

Valentina Caratto<sup>1,2</sup>, Lorenzo Ball<sup>3</sup>, Elisa Sanguineti<sup>1,2,4</sup>, Angelo Insorsì<sup>3</sup>, Iacopo Firpo<sup>3</sup>, Stefano Alberti<sup>1</sup>, Maurizio Ferretti<sup>1,2</sup>, Paolo Pelosi<sup>3</sup>

# Atividade antibacteriana de tubos endotraqueais revestidos com dióxido de titânio padrão e dopados com nitrogênio: um estudo *in vitro*

*Antibacterial activity of standard and N-doped titanium dioxide-coated endotracheal tubes: an in vitro study*

1. Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale, Università degli Studi di Genova, Genova, Italy.
2. Istituto CNR SPIN - Genova, Italy.
3. Dipartimento di Scienze Chirurgiche e Diagnostiche Integrate, Università degli Studi di Genova, Genova, Italy.
4. Dipartimento di Scienze della Terra, dell'Ambiente e della Vita, Università degli Studi di Genova, Genova, Italy.

## RESUMO

**Objetivo:** Avaliar a atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* de dois revestimentos endotraqueais com nanopartículas e fotocatalise sob luz visível.

**Métodos:** Testaram-se dois tipos de nanopartículas de titânio: anatase padrão (TiO<sub>2</sub>) e TiO<sub>2</sub> nano-dopada (N-TiO<sub>2</sub>). As nanopartículas foram colocadas em superfície interna de segmentos de tubos endotraqueais comerciais, aplicadas sobre um filtro de acetato de celulose; os tubos endotraqueais controle foram deixados sem revestimento de nanopartículas. Em cada tubo endotraqueal foi inoculado um total de 150 unidades formadoras de colônia e, a seguir, estes foram expostos a uma fonte de luz fluorescente (3700 lux, comprimento de onda de 300 - 700nm) por 5, 10, 20, 40, 60 e 80 minutos. Contaram-se as Unidades Formadoras de Colônia após 24 horas de incubação a 37°C. A inativação bacteriana foi calculada como a redução percentual do crescimento bacteriano em comparação a tubos não expostos à luz.

**Resultados:** Na ausência de luz, não se observou qualquer atividade

antibacteriana relevante contra qualquer das cepas estudadas. Para *P. aeruginosa*, ambos os revestimentos tiveram inativação bacteriana mais elevada do que o controle em qualquer dos momentos de avaliação ( $p < 0,001$ ), sendo que não se observaram diferenças entre o revestimento padrão e nano-dopado. Para *S. aureus*, a inativação foi maior que os controles, começando a partir de 5 minutos para nano-dopado ( $p = 0,018$ ) e 10 minutos para o revestimento padrão ( $p = 0,014$ ); a inativação com a forma nano-dopada foi maior do que com a forma padrão aos 20 minutos ( $p < 0,001$ ), 40 minutos ( $p < 0,001$ ) e 60 minutos ( $p < 0,001$ ).

**Conclusões:** O revestimento com nanopartículas de titânio comercial padrão e nano-dopado inibiu o crescimento bacteriano sob a luz fluorescente visível. o revestimento nano-dopado teve maior atividade antibacteriana contra *S. aureus* em comparação à atividade observada com o revestimento com anatase padrão.

**Descritores:** Pneumonia associada à ventilação mecânica; Intubação intratraqueal/instrumentação; Materiais revestidos biocompatíveis; Antibacterianos

**Conflitos de interesse:** Nenhum.

Submetido em 4 de novembro de 2016

Aceito em 9 de janeiro de 2017

## Autor correspondente:

Lorenzo Ball  
Dipartimento di Scienze Chirurgiche e Diagnostiche Integrate  
Largo Rosanna Benzi 8  
16100 Genova, Italy  
E-mail: lorenzo.ball@edu.unige.it

