem surgir durante a formação do biofilme apresenta grande importância. A formação de biofilmes frequentemente envolve interações complexas entre diferentes espécies bacterianas, e a identificação dessas associações pode ajudar nos processos de prevenção e tratamento.

Embora estirpes de *P. aeruginosa* estejam associadas à degradação de polímeros naturais e sintéticos, é necessário aprofundar os estudos para avaliar os determinantes envolvidos no complexo processo de biodegradação. É essencial explorar os fatores que impulsionam a eficácia da *P. aeruginosa* na biodegradação, incluindo seus mecanismos enzimáticos, a influência de condições ambientais específicas, o tempo necessário para o processo e a interação com outros microrganismos presentes no mesmo ambiente. A formação de consórcios microbianos é um aspecto a considerar, pois a interação sinérgica entre diferentes espécies pode desempenhar um papel significativo na eficiência do processo de degradação de materiais. Um melhor entendimento destes processos biológicos não apenas permite o reconhecimento da deterioração de material de uso hospitalar, como também enriquece o conhecimento fundamental acerca da biodegradação de polímeros que poderá abrir portas para a inovação tecnológica em campos relacionados com a biotecnologia e gestão sustentável de resíduos.



## Referências

- Abdel-Rhman, S. H., & Rizk, D. E. (2021). Comparative assessment of different PCR-based typing methods of *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Infection and Drug Resistance*, *14*, 1019–1035. <https://doi.org/10.2147/IDR.S298838>
- Abdulhaq, N., Nawaz, Z., Zahoor, M. A., & Siddique, A. B. (2020). Association of biofilm formation with multi drug resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *EXCLI J*, *19*, 201–208. <https://doi.org/10.17179/excli2019-2049>
- Abou-Dobara, M. I., Deyab, M. A., Elsayy, E. M., & Mohamed, H. H. (2010). Antibiotic susceptibility and genotype patterns of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from urinary tract infected patients. *Polish Journal of Microbiology*, *59*(3), 207–212. <https://doi.org/10.33073/pjm-2010-032>
- Agostini, D. L. da S. (2009). Caracterização dos constituintes do látex e da borracha natural que estimulam a angiogênese. UNESP. <http://hdl.handle.net/11449/94503>
- Albert, H., Davies, D. J. G., Woodson, L. P., & Soper, C. J. (1998). Biological indicators for steam sterilization: Characterization of a rapid biological indicator utilizing *Bacillus stearothermophilus* spore-associated alpha-glucosidase enzyme. *Journal of Applied Microbiology*, *85*(5), 865–874. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00607.x>
- Aleem, M., Azeem, A. R., Rahmatullah, S., Vohra, S., Nasir, S., & Andleeb, S. (2021). Prevalence of Bacteria and Antimicrobial Resistance Genes in Hospital Water and Surfaces. *Cureus*, *13*(10), 1–10. <https://doi.org/10.7759/cureus.18738>
- Ali Shah, A., Hasan, F., Shah, Z., Kanwal, N., & Zeb, S. (2013). Biodegradation of natural and synthetic rubbers: A review. *Intern Biodeter & Biodeg*, *83*, 145–157. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.05.004>
- Allegranzi, B., Stewardson, A., & Pittet, D. (2013). Hand hygiene. *N Engl J Med*, 1–4.
- Allen, H. K., Donato, J., Wang, H. H., Cloud-Hansen, K. A., Davies, J., & Handelsman, J. (2010). Call of the wild: Antibiotic resistance genes in natural environments. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 8, Issue 4, pp. 251–259). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2312>
- Andrade, K. L., Ramlow, H., Floriano, J. F., Acosta, E. D., Fanta, F. L., & Machado, R. A. F. (2022). Latex and natural rubber: recent advances for biomedical applications. *Polímeros*, *32*(2), 1–12. <https://doi.org/10.1590/0104-1428.20210114>
- Aragaw, T. A. (2020). Surgical face masks as a potential source for microplastic pollution in the COVID-19 scenario. *Marine Pollution Bulletin*, *159*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111517>

- Aragaw, T. A., & Mekonnen, B. A. (2021). Current plastics pollution threats due to COVID-19 and its possible mitigation techniques: a waste-to-energy conversion via Pyrolysis. *Environmental Systems Research*, *10*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s40068-020-00217-x>
- Arik, B., Bozaci, E., Demir, A., & Özdoğan, E. (2013). Thermogravimetric, microscopic and mechanical analyses of PBT and PET. *TEKSTİL ve KONFEKSİYON*, *23*(2), 101–103.
- Arnold, C. (2014). Rethinking Sterile: The Hospital Microbiome. *Environmental Health Perspectives*, *122*(7), 182–187. <https://doi.org/10.1289/ehp.122-A182>
- Aujoulat, F., Marchandin, H., Zorgniotti, I., Masnou, A., & Jumas-Bilak, E. (2015). *Rhizobium pusense* is the main human pathogen in the genus *Agrobacterium/Rhizobium*. *Clinical Microbiology and Infection*, *21*(5), 472.e1–472.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2014.12.005>
- Azeredo, J., Azevedo, N. F., Briandet, R., Cerca, N., Coenye, T., Costa, A. R., Desvaux, M., Di Bonaventura, G., Hébraud, M., Jaglic, Z., Kačániová, M., Knöchel, S., Lourenço, A., Mergulhão, F., Meyer, R. L., Nychas, G., Simões, M., Tresse, O., & Sternberg, C. (2017). Critical review on biofilm methods. In *Critical Reviews in Microbiology* (Vol. 43, Issue 3, pp. 313–351). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1208146>
- Bălășoiu, M., Bălășoiu, A. T., Mănescu, R., Avramescu, C., & Ionete, O. (2014). Review *Pseudomonas aeruginosa* Resistance Phenotypes and Phenotypic Highlighting Methods. *Current Health Sciences Journal*, *40*(2), 85–92. <https://doi.org/10.12865/CHSJ.40.02.01>
- Bartley, J. M., Olmsted, R. N., & Haas, J. (2010). Current views of health care design and construction: Practical implications for safer, cleaner environments. *American Journal of Infection Control*, *38*(5), S1–S12. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2010.04.195>
- Battegazzore, D., Cravero, F., & Frache, A. (2020). Is it possible to mechanical recycle the materials of the disposable filtering masks? *Polymers*, *12*(11), 1–18. <https://doi.org/10.3390/polym12112726>
- Bergman, M. S., Viscusi, D. J., Heimbuch, B. K., Wander, J. D., Sambol, A. R., & Shaffer, R. E. (2010). Evaluation of Multiple (3-Cycle) Decontamination Processing for Filtering Facepiece Respirators. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*, *5*(4), 33–41. <http://www.jeffjournal.org>
- Bessesen, M. T., Adams, J. C., Radonovich, L., & Anderson, J. (2015). Disinfection of reusable elastomeric respirators by health care workers: A feasibility study and

- development of standard operating procedures. *American Journal of Infection Control*, 43(6), 629–634. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2015.02.009>
- Bhardwaj, R., & Agrawal, A. (2020). Tailoring surface wettability to reduce chances of infection of COVID-19 by a respiratory droplet and to improve the effectiveness of personal protection equipment. In *Physics of Fluids* (Vol. 32, Issue 8, pp. 1–5). American Institute of Physics Inc. <https://doi.org/10.1063/5.0020249>
- Biondo, C. (2023). Bacterial Antibiotic Resistance: The Most Critical Pathogens. *Pathogens*, 12(1), 1–14. <https://doi.org/10.3390/pathogens12010116>
- Bogusz, A., Stewart, M., Hunter, J., Yip, B., Reid, D., Robertson, C., & Dancer, S. J. (2013). How quickly do hospital surfaces become contaminated after detergent cleaning? *Healthcare Infection*, 18(1), 3–9. <https://doi.org/10.1071/HI12063>
- Boisvert, A. A., Cheng, M. P., Sheppard, D. C., & Nguyen, D. (2016). Microbial biofilms in pulmonary and critical care diseases. *Annals of the American Thoracic Society*, 13(9), 1615–1623. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201603-194FR>
- Brisse, S., Grimont, F., & Grimont, P. A. D. (2006). The genus *Klebsiella*. In *Prokaryotes* (pp. 159–196). [https://doi.org/10.1007/0-387-30746-x\\_8](https://doi.org/10.1007/0-387-30746-x_8)
- Brooke, J. S. (2012). *Stenotrophomonas maltophilia*: An emerging global opportunistic pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(1), 2–41. <https://doi.org/10.1128/CMR.00019-11>
- Caldeira, J. B., Chung, A. P., Piedade, A. P., Morais, P. V., & Branco, R. (2021). A DedA Family Membrane Protein in Indium Extrusion in *Rhodanobacter* sp. B2A1Ga4. *Front Microb*, 12, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.772127>
- Canini, L., Andréoletti, L., Ferrari, P., Angelo, D. R., Blanchon, T., Lemaitre, M., Filleul, L., Ferry, J. P., Desmaizieres, M., Smadja, S., Valleron, A. J., & Carrat, F. (2010). Surgical mask to prevent influenza transmission in households: A cluster randomized trial. *PLoS ONE*, 5(11), 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013998>
- Cardoso, T., Almeida, M., Friedman, N. D., Aragão, I., Costa-Pereira, A., Sarmiento, A. E., & Azevedo, L. (2014). Classification of healthcare-associated infection: a systematic review 10 years after the first proposal. *BMC Medicine*, 12(40), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-12-40>
- Caselli, E., D'Accolti, M., Vandini, A., Lanzoni, L., Camerada, M. T., Coccagna, M., Branchini, A., Antonioli, P., Balboni, P. G., Di Luca, D., & Mazzacane, S. (2016). Impact of a Probiotic-Based Cleaning Intervention on the Microbiota Ecosystem of the Hospital Surfaces: Focus on the Resistome Remodulation. *PLOS ONE*, 11(2), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148857>

- Charvet, A., Bardin-Monnier, N., Thomas, D., Dufaud, O., Pfrimmer, M., Barrault, M., Bourrous, S., Mocho, V., Ouf, F.-X., Poirier, S., Jeanmichel, L., Segovia, C., Ferry, D., & Grauby, O. (2022). Impact of washing cycles on the performances of face masks. *Journal of Aerosol Science*, *160*, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2021.105914>
- Chu, D. K., Akl, E. A., Duda, S., Solo, K., Yaacoub, S., Schünemann, H. J., El-harakeh, A., Bognanni, A., Lotfi, T., Loeb, M., Hajizadeh, A., Bak, A., Izcovich, A., Cuello-Garcia, C. A., Chen, C., Harris, D. J., Borowiack, E., Chamseddine, F., Schünemann, F., ... Reinap, M. (2020). Physical distancing, face masks, and eye protection to prevent person-to-person transmission of SARS-CoV-2 and COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet*, *395*(10242), 1973–1987. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31142-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31142-9)
- Chua, M. H., Cheng, W., Goh, S. S., Kong, J., Li, B., Lim, J. Y. C., Mao, L., Wang, S., Xue, K., Yang, L., Ye, E., Zhang, K., Cheong, W. C. D., Tan, B. H., Li, Z., Tan, B. H., & Loh, X. J. (2020). Face Masks in the New COVID-19 Normal: Materials, Testing, and Perspectives. *Research*, *2020*, 1–40. <https://doi.org/10.34133/2020/7286735>
- Ciofu, O., & Tolker-Nielsen, T. (2019). Tolerance and Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Antimicrobial Agents—How *P. aeruginosa* Can Escape Antibiotics. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00913>
- Claro, T., O'Reilly, M., Daniels, S., & Humphreys, H. (2015). Surface microbial contamination in hospitals: A pilot study on methods of sampling and the use of proposed microbiologic standards. *American Journal of Infection Control*, *43*(9), 1000–1002. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2015.05.009>
- CLSI. (2020). CLSI Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. In *Clsi* (30th ed, Vol. 40, Issue 1).
- Council of the European Union. (2020). Proposal for a Directive of the European Parliament and of the Council on the quality of water intended for human consumption (recast) - Political agreement. <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/13def1fc-5711-11ea-8b81-01aa75ed71a1/language-en#>
- Crilly, L. R., Angelucci, A. A., Malile, B., Young, C. J., VandenBoer, T. C., & Chen, J. I. L. (2021). Non-woven materials for cloth-based face masks inserts: relationship between material properties and sub-micron aerosol filtration. *Environmental Science: Nano*, *8*(6), 1603–1613. <https://doi.org/10.1039/d1en00277e>

- Cristina, M. L., Sartini, M., Schinca, E., Ottria, G., Casini, B., & Spagnolo, A. M. (2021). Evaluation of Multidrug-Resistant *P. aeruginosa* in Healthcare Facility Water Systems. *Antib*, *10*(12), 1–13. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10121500>
- da Silva, N., Junqueira, V. C. A., de Arruda Silveira, N. F., Taniwaki, M. H., Gomes, R. A. R., Okazaki, M. M., & Iamanaka, B. T. (2022). *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água*. Editora Blucher. <https://books.google.com.br/books?id=raFjEAAAQBAJ>
- Dancer, S. J. (2004). How do we assess hospital cleaning? A proposal for microbiological standards for surface hygiene in hospitals. *Journal of Hospital Infection*, *56*(1), 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2003.09.017>
- Dancer, S. J. (2009). The role of environmental cleaning in the control of hospital-acquired infection. In *Journal of Hospital Infection* (Vol. 73, Issue 4, pp. 378–385). <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2009.03.030>
- de Abreu, P. M., Farias, P. G., Paiva, G. S., Almeida, A. M., & Morais, P. V. (2014). Persistence of microbial communities including *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital environment: a potential health hazard. *BMC Microbiology*, *14*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-118>
- De Felice, B., Antenucci, S., Ortenzi, M. A., & Parolini, M. (2022). Laundering of face masks represents an additional source of synthetic and natural microfibers to aquatic ecosystems. *The Science of the Total Environment*, *806*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150495>
- de Lima, D. R., Vieira, I. R. S., Dutra da Rocha, E. B., Furtado de Sousa, A. M., Augusto da Costa, A. C., & Furtado, C. R. G. (2023). Biodegradation of natural rubber latex films by highlighting the crosslinked bond. *Industrial Crops and Products*, *204*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.117290>
- De-la-Torre, G. E., Rakib, M. R. J., Pizarro-Ortega, C. I., & Dioses-Salinas, D. C. (2021). Occurrence of personal protective equipment (PPE) associated with the COVID-19 pandemic along the coast of Lima, Peru. *Science of the Total Environment*, *774*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145774>
- Delbrück, A. I., Zhang, Y., Heydenreich, R., & Mathys, A. (2021). Bacillus spore germination at moderate high pressure: A review on underlying mechanisms, influencing factors, and its comparison with nutrient germination. In *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* (Vol. 20, Issue 4, pp. 4159–4181). Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12789>
- Deurenberg, R. H., Bathoorn, E., Chlebowicz, M. A., Couto, N., Ferdous, M., García-Cobos, S., Kooistra-Smid, A. M. D., Raangs, E. C., Rosema, S., Veloo, A. C. M.,



- Zhou, K., Friedrich, A. W., & Rossen, J. W. A. (2017). Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention. *Journal of Biotechnology*, 243, 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.12.022>
- DiGangi, J., Schettler, T., Cobbing, M., & Rossi, M. (2002). Aggregate Exposures To Phthalates in Humans. In *Health Care Without Harm* (Issue July). [https://noharm-europe.org/sites/default/files/documents-files/88/Agg\\_Exposures\\_to\\_Phthalates.pdf](https://noharm-europe.org/sites/default/files/documents-files/88/Agg_Exposures_to_Phthalates.pdf)
- Dolan, A., Bartlett, M., McEntee, B., Creamer, E., & Humphreys, H. (2011). Evaluation of different methods to recover meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* from hospital environmental surfaces. *Journal of Hospital Infection*, 79(3), 227–230. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2011.05.011>
- Doll, M., Stevens, M., & Bearman, G. (2018). Environmental cleaning and disinfection of patient areas. *International Journal of Infectious Diseases*, 67, 52–57. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.10.014>
- ECDC. (2014). *Antimicrobial resistance surveillance in Europe annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2013*. Publications Office. <https://doi.org/10.2900/39777>
- Ekrami, A., Kayedani, A., Jahangir, M., Kalantar, E., Jalali, M., & Journal, J. (2011). Isolation of common aerobic bacterial pathogens from the environment of seven hospitals, Ahvaz, Iran Bacterial pathogens from the environment of hospital 76. *JJM*, 4(2), 75–82. <http://jjm.ajums.ac.ir>;
- EUCAST. (2020). *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 10.0*. [https://www.Eucast.Org/Ast\\_of\\_Bacteria/](https://www.Eucast.Org/Ast_of_Bacteria/). [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_10.0\\_Breakpoint\\_Tables.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_10.0_Breakpoint_Tables.pdf)
- Eun, J., Lee, H., & Jeon, S. (2021). Regeneration of an electret filter by contact electrification. *RSC Advances*, 11(8), 4610–4615. <https://doi.org/10.1039/d0ra09769a>
- Faessler, D., McCombie, G., Biedermann, M., Felder, F., & Subotic, U. (2017). Leaching of plasticizers from polyvinylchloride perfusion lines by different lipid emulsions for premature infants under clinical conditions. *Int J Pharmac*, 520, 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.01.046>
- Fisher, E. M., Williams, J. L., & Shaffer, R. E. (2011). Evaluation of Microwave Steam Bags for the Decontamination of Filtering Facepiece Respirators. *PLoS ONE*, 6(4), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018585>

- Fisher, E., Rengasamy, S., Viscusi, D., Vo, E., & Shaffer, R. (2009). Development of a test system to apply virus-containing particles to filtering facepiece respirators for the evaluation of decontamination procedures. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(6), 1500–1507. <https://doi.org/10.1128/AEM.01653-08>
- Gajdács, M., Baráth, Z., Kárpáti, K., Szabó, D., Usai, D., Zanetti, S., & Donadu, M. G. (2021). No correlation between biofilm formation, virulence factors, and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Results from a laboratory-based in vitro study. *Antibiotics*, *10*(9), 1–16. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10091134>
- Geadas Farias, P., Gama, F., Reis, D., Alarico, S., Empadinhas, N., Martins, J. C., de Almeida, A. F., & Morais, P. V. (2017). Hospital microbial surface colonization revealed during monitoring of *Klebsiella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, and non-tuberculous mycobacteria. *Ant van Leeuw, Int J of Gen and Mol Microb*, *110*(7), 863–876. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0857-z>
- Gebel, J., Gemein, S., & Exner, M. (2013). Surface cleaning and disinfection: insight into the situation in Germany and Europe. *Healthcare Infection*, *18*(1), 31–36. <https://doi.org/10.1071/HI12054>
- Ghosh, S., Qureshi, A., & Purohit, H. J. (2019). Microbial degradation of plastics: Biofilms and degradation pathways. In *Contaminants in Agriculture and Environment: Health Risks and Remediation* (pp. 184–199). Agro Environ Media - Agriculture and Environmental Science Academy, Haridwar, India. <https://doi.org/10.26832/AESA-2019-CAE-0153-014>
- Giacomucci, L., Raddadi, N., Soccio, M., Lotti, N., & Fava, F. (2019). Polyvinyl chloride biodegradation by *Pseudomonas citronellolis* and *Bacillus flexus*. *New Biotic*, *52*(April), 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.04.005>
- Gilbert, S. E., Rose, L. J., Howard, M., Bradley, M. D., Shah, S., Silvestri, E., Schaefer, F. W., & Noble-Wang, J. (2014). Evaluation of swabs and transport media for the recovery of *Yersinia pestis*. *Journ of Microb Meth*, *96*(1), 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.10.017>
- Gonçalves, S. C. M., & Carmo, T. I. G. do. (2022). Implicações das Infecções Associadas aos Cuidados de Saúde na Gestão em Saúde. *Enfermeria: Cuidados Humanizados*, *11*(1), 1–19. <https://doi.org/10.22235/ech.v11i1.2746>
- Guentzel, M. N. (1996). *Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter, and Proteus*. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology* (4th ed., pp. 1–11). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8035/?report=reader>

- Hall, C. W., & Mah, T. F. (2017). Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microb Rev*, *41*(3), 276–301. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux010>
- Han, J. H., Sullivan, N., Leas, B. F., Pegues, D. A., Kaczmarek, J. L., & Umscheid, C. A. (2015). Cleaning Hospital Room Surfaces to Prevent Health Care–Associated Infections. *Annals of Internal Medicine*, *163*(8), 598–607. <https://doi.org/10.7326/M15-1192>
- Hassan, M. Z., Sturm-Ramirez, K., Rahman, M. Z., Hossain, K., Aleem, M. A., Bhuiyan, M. U., Islam, M. M., Rahman, M., & Gurley, E. S. (2019). Contamination of hospital surfaces with respiratory pathogens in Bangladesh. *PloS One*, *14*(10), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224065>
- Heimbuch, B. K., Wallace, W. H., Kinney, K., Lumley, A. E., Wu, C. Y., Woo, M. H., & Wander, J. D. (2011). A pandemic influenza preparedness study: Use of energetic methods to decontaminate filtering facepiece respirators contaminated with H1N1 aerosols and droplets. *American Journal of Infection Control*, *39*(1), e1-E9. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2010.07.004>
- Hematzadeh, A., & Haghkhal, M. (2021). Biotyping of isolates of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from human infections by RAPD and ERIC-PCR. *Heliyon*, *7*(9), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07967>
- Hesham, A. E. L. (2019). RAPD-PCR Fingerprinting for Some *Rhodotorula* Species Isolated from Natural Sources and their Antagonistic Potential Against *Erwinia carotovora* and *Erwinia chrysanthem*. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, *21*(1), 15502–15508. <https://doi.org/10.26717/bjstr.2019.21.003533>
- Horan, T. C., Andrus, M., & Dudeck, M. A. (2008). CDC/NHSN surveillance definition of health care–associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *American Journal of Infection Control*, *36*(5), 309–332. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2008.03.002>
- Howard, J., Huang, A., Li, Z., Tufekci, Z., Zdimal, V., van der Westhuizen, H. M., von Delft, A., Price, A., Fridman, L., Tang, L. H., Tang, V., Watson, G. L., Bax, C. E., Shaikh, R., Questier, F., Hernandez, D., Chu, L. F., Ramirez, C. M., & Rimoin, A. W. (2021). An evidence review of face masks against COVID-19. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *118*(4), 1–12. <https://doi.org/10.1073/pnas.2014564118>
- Hu, Y., Jiang, L., Sun, X., Wu, J., Ma, L., Zhou, Y., Lin, K., Luo, Y., & Cui, C. (2021). Risk assessment of antibiotic resistance genes in the drinking water system. *Sci Tot Env*, *800*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149650>

- Hutchins, C. F., Moore, G., Thompson, K. A., Webb, J., & Walker, J. T. (2017). Contamination of hospital tap water: the survival and persistence of *Pseudomonas aeruginosa* on conventional and ‘antimicrobial’ outlet fittings. *J of Hosp Infec*, 97(2), 156–161. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2017.06.005>
- Jabłońska-Trypuć, A., Makuła, M., Włodarczyk-Makuła, M., Wołejko, E., Wydro, U., Serra-Majem, L., & Wiater, J. (2022). Inanimate Surfaces as a Source of Hospital Infections Caused by Fungi, Bacteria and Viruses with Particular Emphasis on SARS-CoV-2. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(13), 1–22. <https://doi.org/10.3390/ijerph19138121>
- Jansson, L., Akel, Y., Eriksson, R., Lavander, M., & Hedman, J. (2020). Impact of swab material on microbial surface sampling. *Journ of Microb Met*, 176, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.106006>
- Jones, I. A., & Joshi, L. T. (2021). Biocide use in the antimicrobial era: A review. *Molec*, 26(8), 1–11. <https://doi.org/10.3390/molecules26082276>
- Ju, J. T. J., Boisvert, L. N., & Zuo, Y. Y. (2021). Face masks against COVID-19: Standards, efficacy, testing and decontamination methods. In *Advances in Colloid and Interface Science* (Vol. 292, pp. 1–19). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2021.102435>
- Jubeh, B., Breijyeh, Z., & Karaman, R. (2020). Resistance of Gram-Positive Bacteria to Current Antibacterial Agents and Overcoming Approaches. *Molecules*, 25(12), 1–22. <https://doi.org/10.3390/molecules25122888>
- Kamali, E., Jamali, A., Ardebili, A., Ezadi, F., & Mohebbi, A. (2020). Evaluation of antimicrobial resistance, biofilm forming potential, and the presence of biofilm-related genes among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Res Notes*, 13(1), 4–9. <https://doi.org/10.1186/s13104-020-4890-z>
- Kampf, G., Todt, D., Pfaender, S., & Steinmann, E. (2020). Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents. *Journal of Hospital Infection*, 104(3), 246–251. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.01.022>
- Kanaan, A. F., Piedade, A. P., de Sousa, H. C., & Dias, A. M. A. (2020). Effect of mold assemblies-induced interfaces in the mechanical actuation of electro-responsive ionic liquid-based polycationic hydrogels. *Applied Materials Today*, 20, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2020.100711>
- Khan, H. A., Ahmad, A., & Mehboob, R. (2015). Nosocomial infections and their control strategies. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(7), 509–514. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.05.001>

- Khatoon, Z., McTiernan, C. D., Suuronen, E. J., Mah, T.-F., & Alarcon, E. I. (2018). Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. *Heliyon*, *4*(12), 1–36. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e01067>
- Kibret, M., & Abera, B. (2014). Prevalence and antibiogram of bacterial isolates from urinary tract infections at Dessie Health Research Laboratory, Ethiopia. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, *4*(2), 164–168. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(14\)60226-4](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(14)60226-4)
- Klassert, T. E., Zubiria-Barrera, C., Neubert, R., Stock, M., Schneegans, A., López, M., Driesch, D., Zakonsky, G., Gastmeier, P., Slevogt, H., & Leistner, R. (2022). Comparative analysis of surface sanitization protocols on the bacterial community structures in the hospital environment. *Clinical Microbiology and Infection*, *28*, 1105–1112. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2022.02.032>
- Kotova, I. B., Taktarova, Yu. V., Tsavkelova, E. A., Egorova, M. A., Bubnov, I. A., Malakhova, D. V., Shirinkina, L. I., Sokolova, T. G., & Bonch-Osmolovskaya, E. A. (2021). Microbial Degradation of Plastics and Approaches to Make it More Efficient. *Microbiology*, *90*(6), 671–701. <https://doi.org/10.1134/S0026261721060084>
- Kotzekidou, P. (2014). BACILLUS | *Geobacillus stearothermophilus* (Formerly *Bacillus stearothermophilus*). *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*, 129–134. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00020-3>
- Kramer, A., Schwebke, I., & Kampf, G. (2006). How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infectious Diseases*, *6*, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-6-130>
- Kunwar, A., Shrestha, P., Shrestha, S., Thapa, S., Shrestha, S., & Amatya, N. M. (2021). Detection of biofilm formation among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *Burns Open*, *5*(3), 125–129. <https://doi.org/10.1016/j.burnso.2021.04.001>
- Larsen, G. S., Cheng, Y., Daemen, L. L., Lamichhane, T. N., Hensley, D. K., Hong, K., Meyer, H. M., Monaco, S. J., Levine, A. M., Lee, R. J., Betters, E., Sitzlar, K., Heineman, J., West, J., Lloyd, P., Kunc, V., Love, L., Theodore, M., & Paranthaman, M. P. (2021). Polymer, Additives, and Processing Effects on N95 Filter Performance. *ACS Applied Polymer Materials*, *3*(2), 1022–1031. <https://doi.org/10.1021/acsapm.0c01294>
- Lax, S., Smith, D., Sangwan, N., Handley, K., Larsen, P., Richardson, M., Taylor, S., Landon, E., Alverdy, J., Siegel, J., Stephens, B., Knight, R., & Gilbert, J. A. (2017). Colonization and succession of hospital-associated microbiota. *Science*