**Editor responsável:** Felipe Dal Pizzol

DOI: 10.5935/0103-507X.20170009

## INTRODUÇÃO

Pacientes na unidade de terapia intensiva (UTI) que são submetidos à ventilação mecânica correm risco de diversas complicações, inclusive pneumonia associada ao ventilador (PAV).<sup>(1)</sup> Apesar da heterogeneidade que se observa em sua definição,<sup>(2)</sup> a PAV é uma doença que pode afetar até um quarto de todos os pacientes ventilados mecanicamente,<sup>(3)</sup> e que tem o potencial de duplicar o risco de óbito e aumentar os custos dos cuidados, além da duração tanto da hospitalização quanto da ventilação mecânica.<sup>(4)</sup> Encontram-se em desenvolvimento

novas diretrizes e um conjunto de intervenções simples para identificação da PAV, assim como para reduzir sua incidência.<sup>(5-7)</sup>

Acredita-se que dois dos fatores que contribuem para a patogênese da PAV sejam a rápida colonização e a formação na superfície dos tubos endotraqueais (TET) de um biofilme de patógenos como *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.<sup>(8)</sup> Tais biofilmes constituem uma proteção ambiental das colônias bacterianas, que assim contribuem para a resistência a medicamentos antibacterianos.<sup>(9)</sup>

Propuseram-se diversos revestimentos antibacterianos internos para reduzir a colonização bacteriana dos TET, inclusive sulfadiazina de prata e clorexidina,<sup>(10)</sup> antibióticos<sup>(11)</sup> e dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) em nanopartículas isoladamente ou em associação com prata.<sup>(12)</sup> Propôs-se fotocatalise como um método adicional, para aumentar a atividade antimicrobiana dos revestimentos,<sup>(12,13)</sup> porém ela não tem sido empregada porque os catalisadores investigados nos primeiros estudos necessitavam de uma fonte de luz ultravioleta (UV) instalada ao lado do leito, para ativar o efeito antibacteriano. A fotocatalise é mais eficaz em bactérias *Gram*-negativas do que nas *Gram*-positivas, devido a diferenças na composição da parede celular.<sup>(14)</sup>

Recentemente, encontra-se em investigação o uso de formas modificadas de nanopartículas de TiO<sub>2</sub>, por sua capacidade de demonstrar atividade antibacteriana fotocatalítica no espectro da luz visível,<sup>(15-17)</sup> evitando assim o uso da potencialmente danosa luz UV e obtendo um efeito bactericida com uso de iluminação com luz fluorescente convencional,<sup>(18)</sup> amplamente disponível nos hospitais. O TiO<sub>2</sub> exibe sua atividade catalítica quando irradiado com luz UV e com luz visível, enquanto a ação de outros catalíticos, como nanopartículas de cobre<sup>(19,20)</sup> ou prata,<sup>(21)</sup> é principalmente explicada por sua composição química, pela liberação de íons de metal no meio de suspensão. Em verdade, para nanopartículas metálicas, é crucial o controle do tamanho, perfil, composição, propriedades físicas e químicas durante o processo de síntese; assim, utilizou-se TiO<sub>2</sub> em razão de sua custo-efetividade<sup>(22,23)</sup> e do fácil processo sintético, que parece ser muito mais fácil do que as técnicas utilizadas para sintetizar nanopartículas metálicas, como técnicas de eletrólise de anodo de sacrifício ou de plasma térmico.

O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a eficácia de duas formas de TiO<sub>2</sub> como agentes de revestimento interno de segmentos de tubos endotraqueais pelo exame de sua capacidade de inibir o crescimento de duas bactérias comumente envolvidas na pneumonia associada ao ventilador, *S. aureus* e *P. aeruginosa*, com utilização de fotocatalise sob luz visível. Nossa hipótese é que o uso da

técnica de nano-dopagem do TiO<sub>2</sub> poderia potencializar o efeito antibacteriano, também permitindo fotocatalise sob luz visível, especialmente em bactérias *Gram*-positivas, nas quais a fotocatalise é menos eficiente.