- Translational Medicine*, 9(391), 1–11.  
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aah6500>. Colonization
- Leavis, H. L., Bonten, M. J., & Willems, R. J. (2006). Identification of high-risk enterococcal clonal complexes: global dispersion and antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology*, 9(5), 454–460. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.07.001>
- Lebeaux, D., Ghigo, J.-M., & Beloin, C. (2014). Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics. *Microb Mol Biol Rev*, 78(3), 510–543. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00013-14>
- Lebre, A. I., Alves, A., Félix, A. M., Cruz, A. P., Palos, C., Noriega, E., Neves, I., Valente, M., Silva, M. G., Faria, M. J., & Pacheco, P. (2017). Programa de Prevenção e Controlo de Infeções e de Resistência aos Antimicrobianos - PPCIRA 2017. 1–24. [www.dgs.pt](http://www.dgs.pt)
- Leclercq, R., Cantón, R., Brown, D. F. J., Giske, C. G., Heisig, P., Macgowan, A. P., Mouton, J. W., Nordmann, P., Rodloff, A. C., Rossolini, G. M., Soussy, C. J., Steinbakk, M., Winstanley, T. G., & Kahlmeter, G. (2013). EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect*, 19(2), 141–160. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03703.x>
- Lee, H. M., Kim, H. R., Jeon, E., Yu, H. C., Lee, S., Li, J., & Kim, D. H. (2020). Evaluation of the biodegradation efficiency of four various types of plastics by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from the gut extract of superworms. *Microorg*, 8(9), 1–12. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091341>
- Lee, K. P., Yip, J., Kan, C. W., Chiou, J. C., & Yung, K. F. (2020). Reusable face masks as alternative for disposable medical masks: Factors that affect their wear-comfort. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(18), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijerph17186623>
- Leffler, C. T., Ing, E., Lykins, J. D., Hogan, M. C., McKeown, C. A., & Grzybowski, A. (2020). Association of country-wide coronavirus mortality with demographics, testing, lockdowns, and public wearing of masks. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 103(6), 2400–2411. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.20-1015>
- Lewandowski, K., & Skórczewska, K. (2022). A Brief Review of Poly(Vinyl Chloride) (PVC) Recycling. *Polymers*, 14(3035), 1–14. <https://doi.org/10.3390/polym14153035>
- Linos, A., Reichelt, R., Keller, U., & Steinbuchel, A. (2000). A Gram-negative bacterium, identified as *Pseudomonas aeruginosa* AL98, is a potent degrader of

- natural rubber and synthetic cis-1,4-polyisoprene. *FEMS Microbiology Letters*, *182*(1), 155–161. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(99\)00583-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(99)00583-2)
- Liu, C., Dai, Z., He, B., & Ke, Q. F. (2020). The effect of temperature and humidity on the filtration performance of electret melt-blown nonwovens. *Materials*, *13*(21), 1–12. <https://doi.org/10.3390/ma13214774>
- Lordelo, R., Botelho, J. R. S., Morais, P. V., de Sousa, H. C., Branco, R., Dias, A. M. A., & Reis, M. S. (2022). Evaluation of the Microbiological Effectiveness of Three Accessible Mask Decontamination Methods and Their Impact on Filtration, Air Permeability and Physicochemical Properties. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, *19*(11), 1–20. <https://doi.org/10.3390/ijerph19116567>
- Ludwig-Begall, L. F., Wielick, C., Dams, L., Nauwynck, H., Demeuldre, P.-F., Napp, A., Laperre, J., Haubruge, E., & Thiry, E. (2020). The use of germicidal ultraviolet light, vaporized hydrogen peroxide and dry heat to decontaminate face masks and filtering respirators contaminated with a SARS-CoV-2 surrogate virus. *Journal of Hospital Infection*, *106*(3), 577–584. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.08.025>
- Mahmmudi, Z., & Gorzin, A. A. (2017). Biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* in Nosocomial Infection. *Journal of Molecular Biology Research*, *7*(1), 29–33. <https://doi.org/10.5539/jmbr.v7n1p29>
- Majewsky, M., Bitter, H., Eiche, E., & Horn, H. (2016). Determination of microplastic polyethylene (PE) and polypropylene (PP) in environmental samples using thermal analysis (TGA-DSC). *Science of the Total Environment*, *568*, 507–511. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.06.017>
- Marceneiro, S., Lobo, I., Dias, I., de Pinho, E., Dias, A. M. A., & de Sousa, H. C. (2022). Eco-friendlier and sustainable natural-based additives for poly(vinyl chloride)-based composites. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, *110*, 248–261. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2022.02.057>
- Maurice, N. M., Bedi, B., & Sadikot, R. T. (2018). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: Host response and clinical implications in lung infections. *Am J Respir Cell Mol Biol*, *58*(4), 428–439. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2017-0321TR>
- Mchugh, M. L. (2013). The Chi-square test of independence Lessons in biostatistics. *Bioch Med*, *23*(2), 143–149. <http://dx.doi.org/10.11613/BM.2013.018>
- Mena, K. D., & Gerba, C. P. (2009). Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (Vol. 201). [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0032-6\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0032-6_3)
- Mendes, G., Ramalho, J. F., Duarte, A., Pedrosa, A., Silva, A. C., Méndez, L., & Caneiras, C. (2022). First Outbreak of NDM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae*

- ST11 in a Portuguese Hospital Centre during the COVID-19 Pandemic. *Microorganisms*, *10*(2), 1–14. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020251>
- Mendes, G., Santos, M. L., Ramalho, J. F., Duarte, A., & Caneiras, C. (2023). Virulence factors in carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Microbiology*, *14*, 01–19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1325077>
- Mendes, W., Pavão, A. L. B., Martins, M., Moura, M. de L. de O., & Travassos, C. (2013). Características de eventos adversos evitáveis em hospitais do Rio de Janeiro. *Revista Da Associação Médica Brasileira*, *59*(5), 421–428. <https://doi.org/10.1016/j.ramb.2013.03.002>
- Merk, H., Diaz Högberg, L., Plachouras, D., Suetens, C., Monet, D. L., & European Centre for Disease Prevention and Control. (2022). *Assessing the health burden of infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU/EEA, 2016-2020*. <https://doi.org/10.2900/73460>
- Milionis, N., Wojciechowski, J., Wiśniewska-Danek, K., Sniter, K., Radecka-Moroz, K., Friel, C., Den Engelsen, S., Frydel, M., Zalega, A., Demarche, X., Ruiz, A. A., & Hussenet, F. (2019). *Atuação contra a resistência antimicrobiana: apesar dos progressos no setor animal, esta ameaça para a saúde continua a ser um desafio para a UE*. <https://doi.org/10.2865/13413>
- Mohanan, N., Montazer, Z., Sharma, P. K., & Levin, D. B. (2020). Microbial and Enzymatic Degradation of Synthetic Plastics. *Front Microbiol*, *11*, 1–22. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.580709>
- Moore, G., & Griffith, C. (2007). Problems associated with traditional hygiene swabbing: the need for in-house standardization. *Journal of Applied Microbiology*, *103*(4), 1090–1103. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03330.x>
- Mora, M., Mahnert, A., Koskinen, K., Pausan, M. R., Oberauner-Wappis, L., Krause, R., Perras, A. K., Gorkiewicz, G., Berg, G., & Moissl-Eichinger, C. (2016). Microorganisms in Confined Habitats: Microbial Monitoring and Control of Intensive Care Units, Operating Rooms, Cleanrooms and the International Space Station. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 1–20. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01573>
- Moradi, T., Esfahani, M. S., Ebrahimi, H., Khosroshahi, A., & Safapour, S. (2022). Study on bonding ability of melt-spun polypropylene/polyethylene blend fibers. *Journal of Industrial Textiles*, *51*(5\_suppl), 8142S-8156S. <https://doi.org/10.1177/1528083720955210>
- Mulani, M. S., Kamble, E. E., Kumkar, S. N., Tawre, M. S., & Pardesi, K. R. (2019). Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial



- resistance: A review. *Frontiers in Microbiology*, 10(APR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00539>
- Mulcahy, L. R., Isabella, V. M., & Lewis, K. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms in Disease. *Microbial Ecology*, 68(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0297-x>
- Murni, I. K., Duke, T., Kinney, S., Daley, A. J., & Soenarto, Y. (2015). Reducing hospital-acquired infections and improving the rational use of antibiotics in a developing country: An effectiveness study. *Archives of Disease in Childhood*, 100(5), 454–459. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2014-307297>
- Nayak, R., Kyratzis, I. L., Truong, Y. B., Padhye, R., Arnold, L., Peeters, G., O’Shea, M., & Nichols, L. (2013). Fabrication and characterisation of polypropylene nanofibres by meltblowing process using different fluids. *Journal of Materials Science*, 48(1), 273–281. <https://doi.org/10.1007/s10853-012-6742-2>
- Ndlovu, T., Kgosietsile, L., Motshwarakgole, P., & Ndlovu, S. I. (2023). Evaluation of Potential Factors Influencing the Dissemination of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* and Alternative Treatment Strategies. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 8(8), 1–16. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed8080381>
- Nordmann, P., Naas, T., Fortineau, N., & Poirel, L. (2007). Superbugs in the coming new decade; multidrug resistance and prospects for treatment of *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* in 2010. *Current Opinion in Microbiology*, 10(5), 436–440. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.07.004>
- Okafor, C. O. O., Iroha, I. R., Ude, I. U., Onuoha, S. C., Ejikeugwu, C., Ovia, K. N., Eromonsele, B. O., Agah, V. M., Okoronkwo, C., Gabriel-Ibeh, I., Okoroafor, I., & Nwachukwu, O. B. (2022). Drug resistance profile of biofilm forming *Pseudomonas aeruginosa* isolated from aquatic environment in South Eastern Nigeria. *Env Chal*, 8, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.envc.2022.100530>
- Ong, S. W. X., Tan, Y. K., Chia, P. Y., Lee, T. H., Ng, O. T., Wong, M. S. Y., & Marimuthu, K. (2020). Air, Surface Environmental, and Personal Protective Equipment Contamination by Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) from a Symptomatic Patient. In *JAMA - J Amer Med Ass* (Vol. 323, Issue 16, pp. 1610–1612). American Medical Association. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.3227>
- Otter, J. A., Yezli, S., & French, G. L. (2011). The Role Played by Contaminated Surfaces in the Transmission of Nosocomial Pathogens. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 32(7), 687–699. <https://doi.org/10.1086/660363>

- Paiva, J. A., Lebre, A., Silva, M. G., Valente, M., & Pacheco, P. (2022). *Infeções e Resistências a Antimicrobianos: Relatório do Programa Prioritário PPCIRA, 2021*. <https://www.dgs.pt/documentos-e-publicacoes/infecoehospitalares-e-consumo-de-antibioticos-diminuiram-entre-2015-e-2020-pdf.aspx>
- Parlin, A. F., Stratton, S. M., Culley, T. M., & Guerra, P. A. (2020). A laboratory-based study examining the properties of silk fabric to evaluate its potential as a protective barrier for personal protective equipment and as a functional material for face coverings during the COVID-19 pandemic. *PLOS ONE*, *15*(9), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239531>
- Parsa, P., Amirmozafari, N., Nowruzi, B., & Bahar, M. A. (2020). Molecular characterization of polymorphisms among *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients' wounds. *Heliyon*, *6*(12), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05041>
- Pascoe, M. J., Robertson, A., Crayford, A., Durand, E., Steer, J., Castelli, A., Wesgate, R., Evans, S. L., Porch, A., & Maillard, J. Y. (2020). Dry heat and microwave-generated steam protocols for the rapid decontamination of respiratory personal protective equipment in response to COVID-19-related shortages. *Journal of Hospital Infection*, *106*(1), 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.07.008>
- Paterson, D. L., Siu, K. L. K., & Siu, K. L. K. (2014). *Klebsiella species (K. pneumoniae, K. oxytoca, K. ozaenae and K. rhinoscleromatis)*. <http://www.antimicrobe.org/b107.asp>
- Pendleton, J. N., Gorman, S. P., & Gilmore, B. F. (2013). Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. In *Expert Review of Anti-Infective Therapy* (Vol. 11, Issue 3, pp. 297–308). <https://doi.org/10.1586/eri.13.12>
- Pereira, A. P. D. S., Da Silva, M. H. P., Lima, É. P., Dos Santos Paula, A., & Tommasini, F. J. (2017). Processing and characterization of PET composites reinforced with geopolymer concrete waste. *Materials Research*, *20*, 411–420. <https://doi.org/10.1590/1980-5373-MR-2017-0734>
- Pereira, S. G., Marques, M., Pereira, J., & Cardoso, O. (2014). Multidrug and Extensive Drug Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates from a Portuguese Central Hospital: 10-Year Survey. *Microbial Drug Resistance*, *00*(00), 1–7. <https://doi.org/10.1089/mdr.2014.0137>
- Pina, E., Ferreira, E., & Sousa-Uva, M. de. (2019). Infeções associadas aos cuidados de saúde. In *Segurança do paciente: conhecendo os riscos nas organizações de saúde* (pp. 137–159). Editora FIOCRUZ. <https://doi.org/10.7476/9788575416419.0010>

- Pitcher, D. G., Saunders, N. A., & Owen, R. J. (1989). Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology*, 8(4), 151–156. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1989.tb00262.x>
- Pitout, J. D. D., Nordmann, P., & Poirel, L. (2015). Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. In *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (Vol. 59, Issue 10, pp. 5873–5884). American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/AAC.01019-15>
- PPCIRA. (2017). *Programa de Prevenção e Controlo de Infeções e de Resistência aos Antimicrobianos* (Vol. 8). [https://www.sns.gov.pt/wp-content/uploads/2017/12/DGS\\_PCIRA\\_V8.pdf](https://www.sns.gov.pt/wp-content/uploads/2017/12/DGS_PCIRA_V8.pdf)
- Purdy, M. (2019). *Comparison of facemask characteristics with user assessment of comfort* [University of Iowa]. <https://doi.org/10.17077/etd.6fi4-gjle>
- Ranc, A., Dubourg, G., Fournier, P. E., Raoult, D., & Fenollar, F. (2018). *Delftia tsuruhatensis* an Emergent Opportunistic Healthcare-Associated Pathogen. *Emerging Infectious Diseases*, 24(3), 594–596. <https://doi.org/10.3201/eid2403.160939>
- Rani, A., Singh, P., & Kumar, R. (2020). Microbial deterioration of high-density polyethylene by selected microorganisms. *J of Ap Biol and Biotec*, 8(6), 64–66. <https://doi.org/10.7324/JABB.2020.80611>
- Rawlinson, S., Ciric, L., & Cloutman-Green, E. (2019). How to carry out microbiological sampling of healthcare environment surfaces? A review of current evidence. *Journal of Hospital Infection*, 103(4), 363–374. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2019.07.015>
- Robakowska, M., Bronk, M., Tyrańska-Fobke, A., Ślęzak, D., Kraszewski, J., & Balwicki, Ł. (2021). Patient Safety Related to Microbiological Contamination of the Environment of a Multi-Profile Clinical Hospital. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(7), 1–11. <https://doi.org/10.3390/ijerph18073844>
- Rodrigues, A., Figueiredo, L., Diogo, H., & Bordado, J. (2018). Mechanical behavior of PET fibers and textiles for Stent-Grafts using video extensometry and image analysis. *Science and Technology of Materials*, 30, 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.stmat.2018.11.001>
- Rose, K., & Steinbüchel, A. (2005). Biodegradation of Natural Rubber and Related Compounds: Recent Insights into a Hardly Understood Catabolic Capability of Microorganisms. *Appl Envi Microbio*, 71(6), 2803–2812. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.2803-2812.2005>

- Rosenthal, V. D., Al-Abdely, H. M., El-Kholy, A. A., AlKhawaja, S. A. A., Leblebicioglu, H., Mehta, Y., Rai, V., Hung, N. V., Kanj, S. S., Salama, M. F., Salgado-Yepe, E., Elahi, N., Morfin Otero, R., Apisarnthanarak, A., De Carvalho, B. M., Ider, B. E., Fisher, D., Buenaflor, M. C. S. G., Petrov, M. M., ... Thoa, V. T. H. (2016). International Nosocomial Infection Control Consortium report, data summary of 50 countries for 2010-2015: Device-associated module. *American Journal of Infection Control*, 44(12), 1495–1504. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2016.08.007>
- Rubio-Romero, J. C., Pardo-Ferreira, M. del C., Torrecilla-García, J. A., & Calero-Castro, S. (2020). Disposable masks: Disinfection and sterilization for reuse, and non-certified manufacturing, in the face of shortages during the COVID-19 pandemic. *Safety Science*, 129, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ssci.2020.104830>
- Rutala, W. A., & Weber, D. J. (2019). Best practices for disinfection of noncritical environmental surfaces and equipment in health care facilities: A bundle approach. *American Journal of Infection Control*, 47, A96–A105. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2019.01.014>
- Rutala, W. A., & Weber, D. J. (2021). Disinfection and Sterilization in Health Care Facilities. *Infectious Disease Clinics of North America*, 35(3), 575–607. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2021.04.004>
- Ryan, M. P., & Adley, C. C. (2010). *Sphingomonas paucimobilis*: A persistent Gram-negative nosocomial infectious organism. *Journal of Hospital Infection*, 75(3), 153–157. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2010.03.007>
- Santajit, S., & Indrawattana, N. (2016). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *BioMed Research International*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/2475067>
- Saxena, S., Verma, J., Shikha, & Raj Modi, D. (2014). RAPD-PCR and 16S rDNA phylogenetic analysis of alkaline protease producing bacteria isolated from soil of India: Identification and detection of genetic variability. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 12(1), 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2014.03.001>
- Schulster, L., Chinn, R. Y. W., Arduino, M., Carpenter, J., Donlan, R., Ashford, D., Besser, R., Fields, B., McNeil, M., Whitney, C., Wong, S., Juraneck, D., & Cleveland, J. (2004). *Guidelines for environmental infection control in health-care facilities. Recommendations of CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC)*.

- <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/environmental/background/sampling.html>
- Shek, K., Patidar, R., Kohja, Z., Liu, S., Gawaziuk, J. P., Gawthrop, M., Kumar, A., & Logsetty, S. (2018). Rate of contamination of hospital privacy curtains in a burns/plastic ward: A longitudinal study. *American Journal of Infection Control*, *46*(9), 1019–1021. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2018.03.004>
- Soto, S. M. (2013). Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence*, *4*(3), 223–229. <https://doi.org/10.4161/viru.23724>
- Squeri, R., Grilo, O. C., & La Fauci, V. (2012). Surveillance and evidence of contamination in hospital environment from meticillin and vancomycin-resistant microbial agents. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, *53*(3), 143–145.
- Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Di Bonaventura, G., Djukić, S., Ćirković, I., & Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis*, *115*(8), 891–899. [https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm\\_630.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x)
- Suleyman, G., Alangaden, G., & Bardossy, A. C. (2018). The Role of Environmental Contamination in the Transmission of Nosocomial Pathogens and Healthcare-Associated Infections. *Current Infectious Disease Reports*, *20*(6), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11908-018-0620-2>
- Su-Velez, B. M., Maxim, T., Long, J. L., St John, M. A., & Holliday, M. A. (2020). Decontamination Methods for Reuse of Filtering Facepiece Respirators. *JAMA Otolaryngology–Head & Neck Surgery*, *146*(8), 734. <https://doi.org/10.1001/jamaoto.2020.1423>
- Suzuki, S., Nakamura, Y., Hasan, A. T. M. K., Liu, B., Terano, M., & Nakatani, H. (2005). Dependence of tacticity distribution in thermal oxidative degradation of polypropylene. *Polymer Bulletin*, *54*(4–5), 311–319. <https://doi.org/10.1007/s00289-005-0389-y>
- Talento, A. F., Fitzgerald, M., Redington, B., O’Sullivan, N., Fenelon, L., & Rogers, T. R. (2019). Prevention of healthcare-associated invasive aspergillosis during hospital construction/renovation works. *Journal of Hospital Infection*, *103*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2018.12.020>
- Taudien, S., Leszczynski, W., Mayer, T., Loderstädt, U., Bader, O., Kaase, M., & Scheithauer, S. (2023). Misidentification as *Pseudomonas aeruginosa* in hospital water supply samples. *Journal of Hospital Infection*, *133*, 23–27. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2022.12.013>

- Taylor, P. K., Yeung, A. T. Y., & Hancock, R. E. W. (2014). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: Towards the development of novel anti-biofilm therapies. *Journal of Biotechnology*, *191*, 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.09.003>
- Taylor, T. A., & Unakal, C. G. (2023). *Staphylococcus aureus* Infection. StatPearls. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9709046>
- Tcharkhtchi, A., Abbasnezhad, N., Zarbini Seydani, M., Zirak, N., Farzaneh, S., & Shirinbayan, M. (2021). An overview of filtration efficiency through the masks: Mechanisms of the aerosols penetration. In *Bioactive Materials* (Vol. 6, Issue 1, pp. 106–122). KeAi Communications Co. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.08.002>
- Thi, M. T. T., Wibowo, D., & Rehm, B. H. A. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(22), 1–25. <https://doi.org/10.3390/ijms21228671>
- Ting, L., Cowley, M. J., Hoon, S. L., Guilhaus, M., Raftery, M. J., & Cavicchioli, R. (2009). Normalization and statistical analysis of quantitative proteomics data generated by metabolic labeling. *Molecular and Cellular Proteomics*, *8*(10), 2227–2242. <https://doi.org/10.1074/mcp.M800462-MCP200>
- Tsai, P. (2020). Performance of Masks and Discussion of the Inactivation of SARS-CoV-2. In *Engineered Science* (Vol. 10, pp. 1–7). <https://doi.org/10.30919/es8d1110>
- Ullah, S., Ullah, A., Lee, J., Jeong, Y., Hashmi, M., Zhu, C., Joo, K. Il, Cha, H. J., & Kim, I. S. (2020). Reusability Comparison of Melt-Blown vs Nanofiber Face Mask Filters for Use in the Coronavirus Pandemic. *ACS Applied Nano Materials*, *3*(7), 7231–7241. <https://doi.org/10.1021/acsanm.0c01562>
- Üreyen, M. E., & Kaynak, E. (2019). Effect of zinc borate on flammability of pet woven fabrics. *Advances in Polymer Technology*, *2019*, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2019/7150736>
- Vaz-Moreira, I., Nunes, O. C., & Manaia, C. M. (2014). Bacterial diversity and antibiotic resistance in water habitats: Searching the links with the human microbiome. *FEMS Microb Rev*, *38*(4), 761–778. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12062>
- Visca, P., Seifert, H., & Towner, K. J. (2011). Acinetobacter infection - An emerging threat to human health. *IUBMB Life*, *63*(12), 1048–1054. <https://doi.org/10.1002/iub.534>
- Viscusi, D. J., Bergman, M. S., Eimer, B. C., & Shaffer, R. E. (2009). Evaluation of five decontamination methods for filtering facepiece respirators. *Annals of Occupational Hygiene*, *53*(8), 815–827. <https://doi.org/10.1093/annhyg/mep070>

- Viscusi, D. J., Bergman, M. S., Novak, D. A., Faulkner, K. A., Palmiero, A., Powell, J., & Shaffer, R. E. (2011). Impact of Three Biological Decontamination Methods on Filtering Facepiece Respirator Fit, Odor, Comfort, and Donning Ease. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 8(7), 426–436. <https://doi.org/10.1080/15459624.2011.585927>
- Wang, D., Luo, F., Shen, Z., Wu, X., & Qi, Y. (2017). A study on the crystallization behavior and mechanical properties of poly(ethylene terephthalate) induced by chemical degradation nucleation. *RSC Advances*, 7(59), 37139–37147. <https://doi.org/10.1039/c7ra06823a>
- Wang, D., Yang, B., Chen, Q. T., Chen, J., Su, L. F., Chen, P., Zheng, Z. Z., Miao, J. Bin, Qian, J. S., Xia, R., & Shi, Y. (2019). A facile evaluation on melt crystallization kinetics and thermal properties of low-density polyethylene (LDPE)/Recycled polyethylene terephthalate (RPET) blends. *Advanced Industrial and Engineering Polymer Research*, 2(3), 126–135. <https://doi.org/10.1016/j.aiepr.2019.05.002>
- Watson, F., Wilks, S. A., Keevil, C. W., & Chewins, J. (2023). Evaluating the environmental microbiota across four National Health Service hospitals within England. *Journal of Hospital Infection*, 131, 203–212. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2022.11.001>
- Weber, D. J., Anderson, D., & Rutala, W. A. (2013). The role of the surface environment in healthcare-associated infections. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 26(4), 338–344. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e3283630f04>
- Weldegebreal, F., Admassu, D., Meaza, D., & Asfaw, M. (2019). Non-critical healthcare tools as a potential source of healthcare-acquired bacterial infections in eastern Ethiopia: A hospital-based cross-sectional study. *SAGE Open Medicine*, 7, 1–10. <https://doi.org/10.1177/2050312118822627>
- WHO. (2020). *Advice on the use of masks in the context of COVID-19*. <https://www.who.int/publications->
- Wibisono, Y., Fadila, C. R., Saiful, S., & Bilad, M. R. (2020). Facile approaches of polymeric face masks reuse and reinforcements for micro-aerosol droplets and viruses filtration: A review. In *Polymers* (Vol. 12, Issue 11, pp. 1–18). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/polym12112516>
- Wilkes, R. A., & Aristilde, L. (2017). Degradation and metabolism of synthetic plastics and associated products by *Pseudomonas* sp.: capabilities and challenges. *J Appl Microbio*, 123(3), 582–593. <https://doi.org/10.1111/jam.13472>