## MÉTODOS

Neste estudo, utilizaram-se duas formas diferentes de nanopartículas de TiO<sub>2</sub>: anatase comercialmente disponível (Sigma Aldrich, EUA) e uma forma de produção própria de TiO<sub>2</sub> nano-dopado (N-TiO<sub>2</sub>) cristalizado na estrutura da anatase. As partículas de N-TiO<sub>2</sub> foram sintetizadas utilizando o método sol-gel, conforme descrito em estudo prévio.<sup>(24)</sup> Em resumo, 37,5mL de isopropóxido de titânio (Sigma-Aldrich) com 70mL de 2-propanol (Sigma-Aldrich) e 9mL de solução aquosa de amônia (NH<sub>3</sub>) 15% V/V foram agitados em temperatura ambiente por 4 horas e, então, lavados com água deionizada e submetidos à secagem a 105°C por 12 horas. O xerogel foi finalmente moído para formar um pó fino e calcinado a 350°C por 1 hora, para completar o processo de cristalização.

Para caracterização das nanopartículas, utilizaram-se espectrofotometria difusa de reflexão (JASCO V-570 UV-VIS-NIR, Jasco Int. Co. Ltd., Japão), Brunauer-Emmett-Teller (BET, ASAP 2000, Micromeritics, EUA), difração de raios X no pó (XRPD, Philips gerador PW 1830, 40kV, 30mA) e microscopia eletrônica por transmissão de elétrons (TEM, JEOL JEM 2010, cristal de boreto de lantânio a 200kV). Para estudar as nanopartículas e as amostras, utilizou-se microscopia eletrônica de varredura (MEV) com espectroscopia de raios X de dispersão de energia (EDS; microscópio StereoScan 360, Leica Cambridge Instruments, Reino Unido). A análise com EDS foi realizada em áreas diferentes das amostras representativas, para estimar a composição química correspondente a cada um dos padrões morfológicos observados.

## Preparação dos segmentos de tubo endotraqueal e inoculação bacteriana

O TiO<sub>2</sub> foi colocado na superfície interna de um segmento de 5cm de tubo comercial de cloreto de polivinila de 8,0mm (Rüsch, Kern, Alemanha) aplicado em um filtro de acetato de celulose com tamanho dos poros de 0,45µm (Sartorius Stedim Biotech, Gottingen, Alemanha) a uma concentração de 0,052mg/cm<sup>2</sup> conforme previamente descrito.<sup>(17,25)</sup>

As culturas bacterianas foram desenvolvidas em meio de cultura *Luria Bertani* a 37°C, colhidas na fase de crescimento exponencial, lavadas e suspensas em solução de cloreto de sódio a 0,9% estéril, para obter uma contagem

final de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de  $30 \pm 5$  por mililitro, conforme verificado com uso da densidade óptica a 600nm (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha). Alíquotas de 5mm desta suspensão bacteriana foram filtradas no filtro de acetato de celulose ou no filtro de acetato de celulose tratado com  $\text{TiO}_2$  para depósito das UFC. O tamanho do inoculado foi utilizado a uma contagem de UFC similar ao utilizado em estudo prévio<sup>(17)</sup> demonstrando-se *in vitro* capaz de iniciar a formação de um biofilme.<sup>(26)</sup> O filtro foi depois inserido no segmento de TET. Escolheu-se um pequeno inoculado bacteriano para simular a colonização inicial no tubo, subsequentemente levando à formação de biofilme. As amostras de TET foram revestidas internamente com  $\text{TiO}_2$  ou N- $\text{TiO}_2$  em acetato de celulose, e os controles foram revestidos apenas com o acetato de celulose.

### Atividade fotocatalítica

Amostras dos TET controle foram expostas à luz fluorescente gerada por uma fonte comercial, um tubo de néon com emissão de luz com comprimento de onda de 300 - 700nm, e 3.700 lux de potência (Neon L36W/640, Osram, München, Alemanha) instalada a 15cm da saída dos TET com diferentes períodos de exposição: 5, 10, 20, 40, 60 e 80 minutos. A figura 1 ilustra a montagem experimental e a deposição de nanopartículas no filtro de acetato.