- Wißmann, J. E., Kirchoff, L., Brüggemann, Y., Todt, D., Steinmann, J., & Steinmann, E. (2021). Persistence of pathogens on inanimate surfaces: A narrative review. *Microorganisms*, *9*(2), 1–37. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020343>
- Yang, A., Cai, L., Zhang, R., Wang, J., Hsu, P. C., Wang, H., Zhou, G., Xu, J., & Cui, Y. (2017). Thermal Management in Nanofiber-Based Face Mask. *Nano Letters*, *17*(6), 3506–3510. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.7b00579>
- Yin, R., Cheng, J., Wang, J., Li, P., & Lin, J. (2022). Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infectious biofilms: Challenges and strategies. *Front Microb*, *13*(August), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.955286>
- Zahornacký, O., Porubčín, Š., Rovňáková, A., & Jarčuška, P. (2022). Gram-Negative Rods on Inanimate Surfaces of Selected Hospital Facilities and Their Nosocomial Significance. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *19*(10), 1–11. <https://doi.org/10.3390/ijerph19106039>
- Zhang, H., Liu, J., Zhang, X., Huang, C., & Jin, X. (2018). Design of electret polypropylene melt blown air filtration material containing nucleating agent for effective PM2.5 capture. *RSC Advances*, *8*(15), 7932–7941. <https://doi.org/10.1039/c7ra10916d>
- Zheng, Y., Yanful, E. K., & Bassi, A. S. (2005). A Review of Plastic Waste Biodegradation. *Crit Rev Biotec*, *25*(4), 243–250. <https://doi.org/10.1080/07388550500346359>
- Zorko, D. J., Gertsman, S., O’Hearn, K., Timmerman, N., Ambu-Ali, N., Dinh, T., Sampson, M., Sikora, L., McNally, J. D., & Choong, K. (2020). Decontamination interventions for the reuse of surgical mask personal protective equipment: a systematic review. In *Journal of Hospital Infection* (Vol. 106, Issue 2, pp. 283–294). W.B. Saunders Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.07.007>
- Zulauf, K. E., Green, A. B., Nguyen Ba, A. N., Jagdish, T., Reif, D., Seeley, R., Dale, A., & Kirby, J. E. (2020). Microwave-Generated Steam Decontamination of N95 Respirators Utilizing Universally Accessible Materials. *MBio*, *11*(3), 1–9. <https://doi.org/10.1128/mBio.00997-20>



---

**Apêndice 1:**  
**Sequências do gene 16S rRNA**

**Tabela Suplementar 1. Sequências do gene 16S rRNA das estirpes utilizadas neste estudo.**

Nome da Amostra	Sequências do gene 16S rRNA	Pares de bases
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 152/pol	GGCGGTGACTTATCGCGTTAGCTGCGCCACTAAGATCTCAAGATCCCAACGGCTAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCTGTTT GCTCCCCACGCTTTCGACCTCAGTGTACAGTACAGTCCAGGTGGTCCCTTGGCCACTGGTTCCTTCTATATACGCAATTCACCGCTACACAGAAAT TCCACCACCTCTACCGTACTAGCTCAGTAGTTTTGATGACAGTCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTCACATCCAACTTGTGAACCCACTACGCGCGCTT TAGCCCGAATAATCCGATTAACGCTTGACCCCTTCCGTTTACCGGGCTGCTGGCAGAAAGTACCGGGTCTTATTCTGTGGTAACTCAAAAACGCAAGG TATTAACTACTGCGCTTCTCCCAACTTAAAGTGCTTAACTCCGAAGACCTTCTCACACACGGCGCATGGCTGGATCAGGCTTCGCCCAATTGTCAAATAT CCCCACTGCTGCGCTCCGATGAGGCTGAGCCGCTGCTCAGTCCAGTGTGACTGATCATCTCTCAGACAGTACGGATCGCTCCGCTGGTAGCCCTTAC CCCACCACTAGCTAATCCGACCTAGGCTCATCTGATAGCGTGGAGTCCGAAGATCCGCCACTTCTCTCCTCAGGAGCATGGGATTAGCCGCCGTTTCCG GACGTTATCCCCACTACAGGCAAGTCTAGGCATTAATCCCTCCCGCTGAATCCAGGAGCAAGCTCCCTCATCGCTCAGTGCATGTGTTA GGCCTGCCGCCAGCGTTCAATCTGAGCCAGGAATCAAATCA	871
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 118Pa	GGCGGTGACTTATCGCGTTAGCTGCGCCACTAAGATCTCAAGATCCCAACGGCTAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCTGTTT GCTCCCCACGCTTTCGACCTCAGTGTACAGTACAGTCCAGGTGGTCCCTTGGCCACTGGTTCCTTCTATATACGCAATTCACCGCTACACAGAAAT TCCACCACCTCTACCGTACTAGCTCAGTAGTTTTGATGACAGTCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTCACATCCAACTTGTGAACCCACTACGCGCGCTT TAGCCCGAATAATCCGATTAACGCTTGACCCCTTCCGTTTACCGGGCTGCTGGCAGAAAGTACCGGGTCTTATTCTGTGGTAACTCAAAAACGCAAGG TATTAACTACTGCGCTTCTCCCAACTTAAAGTGCTTAACTCCGAAGACCTTCTCACACACGGCGCATGGCTGGATCAGGCTTCGCCCAATTGTCAAATAT CCCCACTGCTGCGCTCCGATGAGGCTGAGCCGCTGCTCAGTCCAGTGTGACTGATCATCTCTCAGACAGTACGGATCGCTCCGCTGGTAGCCCTTAC CCCACCACTAGCTAATCCGACCTAGGCTCATCTGATAGCGTGGAGTCCGAAGATCCGCCACTTCTCTCCTCAGGAGCATGGGATTAGCCGCCGTTTCCG GACGTTATCCCCACTACAGGCAAGTCTAGGCATTAATCCCTCCCGCTGAATCCAGGAGCAAGCTCCCTCATCGCTCAGTGCATGTGTTA GGCCTGCCGCCAGCGTTCAATCTGAGCCAGGAATCAAATCA	695
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 133Pb	CAGCGGTGACTTATCGCGTTAGCTGCGCCACTAAGATCTCAAGATCCCAACGGCTAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCTGTTT TTGCTCCCCACGCTTTCGACCTCAGTGTACAGTACAGTCCAGGTGGTCCCTTGGCCACTGGTTCCTTCTATATACGCAATTCACCGCTACACAGAAAT AATTCACCCCTCTACCGTACTAGCTCAGTAGTTTTGATGACAGTCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTCACATCCAACTTGTGAACCCACTACGCGCGCTT CTTAGCCCGAATAATCCGATTAACGCTTGACCCCTTCCGTTTACCGGGCTGCTGGCAGAAAGTACCGGGTCTTATTCTGTGGTAACTCAAAAACGCAAGG AAGTATTAATCTACTGCGCTTCTCCCAACTTAAAGTGCTTAACTCCGAAGACCTTCTCACACACGGCGCATGGCTGGATCAGGCTTCGCCCAATTGTCAAATAT TTGCCCACTGCTGCGCTCCGATGAGGCTGAGCCGCTGCTCAGTCCAGTGTGACTGATCATCTCTCAGACAGTACGGATCGCTCCGCTGGTAGCCCTTAC TACCCCCACTAGCTAATCCGACCTAGGCTCATCTGATAGCGTGGAGTCCGAAGATCCGCCACTTCTCTCCTCAGGAGCATGGGATTAGCCGCCGTTTCCG GACGTTATCCCCACTACAGGCAAGTCTAGGCATTAATCCCTCCCGCTGAATCCAGGAGCAAGCTCCCTCATCGCTCAGTGCATGTGTTA TTAGCCTGCCGCCAGCGTTCAATCTGAGCCAGGAATCAAATCA	871
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 140b/pol	GGCGGTGACTTATCGCGTTAGCTGCGCCACTAAGATCTCAAGATCCCAACGGCTAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCTGTTT GCTCCCCACGCTTTCGACCTCAGTGTACAGTACAGTCCAGGTGGTCCCTTGGCCACTGGTTCCTTCTATATACGCAATTCACCGCTACACAGAAAT TCCACCACCTCTACCGTACTAGCTCAGTAGTTTTGATGACAGTCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTCACATCCAACTTGTGAACCCACTACGCGCGCTT TAGCCCGAATAATCCGATTAACGCTTGACCCCTTCCGTTTACCGGGCTGCTGGCAGAAAGTACCGGGTCTTATTCTGTGGTAACTCAAAAACGCAAGG TATTAACTACTGCGCTTCTCCCAACTTAAAGTGCTTAACTCCGAAGACCTTCTCACACACGGCGCATGGCTGGATCAGGCTTCGCCCAATTGTCAAATAT CCCCACTGCTGCGCTCCGATGAGGCTGAGCCGCTGCTCAGTCCAGTGTGACTGATCATCTCTCAGACAGTACGGATCGCTCCGCTGGTAGCCCTTAC CCCACCACTAGCTAATCCGACCTAGGCTCATCTGATAGCGTGGAGTCCGAAGATCCGCCACTTCTCTCCTCAGGAGCATGGGATTAGCCGCCGTTTCCG GACGTTATCCCCACTACAGGCAAGTCTAGGCATTAATCCCTCCCGCTGAATCCAGGAGCAAGCTCCCTCATCGCTCAGTGCATGTGTTA GGCCTGCCGCCAGCGTTCAATCTGAGCCAGGAATCAAATCA	869
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 140Kd	Ccnggggctgacttattcggttagctgcccactaagatctcaagatcccaacggctagtcgacatcgtttacggcggtggactaccagggtatctaactctggtt gtttgctccccacgcttccgacctcagtgtagtcaagatcccaacggctagtcgacatcgtttacggcggtggactaccagggtatctaactctggtt aaattccaccacccctctaccgtagctcagtagttagttagtgcagntccacaggttgagcccggnatttcacatcccaactgtgtaaacacacacagc ctttacgcccagtaattccgattaaagcttgcaccttccgattacggcggtgctgacacagcagccttcaactccgctgctgacagcaagt	378
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 140Ka	GGCGGTGACTTATCGCGTTAGCTGCGCCACTAAGATCTCAAGATCCCAACGGCTAGTRInnACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCTGTTInnMnnS nngstttccaccactcagtgtagtcaagatcccaacggctagtcgacatcgtttacggcggtggactaccagggtatctaactctggttInnMnnS ctttacgcccagtaattccgattaaagcttgcaccttccgattacggcggtgctgacacagcagccttcaactccgctgctgacagcaagt	376
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 104Ke	GTGATTAACGCGTTAGCTGCGCCACTAAGATCTCAAGATCCCAACGGCTAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCTGTTT CCCCACGCTTTCGACCTCAGTGTACAGTACAGTCCAGGTGGTCCCTTGGCCACTGGTTCCTTCTATATACGCAATTCACCGCTACACAGAAAT TCCACCACCTCTACCGTACTAGCTCAGTAGTTTTGATGACAGTCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTCACATCCAACTTGTGAACCCACTACGCGCGCTT TAGCCCGAATAATCCGATTAACGCTTGACCCCTTCCGTTTACCGGGCTGCTGGCAGAAAGTACCGGGTCTTATTCTGTGGTAACTCAAAAACGCAAGG TATTAACTACTGCGCTTCTCCCAACTTAAAGTGCTTAACTCCGAAGACCTTCTCACACACGGCGCATGGCTGGATCAGGCTTCGCCCAATTGTCAAATAT ATATTCCCACTAGCTGCTCnCGTAnGAGTCTGACCGnGCTCAGTCCAGTGTGGCTGnCATCTCnACCAGCTAnGAGTCTGCGCTAGnGAGCC GATACCCCA	624
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 266Pi'	CCGAGCGGTGACTTATCGCGTTAGCTGCGCCACTAAGATCTCAAGATCCCAACGGCTAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCTGTTT GTGTTGCTCCCCACGCTTTCGACCTCAGTGTACAGTACAGTCCAGGTGGTCCCTTGGCCACTGGTTCCTTCTATATACGCAATTCACCGCTACACAGAAAT GAAATTCACCCACCTCTACCGTACTAGCTCAGTAGTTTTGATGACAGTCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTCACATCCAACTTGTGAACCCACTACGCGCGCTT GGCGCTTACGCCAGTAATCCGATTAACGCTTGACCCCTTCCGTTTACCGGGCTGCTGGCAGAAAGTACCGGGTCTTATTCTGTGGTAACTCAAAAACGCAAGG CAAGATTAATCTACTGCGCTTCTCCCAACTTAAAGTGCTTAACTCCGAAGACCTTCTCACACACGGCGCATGGCTGGATCAGGCTTCGCCCAATTGTCAAATAT CCAATTTCCCACTGCTGCTCCCGATGAGGCTGAGCCGCTGCTCAGTCCAGTGTGACTGATCATCTCTCAGACAGTACGGATCGCTCCGCTGGTAGG CCTTACCCCACTAGCTAATCCGACCTAGGCTCATCTGATAGCGTGGAGTCCGAAGATCCGCCACTTCTCTCCTCAGGAGCATGGGATTAGCCGCCGTTTCCG GTTTCCGAGGTTATCCCCACTACAGGCAAGTCTAGGCATTAATCCCTCCCGCTGAATCCAGGAGCAAGCTCCCTCATCGCTCAGTGCATGTGTTA TGTTAGCCTGCCGCCAGCGTTCAATCTGAGCCAGGAATCAAATCA	874
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 266Pa'	GGCGGTGACTTATCGCGTTAGCTGCGCCACTAAGATCTCAAGATCCCAACGGCTAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCTGTTT GCTCCCCACGCTTTCGACCTCAGTGTACAGTACAGTCCAGGTGGTCCCTTGGCCACTGGTTCCTTCTATATACGCAATTCACCGCTACACAGAAAT TCCACCACCTCTACCGTACTAGCTCAGTAGTTTTGATGACAGTCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTCACATCCAACTTGTGAACCCACTACGCGCGCTT TAGCCCGAATAATCCGATTAACGCTTGACCCCTTCCGTTTACCGGGCTGCTGGCAGAAAGTACCGGGTCTTATTCTGTGGTAACTCAAAAACGCAAGG TATTAACTACTGCGCTTCTCCCAACTTAAAGTGCTTAACTCCGAAGACCTTCTCACACACGGCGCATGGCTGGATCAGGCTTCGCCCAATTGTCAAATAT CCCCACTGCTGCGCTCCGATGAGGCTGAGCCGCTGCTCAGTCCAGTGTGACTGATCATCTCTCAGACAGTACGGATCGCTCCGCTGGTAGGCTTAC CCCACCACTAGCTAATCCGACCTAGGCTCATCTGATAGCGTGGAGTCCGAAGATCCGCCACTTCTCTCCTCAGGAGCATGGGATTAGCCGCCGTTTCCG GACGTTATCCCCACTACAGGCAAGTCTAGGCATTAATCCCTCCCGCTGAATCCAGGAGCAAGCTCCCTCATCGCTCAGTGCATGTGTTA GGCCTGCCGCCAGCGTTCAATCTGAGCCAGGAATCAAATCA	871
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 270Pd'	ACTTAACGCGTTAGCTGCGCCACTAAGATCTCAAGATCCCAACGGCTAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCTGTTT AGCTTTCGCTCCTCAGTGTACAGTACAGTCCAGGTGGTCCCTTGGCCACTGGTTCCTTCTATATACGCAATTCACCGCTACACAGAAAT CCTCTACCCAGCTAGCTCAGTAGTTTTGATGACAGTCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTCACATCCAACTTGTGAACCCACTACGCGCGCTTAC GTAATCCGATTAACGCTTGACCCCTTCCGTTTACCGGGCTGCTGGCAGAAAGTACCGGGTCTTATTCTGTGGTAACTCAAAAACGCAAGG GGCTGCGCTCCGATGAGGCTGAGCCGCTGCTCAGTCCAGTGTGACTGATCATCTCTCAGACAGTACGGATCGCTCCGCTGGTAGGCTTAC CCCACTAGCTAATCCGACCTAGGCTCATCTGATAGCGTGGAGTCCGAAGATCCGCCACTTCTCTCCTCAGGAGCATGGGATTAGCCGCCGTTTCCG TATCCCCACGAAAAGTAGATTCCGATTAATCCCTCCCGCTGAATCCAGGAGCAAGCTCCCTCATCGCTCAGTGCATGTGTTA GGCCTGCCGCCAGCGTTCAATCTGAGCCAGGAATCAAATCA	860
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 247P/pol	GGTGCATATCGCGTTAGCTGCGCCACTAAGATCTCAAGATCCCAACGGCTAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCTGTTT GCTCCCCACGCTTTCGACCTCAGTGTACAGTACAGTCCAGGTGGTCCCTTGGCCACTGGTTCCTTCTATATACGCAATTCACCGCTACACAGAAAT ACCACCTCTACCGTACTAGCTCAGTAGTTTTGATGACAGTCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTCACATCCAACTTGTGAACCCACTACGCGCGCTTAC GGCCAGTAATCCGATTAACGCTTGACCCCTTCCGTTTACCGGGCTGCTGGCAGAAAGTACCGGGTCTTATTCTGTGGTAACTCAAAAACGCAAGG TAACTACTACTGCGCTTCTCCCAACTTAAAGTGCTTAACTCCGAAGACCTTCTCACACACGGCGCATGGCTGGATCAGGCTTCGCCCAATTGTCAAATAT TAACTACTACTGCGCTTCTCCCAACTTAAAGTGCTTAACTCCGAAGACCTTCTCACACACGGCGCATGGCTGGATCAGGCTTCGCCCAATTGTCAAATAT CCCACTGCTGCGCTCCGATGAGGCTGAGCCGCTGCTCAGTCCAGTGTGACTGATCATCTCTCAGACAGTACGGATCGCTCCGCTGGTAGGCTTAC CCCACCACTAGCTAATCCGACCTAGGCTCATCTGATAGCGTGGAGTCCGAAGATCCGCCACTTCTCTCCTCAGGAGCATGGGATTAGCCGCCGTTTCCG GACGTTATCCCCACTACAGGCAAGTCTAGGCATTAATCCCTCCCGCTGAATCCAGGAGCAAGCTCCCTCATCGCTCAGTGCATGTGTTA GGCCTGCCGCCAGCGTTCAATCTGAGCCAGGAATCAAATCA	866
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 266Pb/pol	CCCAGCGGTGACTTATCGCGTTAGCTGCGCCACTAAGATCTCAAGATCCCAACGGCTAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCTGTTT GTGTTGCTCCCCACGCTTTCGACCTCAGTGTACAGTACAGTCCAGGTGGTCCCTTGGCCACTGGTTCCTTCTATATACGCAATTCACCGCTACACAGAAAT GAAATTCACCCACCTCTACCGTACTAGCTCAGTAGTTTTGATGACAGTCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTCACATCCAACTTGTGAACCCACTACGCGCGCTT GGCGCTTACGCCAGTAATCCGATTAACGCTTGACCCCTTCCGTTTACCGGGCTGCTGGCAGAAAGTACCGGGTCTTATTCTGTGGTAACTCAAAAACGCAAGG CAAGATTAATCTACTGCGCTTCTCCCAACTTAAAGTGCTTAACTCCGAAGACCTTCTCACACACGGCGCATGGCTGGATCAGGCTTCGCCCAATTGTCAAATAT CCAATTTCCCACTGCTGCTCCCGATGAGGCTGAGCCGCTGCTCAGTCCAGTGTGACTGATCATCTCTCAGACAGTACGGATCGCTCCGCTGGTAGG CCTTACCCCACTAGCTAATCCGACCTAGGCTCATCTGATAGCGTGGAGTCCGAAGATCCGCCACTTCTCTCCTCAGGAGCATGGGATTAGCCGCCGTTTCCG GTTTCCGAGGTTATCCCCACTACAGGCAAGTCTAGGCATTAATCCCTCCCGCTGAATCCAGGAGCAAGCTCCCTCATCGCTCAGTGCATGTGTTA GGCCTGCCGCCAGCGTTCAATCTGAGCCAGGAATCAAATCA	873