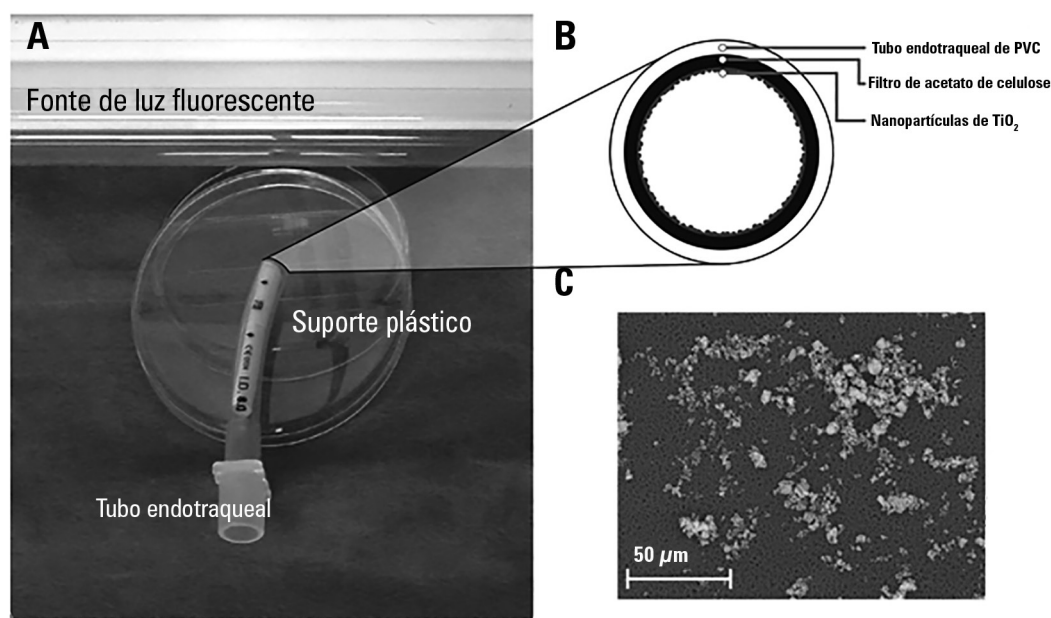
Ao final de cada período de exposição, os filtros de acetato com colônias bacterianas foram removidos dos TET e colocados a  $37^\circ\text{C}$  em meio ágar seletivo adequado: MacConkey ágar para *P. aeruginosa* e ágar manitol-sal para *S. aureus*. Após 24 horas de incubação a  $37^\circ\text{C}$ , contaram-se as UFC.

Segmentos limpos de TET foram recobertos com acetato de celulose sem  $\text{TiO}_2$  e colocados em sala escura após a inoculação bacteriana. Estes segmentos foram analisados nos mesmos momentos de avaliação das amostras e tubos controle, e foram utilizados como referência para calcular a inativação de contingente bacteriano não atribuível ao processo fotocatalítico.

A porcentagem de inativação (I) devida à atividade fotocatalítica foi calculada, como previamente descrito,<sup>(17)</sup> como a redução porcentual de UFC nas amostras e tubos controle em comparação aos TET limpos, usando a fórmula:  $I(\%) = (N_B - N) / N_B \cdot 100$ , onde  $N_B$  é o número de UFC no filtro sem  $\text{TiO}_2$  e sem exposição à luz (tubos limpos), e N é o número de UFC nos TET tratados com nanopartículas (amostra) ou não tratados (controle).

### Análise estatística

A cinética de inativação bacteriana foi calculada a partir dos dados de três medidas independentemente repetidas. Os dados foram comparados por Análise de Variância (ANOVA) de duas vias com teste *post hoc* de



**Figura 1** - Montagem experimental (painel A), esquema de revestimento do tubo (painel B); e deposição de nanopartículas no filtro de acetato (painel C).

Tukey, e considerou-se significância estatística para valores de  $p < 0,05$ . Os dados são relatados como média mais ou menos o desvio padrão ou porcentagem de inativação quando não diferentemente mencionado. Os dados experimentais foram avaliados com uso do *Statistical Package for the Social Science* (SPSS) versão 21 (IBM Corp, EUA).

## RESULTADOS

### Caracterização das nanopartículas de $\text{TiO}_2$

A análise de reflectância difusa revelou valores de absorção de comprimentos de onda de 384nm e 413nm, respectivamente, para  $\text{TiO}_2$  e N- $\text{TiO}_2$ , representando uma modificação do limite de absorção com o uso de N- $\text{TiO}_2$  em direção do espectro de luz visível. Análise de BET revelou os valores específicos de área de superfície de  $120\text{m}^2\text{g}^{-1}$  e  $96,8\text{m}^2\text{g}^{-1}$ , respectivamente, para as nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  e N- $\text{TiO}_2$ . As análises de XRPD e TEM revelaram que, tanto a forma comercial de  $\text{TiO}_2$ , quanto a estrutura de cristais de N- $\text{TiO}_2$ , continham anatase, respectivamente, com um tamanho de partícula de  $19\text{nm} \pm 2$  e  $17\text{nm} \pm 2$ .

### Cinética de inativação bacteriana

Na ausência de luz, não se observou qualquer atividade antibacteriana relevante contra ambas as cepas, tendo a inativação bacteriana após 80 minutos permanecido abaixo de 3,5% tanto para  $\text{TiO}_2$  quanto para N- $\text{TiO}_2$ .

A cinética de inativação para as duas cepas bacterianas sob irradiação de luz fluorescente é ilustrada pela figura 2. Nos TET expostos, na irradiação sem  $\text{TiO}_2$  (controles), foi encontrada inibição bacteriana que variou entre 1 - 18%, em razão da desidratação induzida pela irradiação.

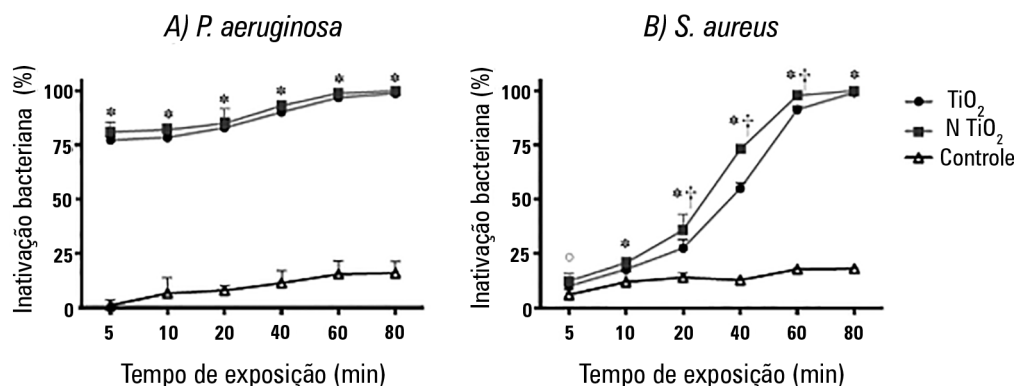
Para *P. aeruginosa*, todos os TET revestidos com  $\text{TiO}_2$  mostraram uma maior inativação bacteriana em comparação ao controle ( $p < 0,001$  em todos os momentos de avaliação); não se encontrou qualquer diferença significativa em todos os momentos de avaliação entre a forma comercial  $\text{TiO}_2$  e N- $\text{TiO}_2$  ( $p > 0,20$  em todos os momentos de avaliação).

Para *S. aureus*, a inativação foi mais elevada do que para os controles a partir de 5 minutos para N- $\text{TiO}_2$  ( $p = 0,018$ ) e 10 minutos para  $\text{TiO}_2$  ( $p = 0,014$ ). Para períodos de exposição acima de 10 minutos, ambos os revestimentos foram mais eficazes que o controle ( $p < 0,001$  em cada momento de avaliação). O revestimento com N- $\text{TiO}_2$  mostrou uma inativação maior que a obtida com  $\text{TiO}_2$  aos 20 minutos ( $p < 0,001$ ), 40 minutos ( $p < 0,001$ ) e 60 minutos ( $p < 0,001$ ) de exposição à luz.