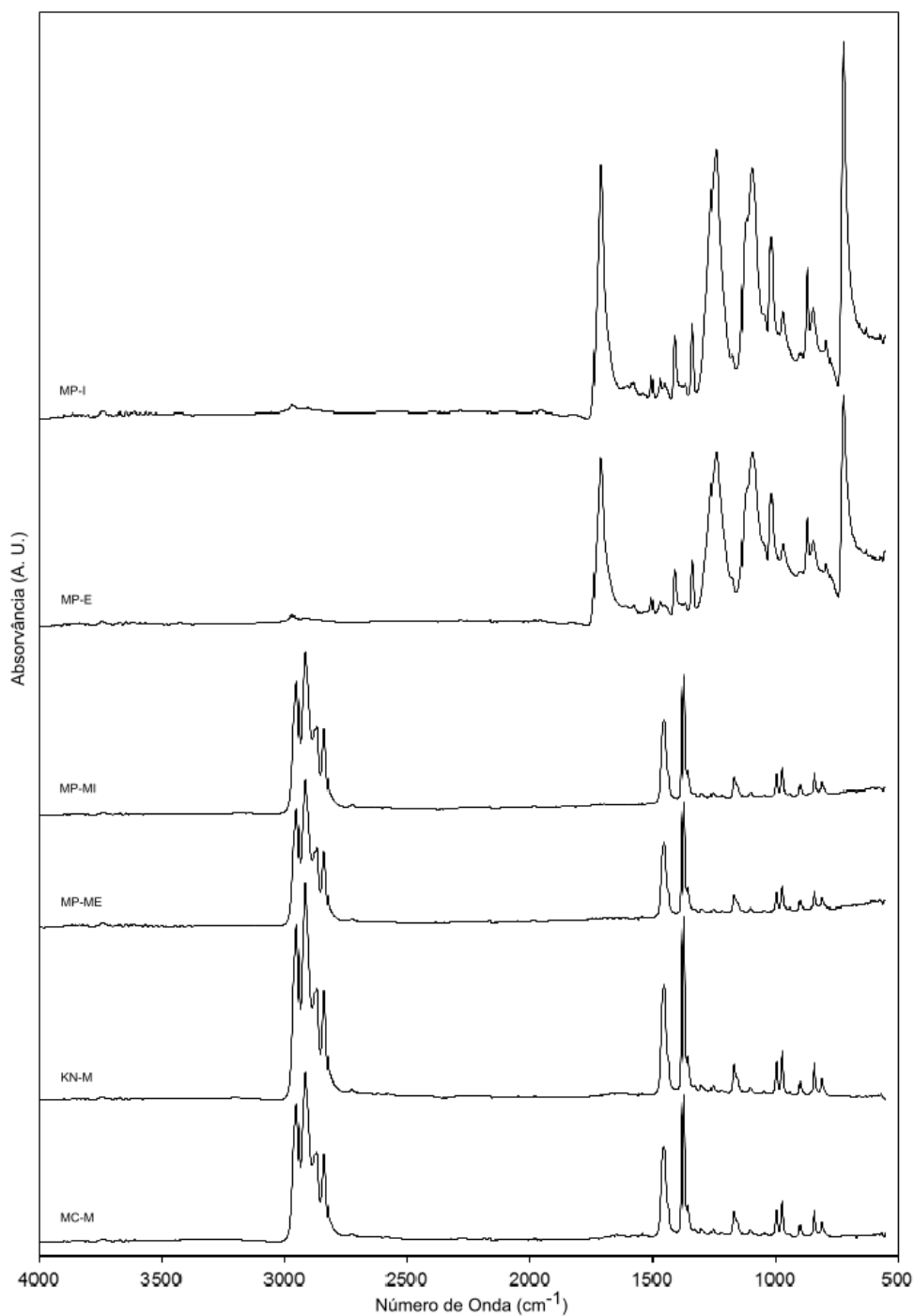




---

**Apêndice 2:**  
**Resultados EITF-RTA**





**Figura Suplementar 2.** Espectros EITF-RTA das camadas à base de PP e de PET constituintes de DPRs não processados. MC, KN, MP correspondem a máscaras cirúrgicas, KN95 e de pano, respetivamente. Além disso, E, I, M, ME e MI indica camada externa, camada interna, camada intermédia, camada intermédia próxima à camada externa e camada intermédia próxima à camada interna, respetivamente.

**Tabela Suplementar 2.** Intervalos de números de onda observados das bandas atribuídas às camadas de polipropileno (PP) e polietileno tereftalato (PET) de todos os DPRs não processadas e processados.

PP		PET	
Atribuição do pico <sup>a</sup>	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição do pico <sup>b</sup>	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )
C-C	808-810	C-H	722-723
C-H	840-841	C-H	871-872
CH <sub>3</sub>	972-973	C-H	968-970
C-C		O=C-O-C	1016-1017
CH <sub>3</sub>	996-999	O=C-O-C	1092-1096
C-C		C-O	1240-1244
C-H	1166-1169	CH <sub>2</sub>	1339-1340
CH <sub>3</sub>		C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	1408-1409
CH <sub>3</sub>	1375-1376	C=O	1711-1714
CH <sub>3</sub>	1452-1457		
CH <sub>3</sub>	2866-2869		
CH <sub>2</sub>	2917		
CH <sub>3</sub>	2949-2951		

<sup>a</sup> Fang et al. (2012)

<sup>b</sup> Silva et al. (2012)

---

**Apêndice 3:**  
**Medições do ângulo de contacto**

**Tabela Suplementar 3.** Resultados dos ângulos de contacto da água estática das camadas de DPRs não processados e processados (10 ciclos) e análise estatística. MC, KN, MP correspondem a máscaras cirúrgicas, KN95 e de pano, respetivamente. E, I, M, ME e MI indica camada externa, camada interna, camada intermédia, camada intermédia próxima à camada externa e camada intermédia próxima à camada interna, respetivamente. Valores médios e desvios padrão são apresentados. As significâncias estatísticas também são indicadas (análise unilateral com o teste de Wilcoxon/Kruskal-Wallis).