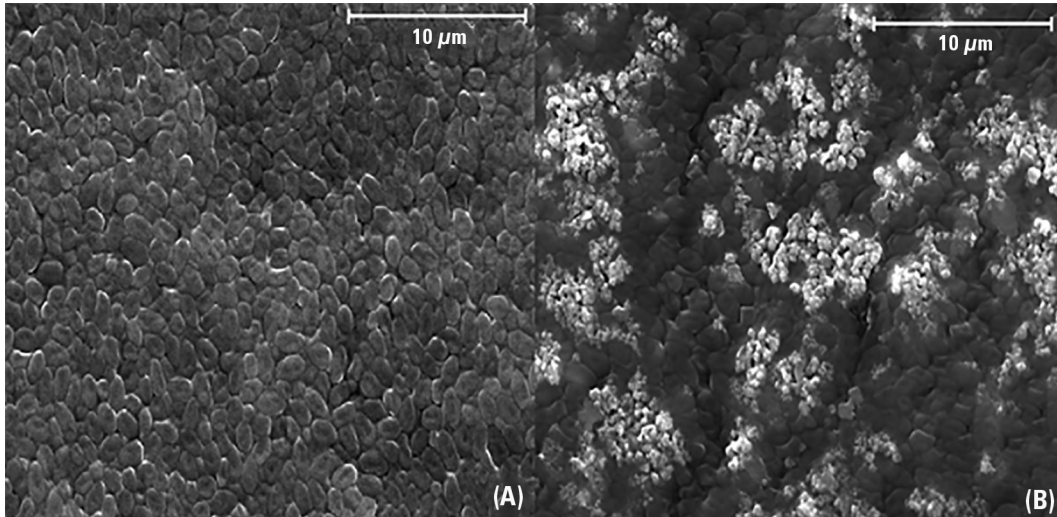
A figura 3 mostra imagens de MEV representativas de *P. aeruginosa* depositado na superfície interna de TET recobertos com  $\text{TiO}_2$  comercial antes (a) e após (b) 10 minutos de irradiação com luz fluorescente. A figura 4 é de uma amostra representativa de TET recobertos com N- $\text{TiO}_2$  inoculado com *P. aeruginosa* após 10 minutos de exposição à luz com análise espectral semiquantitativa de EDS.

## DISCUSSÃO

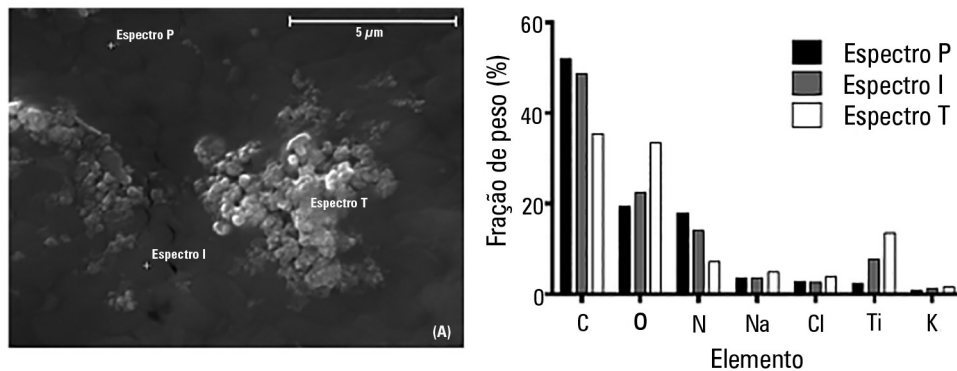
Os principais achados deste estudo são os seguintes: (1) na ausência de luz, nem N- $\text{TiO}_2$  nem  $\text{TiO}_2$  conseguiram inibir o crescimento bacteriano dentro de 80 minutos; (2) a fotocatalise sob luz fluorescente visível inibiu o crescimento bacteriano nos TET; (3) não se observou diferença na eficácia para inativação bacteriana entre N- $\text{TiO}_2$  e  $\text{TiO}_2$



**Figura 2** - Cinética de inativação de *Pseudomonas aeruginosa* (A) e *Staphylococcus aureus* (B) sob luz fluorescente. \* A inativação obtida com  $\text{TiO}_2$  e N- $\text{TiO}_2$  foi significativamente maior do que nos controles ( $p < 0,05$ ). ° Apenas N- $\text{TiO}_2$  foi mais ativo do que os controles ( $p < 0,05$ ). † N- $\text{TiO}_2$  mais ativo do que  $\text{TiO}_2$  ( $p < 0,05$ ).