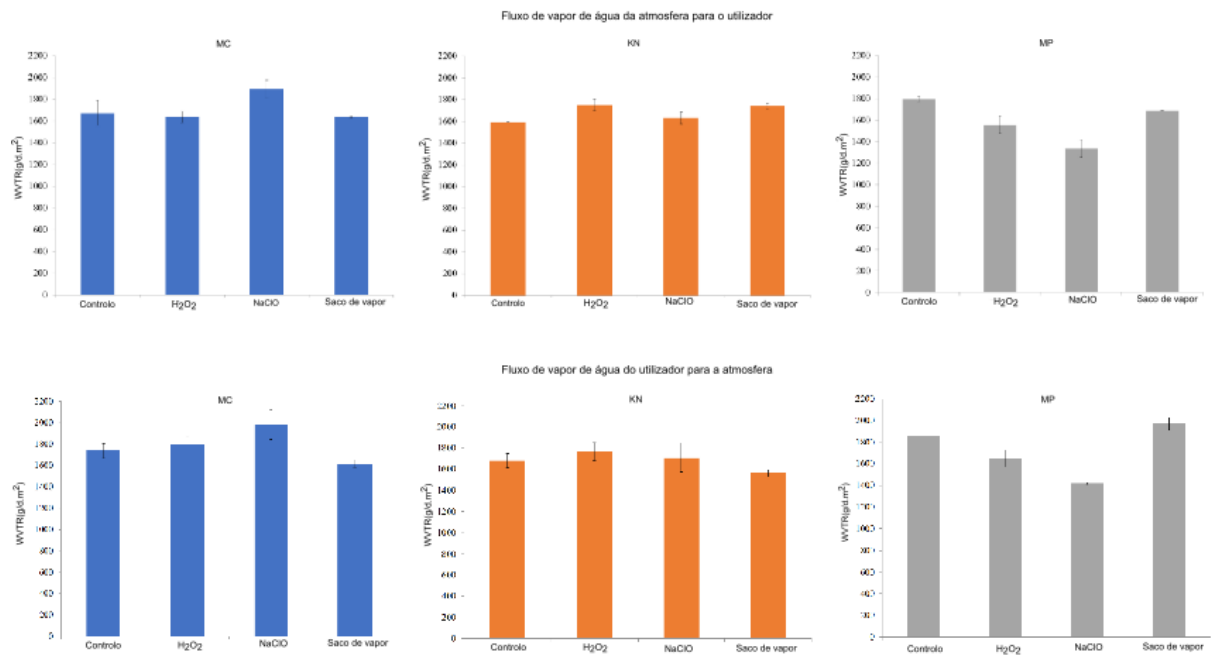
DPR	Camada	Ângulo de contacto (°)				valor- <i>p</i>		
		Controlo	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	NaClO	Saco de vapor	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	NaClO	Saco de vapor
MC	E	122.6±0.7	124.3±3.4	124.8±1.1	126.4±1.1	0.751	0.143	0.970
	I	122.6±0.9	129.4±1.1	123.9±2.1	127.1±1.4	0.048*	0.205	0.097
	M	122.6±1.3	126.0±1.0	124.2±6.4	137.2±2.5	0.970	0.267	0.003*
KN	E	115.4±0.7	107.3±3.6	111.1±2.1	107.1±2.5	0.108	0.011*	0.028*
	I	140.5±9.9	112.4±2.7	113.1±0.2	122.4±0.9	0.002*	0.003*	0.002*
	M	151.3±1.3	134.8±0.3	139.1±2.1	150.0±6.8	0.005*	0.050*	0.038*
MP	E	132.9±1.1	136.5±2.5	142.4±0.9	146.3±4.1	0.331	0.057	0.005*
	I	129.2±6.0	129.3±5.5	124.4±1.0	142.5±7.1	0.895	0.386	0.011*
	M	126.0±1.6	125.3±4.1	133.2±2.2	133.0±0.8	0.154	0.004*	0.013*

\* É considerada significância estatística quando o valor-*p* < 0.05 (teste de Wilcoxon/Kruskal-Wallis, baseado numa distribuição  $\chi^2$  com graus de liberdade igual ao número de níveis de resultados de ângulo de contacto menos um).

Nota: não foi possível determinar os ângulos de contato da água para a camada interna das máscaras MP devido à rápida absorção/vazamento de água através do tecido PET.

---

**Apêndice 4:**  
**Taxas de Transmissão de Vapor de Água (TTVA/WVTR)**



**Figura Suplementar 3.** Resultados das TTVA/WVTR (de 0 a 24 horas) para DPRs não processados e processados (10 ciclos). MC, KN, MP corresponde a máscaras cirúrgicas, KN95 e de pano, respetivamente. As experiências foram realizadas para o fluxo de vapor de água da atmosfera para o utilizador (acima) e para o fluxo de vapor de água do utilizador para a atmosfera (abaixo). Nas unidades TTVA/WVTR, d representa 1 dia = 24 horas.

**Tabela Suplementar 4.** Resultados TTVA/WVTR de DPRs não processados e processados (10 ciclos). MC, KN e MP corresponde a máscaras cirúrgicas, KN95 e de pano, respetivamente. E, I, M, ME e MI indica camada externa, camada interna, camada intermédia, camada intermédia próxima à camada externa e camada intermédia próxima à camada interna, respetivamente. Valores médios e desvios padrão são apresentados. Os valores médios e desvios padrão são apresentados. As significâncias estatísticas também são indicadas (análise unilateral com o teste de Wilcoxon/Kruskal-Wallis).

Direção do fluxo	DPR	Ciclos #	WVTR			valor- <i>p</i>		
			H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	NaClO	Saco de vapor	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	NaClO	Saco de vapor
Da atmosfera para o utilizador	MC	0	1676±108	1676±108	1676±108	0.320	0.123	0.156
		5	1753±55	1831±0	1811±14			
		10	1636±55	1889±83	1818±9			
	KN	0	1597±0	1597±0	1597±0	0.091	0.123	0.095
		5	1596±0	1694±28	1799±21			
		10	1752±55	1635±55	1921±32			
	MP	0	1811±28	1811±28	1811±28	0.165	0.102	0.156
		5	1792±0	1558±165	1839±32			
		10	1577±83	1344±83	1873±5			
Do utilizador para a atmosfera	MC	0	1739±69	1739±69	1739±69	0.651	0.156	0.156
		5	1694±138	1889±83	1643±26			
		10	1791±88	1983±139	1614±36			
	KN	0	1679±7	1679±7	1679±7	0.180	0.156	0.102
		5	1655±83	1636±55	1590±10			
		10	1770±55	1710±23	1562±18			
	MP	0	1860±27	1860±27	1860±27	0.156	0.180	0.102
		5	1714±110	1422±28	1475±45			
		10	1646±78	1419±11	1969±55			

É considerada significância estatística quando o valor-*p* < 0.05 (teste de Wilcoxon/Kruskal-Wallis, baseado numa distribuição  $\chi^2$  com graus de liberdade igual ao número de níveis de resultados de ângulo de contacto menos um). Nota: Nas unidades TTVA/WVTR, d representa 1 dia = 24 horas.



**Apêndice 5:**  
**Análise Termogravimétrica (ATG)**



**Tabela Suplementar 5.** Temperaturas de degradação iniciais e cinzas/massas residuais de camadas de DPRs não processados. MC, KN e MP corresponde a máscaras cirúrgicas, KN95 e de pano, respetivamente. E, I, M, ME e MI indica camada externa, camada interna, camada intermédia, camada intermédia próxima à camada externa e camada intermédia próxima à camada interna, respetivamente. Valores médios e desvios padrão são apresentados. Os valores médios e desvios padrão são apresentados.

DPR	Camada	T <sub>inicial</sub> (°C)	Massa residual (%)
MC	E	437.9±3.2	0.7±0.3
	I	437.9±0.9	0.4±0.1
	M	438.6±0.2	0.9±0.1
KN	E	438.6±0.8	0.8±0.0
	I	437.8±0.2	1.0±0.2
	M	372.0±0.0	0.1±0.3
MP	E	403.2±6.0	15.7±0.0
	I	403.2±0.2	16.3±1.4
	ME	437.4±0.4	0.4±0.3
	MI	436.6±0.2	0.8±0.1

---

**Apêndice 6:**  
**Calorimetria Exploratória Diferencial Modulada (CEDM)**

**Tabela Suplementar 6.** Temperaturas de fusão ( $T_f$ ) e de cristalização ( $T_c$ ) das camadas de DPRs não processados e processados (10 ciclos). MC, KN e MP corresponde a máscaras cirúrgicas, KN95 e de pano, respetivamente. E, I, M, ME e MI indica camada externa, camada interna, camada intermédia, camada intermédia próxima à camada externa e camada intermédia próxima à camada interna, respetivamente. Valores médios e desvios padrão são apresentados. Os valores médios e desvios padrão são apresentados.

Camadas de PP				Camadas de PET					
DPR	Ciclo	Camada-Tratamento	$T_f$ (°C)	DPR	Ciclo	Camada-Tratamento	$T_f$ (°C)	$T_c$ (°C)	
MC	0	E	164.1±0.5	MP	0	E	251.3±1.1	184.9±0.5	
	10	E-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	163.9±0.2		10	E-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	252.3±0.3	184.6±1.1	
	10	E-NaClO	162.9±0.2		10	E-NaClO	252.1±0.6	205.6±1.1	
	10	E-Saco a vapor	163.4±0.5		10	E-Saco a vapor	252.3±0.3	184.5±1.4	
	0	I	163.1±1.0		0	I	251.9±0.9	193.4±1.1	
	10	I-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	162.9±0.2		10	I-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	251.9±0.9	190.1±1.6	
	10	I-NaClO	163.9±0.7		10	I-NaClO	251.6±1.2	209.6±4.3	
	10	I-Saco a vapor	164.6±0.7		10	I-Saco a vapor	252.7±0.2	190.09±0.5	
	0	M	164.3±0.2						
	10	M-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	164.3±0.1						
	10	M-NaClO	164.5±0.4						
	10	M-Saco a vapor	163.8±0.9						
	KN	0	E		167.3±0.5				
		10	E-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		166.9±0.8				
		10	E-NaClO		166.7±0.3				
		10	E-Saco a vapor		167.4±0.1				
0		I	166.4±0.6						
10		I-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	166.7±1.1						
10		I-NaClO	166.3±0.2						
10		I-Saco a vapor	166.6±0.2						
0		M	164.1±0.0						
10		M-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	164.5±0.7						

	10	M-NaClO	164.5±0.2
	10	M-Saco a vapor	165.3±0.9
MP	0	ME	163.1±0.5
	10	ME-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	162.7±0.5
	10	ME-NaClO	163.8±0.7
	10	ME-Saco a vapor	162.4±0.9
	0	MI	162.5±0.7
	10	MI-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	162.4±0.7
	10	MI-NaClO	163.9±0.7
	10	MI-Saco a vapor	162.6±0.9

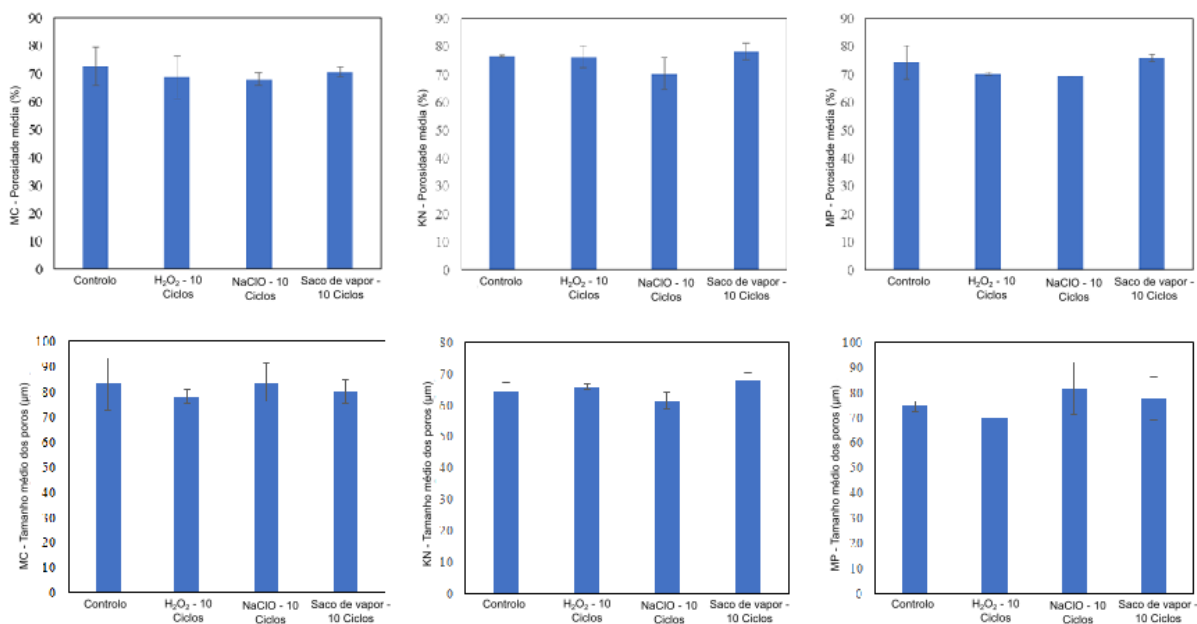
**Tabela Suplementar 7.** Análise estatística dos resultados de DSC (temperaturas de fusão e cristalização) e porosimetria por intrusão de mercúrio (% de porosidade) para DPRs não processados e processados (10 ciclos). MC, KN e MP corresponde a máscaras cirúrgicas, KN95 e de pano, respetivamente. E, I, M, ME e MI indica camada externa, camada interna, camada intermédia, camada intermédia próxima à camada externa e camada intermédia próxima à camada interna, respetivamente. Valores médios e desvios padrão são apresentados. As significâncias estatísticas também são indicadas (análise unilateral com o teste de Wilcoxon/Kruskal-Wallis).

Técnica/Propriedade	DPR	Camada	valor- <i>p</i>			
			H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	NaClO	Saco de vapor	
<b>DSC</b>	T <sub>f</sub>	E	0.683	0.121	0.221	
		MC	I	1.000	0.439	0.121
		M	0.683	0.439	0.683	
	KN	E	0.439	0.121	1.000	
		I	0.683	1.000	0.683	
		M	0.683	0.121	0.121	
	MP	E	0.221	0.439	0.221	
		ME	0.439	0.439	0.439	
		MI	0.683	0.121	0.683	
	T <sub>c</sub>	MP	I	0.439	0.683	0.1213
			E	1.000	0.121	1.000
	<b>Porosimetria por introdução de mercúrio</b>	Porosidade (%)	MC	Dispositivo completo	0.439	0.439
KN			Dispositivo completo	1.000	0.121	1.000
MP			Dispositivo completo	0.439	0.121	1.000

É considerada significância estatística quando o valor-*p* < 0.05 (teste de Wilcoxon/Kruskal-Wallis, baseado numa distribuição  $\chi^2$  com graus de liberdade igual ao número de níveis de resultados de ângulo de contacto menos um).

---

**Apêndice 7:**  
**Porosimetria por Intrusão de Mercúrio (PIM/MIP)**



**Figura Suplementar 4.** Porosidades (%) e tamanhos médios dos poros para DPRs não processados e processados (10 ciclos) determinados por porosimetria de intrusão por mercúrio. MC, KN e MP corresponde a máscaras faciais cirúrgicas (esquerda), KN95 (meio) e de pano (direita), respetivamente.

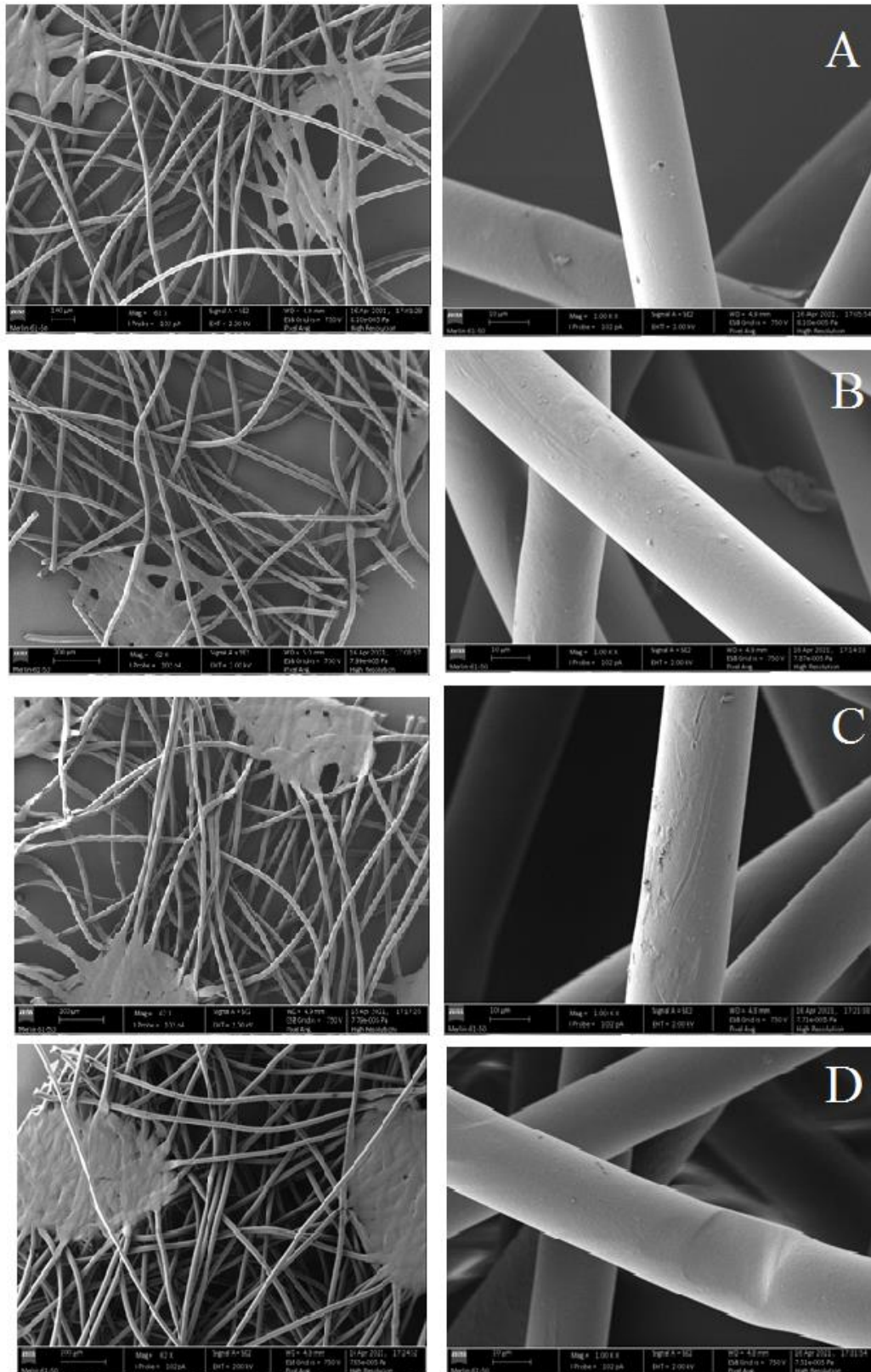
**Tabela Suplementar 8.** Porosidades (%) e diâmetros médios dos poros para DPRs não processados e processados (10 ciclos) determinados por porosimetria de intrusão por mercúrio. MC, KN e MP corresponde a máscaras faciais cirúrgicas, KN95 e de pano, respetivamente.

DPR	Ciclo	Tratamento	Porosidade (%)	Tamanho médio dos poros ( $\mu\text{m}$ )
MC	0	Controlo	$73 \pm 7$	$83 \pm 11$
	10	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	$69 \pm 8$	$78 \pm 3$
	10	NaClO	$68 \pm 2$	$84 \pm 8$
	10	Saco a vapor	$70 \pm 2$	$80 \pm 5$
KN	0	Controlo	$77 \pm 0$	$64 \pm 3$
	10	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	$76 \pm 4$	$66 \pm 1$
	10	NaClO	$70 \pm 6$	$62 \pm 3$
	10	Saco a vapor	$78 \pm 3$	$68 \pm 2$
MP	0	Controlo	$74 \pm 6$	$75 \pm 2$
	10	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	$70 \pm 0$	$70 \pm 7$
	10	NaClO	$69 \pm 0$	$82 \pm 10$
	10	Saco a vapor	$76 \pm 1$	$78 \pm 9$

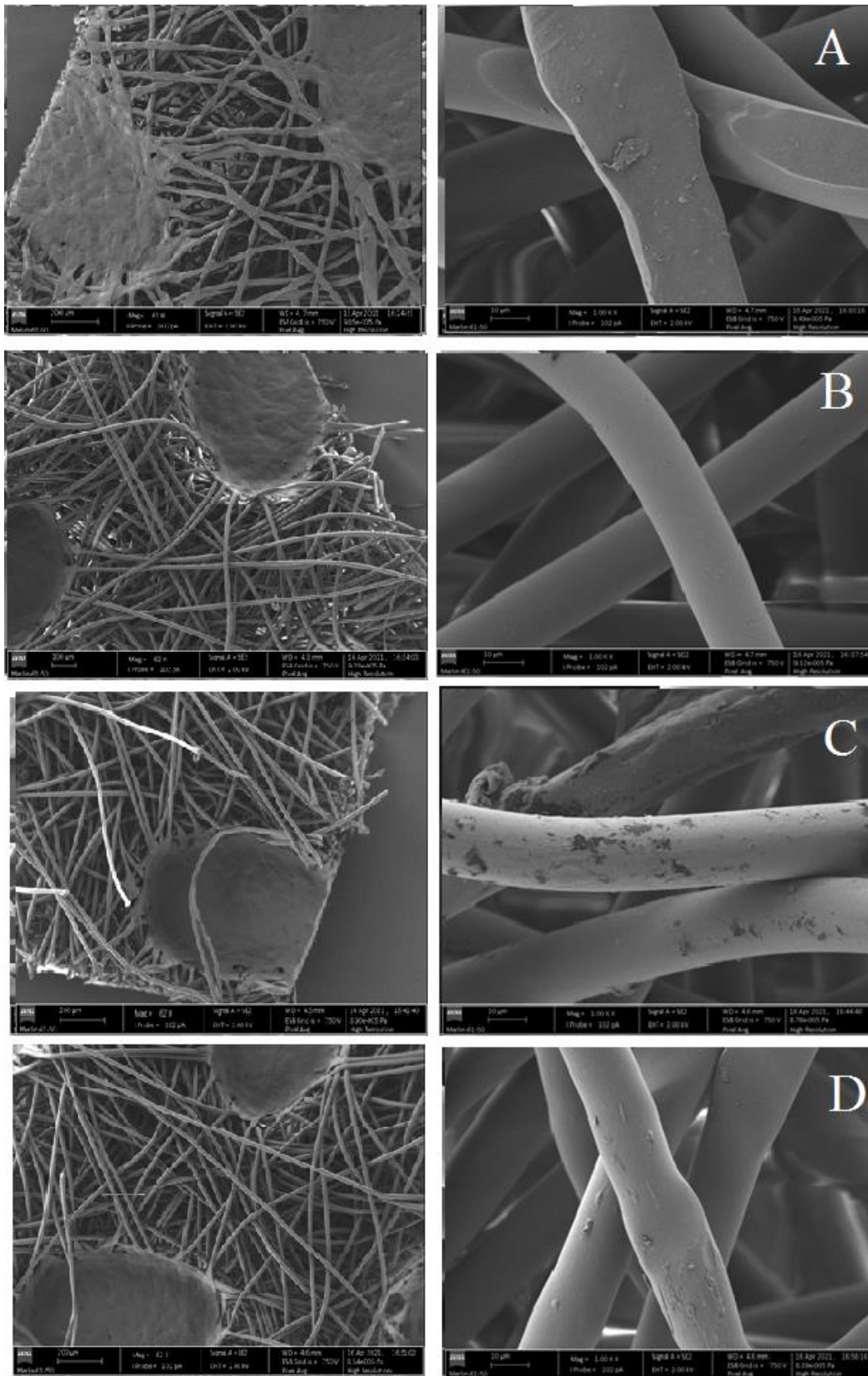


---

**Apêndice 8:**  
**Microscopia ótica e eletrónica**

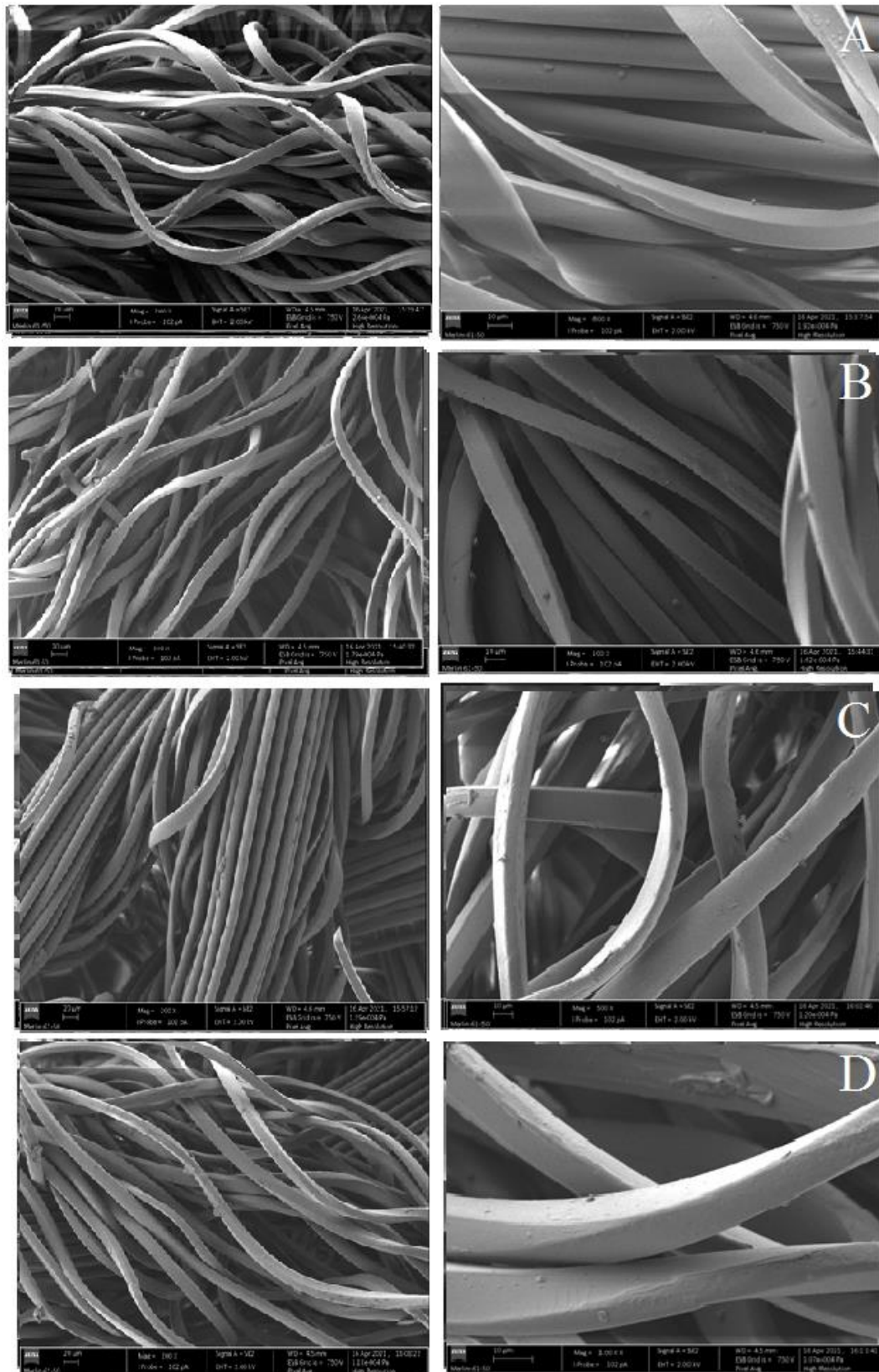


**Figura Suplementar 5.** Imagens SEM para máscaras cirúrgicas (MC). Esquerda: a barra corresponde a 200  $\mu\text{m}$ . Direita: a barra corresponde a 10  $\mu\text{m}$ . (A) Controlo/não processado; (B) 10 ciclos de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; (C) 10 ciclos de  $\text{NaClO}$ ; (D) 10 ciclos de saco de vapor.



**Figura Suplementar 6.** Imagens SEM para máscaras KN95 (KN). Esquerda: a barra corresponde a 200 μm. Direita: a barra corresponde a 10 μm. (A) Controlo/não processado; (B) 10 ciclos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; (C) 10 ciclos de NaClO; (D) 10 ciclos de saco de vapor.





**Figura Suplementar 7.** Imagens SEM para máscaras de pano (MP). Esquerda: a barra corresponde a 200 μm. Direita: a barra corresponde a 10 μm. (A) Controle/não processado; (B) 10 ciclos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; (C) 10 ciclos de NaClO; (D) 10 ciclos de saco de vapor.