**Figura 3** - Imagens de microscopia de varredura eletrônica (magnificação: x 4.000; tensão ultraelevada: 20 kV) de células de *Pseudomonas aeruginosa* não tratadas (A) e células de *Pseudomonas aeruginosa* tratadas (B) com utilização de irradiação com luz fluorescente comercial na presença de  $\text{TiO}_2$  comercial por 10 minutos.



**Figura 4** - Imagens de microscopia de varredura eletrônica de uma amostra representativa de tubos endotraqueais inoculados com *Pseudomonas aeruginosa* após 10 minutos de irradiação com luz fluorescente (painel à esquerda). P indica a área em que apenas a camada bacteriana é visível, T representa uma área onde apenas  $\text{TiO}_2$  é visível, e I representa uma região intermediária. O painel à direita mostra o peso das frações de elementos (%), segundo análise dos espectros de espectroscopia de dispersão de raios X de uma amostra representativa de *Pseudomonas aeruginosa* após 10 minutos de tratamento com  $\text{TiO}_2$  sob irradiação de luz fluorescente.

para *P. aeruginosa*; e (4) para *S. aureus*, a inativação bacteriana foi maior nos tubos revestidos com N- $\text{TiO}_2$  quando comparada aos tubos com  $\text{TiO}_2$ .

Este é o primeiro estudo a investigar a potencial aplicação clínica de N- $\text{TiO}_2$ . Diferentemente de estudos prévios, foi depositada uma pequena contagem de UFC no inoculado, mimetizando a contaminação inicial, que pode ocorrer *in vivo*. Medidas de absorvância confirmaram uma modificação no limite de absorção em direção à região de luz visível com uso de N- $\text{TiO}_2$  em comparação a  $\text{TiO}_2$ , devido à diminuição no intervalo de energia, o que explica a melhor eficácia do N- $\text{TiO}_2$  identificada no presente estudo.

### Mecanismo de inativação bacteriana

Tanto  $\text{TiO}_2$  quanto N- $\text{TiO}_2$  eram anatases, conforme relatado em artigos prévios,<sup>(17,24)</sup> e na presença de luz o controle não revestido demonstrou mínima atividade de inativação, devido à desidratação.<sup>(25)</sup> Conforme ilustra a figura 3, antes da irradiação (painel à esquerda), o  $\text{TiO}_2$  não era visível e estava completamente recoberto por uma manta bacteriana. Após exposição à luz visível (painel à direita), as áreas brancas corresponderam à camada subjacente de  $\text{TiO}_2$  visível e rodeada de resíduos bacterianos, assim como de células intactas. Sob análise por EDS, a presença de sódio e cloro se deu principalmente devido

à solução em que estavam suspensas as bactérias (cloreto de sódio a 0,9%) e apareceu homoganeamente distribuída nas três regiões, enquanto o carbono e o nitrogênio foram atribuíveis a componentes da célula bacteriana (proteínas e carboidratos), e Ti foi o fotocatalizador. O oxigênio é atribuível tanto a componentes orgânicos da célula bacteriana quanto ao  $\text{TiO}_2$ . No espectro da região P de EDS, a porcentagem de Ti foi baixa porque o  $\text{TiO}_2$  foi recoberto por uma manta bacteriana, enquanto o espectro da região I mostrou um aumento da fotocatalise, provavelmente em razão do dano à parede celular bacteriana, refletido por um crescimento simétrico do conteúdo de sódio e potássio intracelular. Finalmente, o espectro da região T, que corresponde à área na qual o  $\text{TiO}_2$  estava visível, indica uma elevada porcentagem de titânio, sódio e potássio, além de um baixo conteúdo de carbono e nitrogênio.

Estes achados sugerem que o contato direto entre as bactérias e  $\text{TiO}_2$  na superfície do filtro aumentou a extensão do dano oxidativo, acentuando a eliminação das bactérias em um tempo curto, segundo o mecanismo proposto por Foster et al.<sup>(27)</sup> Os autores sugeriram um mecanismo que envolve dano inicial nas áreas de contato entre as células e  $\text{TiO}_2$  que afeta a permeabilidade da membrana, seguido por um aumento do dano a todas as camadas da parede celular, que permite o extravasamento de pequenas moléculas como íons. Dano adicional à membrana permite o extravasamento de componentes com maior conteúdo molecular, como proteínas. Isto pode ser seguido por protrusão da membrana citoplasmática para o meio circundante, por meio de áreas degradadas de peptidoglicanos e, eventualmente, lise celular. Ocorre, então, a degradação dos componentes internos da célula, seguida por completa mineralização.

As vantagens do N- $\text{TiO}_2$  em comparação ao  $\text{TiO}_2$ , em termos de inativação bacteriana, não foram explicadas pelas diferentes formas cristalinas, já que ambas as nanopartículas foram feitas de anatase com tamanhos comparáveis. A ligeira diferença entre os valores de BET indica que os desempenhos diferentes das duas nanopartículas poderia, então, ser explicado pelo valor mais baixo do intervalo de energia, o que permite mais eficiência na absorção de fótons visíveis e na atividade fotocatalítica antimicrobiana. Deve-se também notar que a presença de átomos de *doping* na treliça de  $\text{TiO}_2$  acentua o aprisionamento de elétrons, que é um dos principais mecanismos envolvidos nos processos ativados por fotocatalise.

### Cinética da inativação bacteriana

Na ausência de luz fluorescente, as bactérias impregnadas na superfície interna dos TET foram insensíveis a

dois revestimentos com nanopartículas dentro da janela de tempo examinada.

No presente estudo, tanto  $\text{TiO}_2$  quanto N- $\text{TiO}_2$  demonstraram a inativação do crescimento de *P. aeruginosa* superior a 77% após 5 minutos de exposição (Figura 2). A atividade bactericida começou dentro de 5 ou 10 minutos, dependendo da cepa e do revestimento, e aumentou com tempo de irradiação mais longo. A inativação fotocatalítica parece ser similar à que se obteve em estudo prévio com *Escherichia coli*.<sup>(17)</sup>

Nos TET, inoculados com *S. aureus*, obtiveram-se taxas de inativação bacteriana comparáveis à obtidas para *P. aeruginosa* após 40 e 60 minutos, respectivamente, nas amostras tratadas com N- $\text{TiO}_2$  e  $\text{TiO}_2$ . Conforme demonstra a figura 2, após 5 minutos de exposição à luz, não houve diferenças significantes entre  $\text{TiO}_2$  e os tubos controle. Após 20, 40 e 60 minutos, observou-se maior atividade de N- $\text{TiO}_2$  em comparação a  $\text{TiO}_2$ , e para períodos mais longos de exposição (80 minutos), a inativação fotocatalítica atingiu um platô próximo a 100% ( $99 \pm 1$ )%. Estudos prévios avaliaram  $\text{TiO}_2$  comercial sem suplementação de exposição à luz e identificaram ausência de atividade contra *S. aureus*.<sup>(12)</sup>

A cinética da inativação fotocatalítica de *P. aeruginosa* foi igual para  $\text{TiO}_2$  e N- $\text{TiO}_2$  e mais rápida do que a observada para *S. aureus*, em concordância com os dados identificados por outros autores que observaram que bactérias Gram-positivas são mais resistentes à fotocatalise do que bactérias Gram-negativas.<sup>(12,27,28)</sup>

### Implicações clínicas

Segundo nossos achados, a irradiação com luz fluorescente pode ser suficiente para desencadear a atividade fotocatalítica de  $\text{TiO}_2$  e N- $\text{TiO}_2$  sem a necessidade de uma fonte de luz UV. Quando testado contra *S. aureus*, N- $\text{TiO}_2$  apresentou inativação bacteriana maior e mais rápida do que  $\text{TiO}_2$ . Nossos resultados sugerem que a fotocatalise sob luz fluorescente visível, especialmente com N- $\text{TiO}_2$ , pode ter aplicações clínicas.

Estes resultados mostraram que o uso de nanopartículas de N- $\text{TiO}_2$  pode prevenir de forma eficaz o crescimento de um pequeno inoculado bacteriano, quando exposto à luz fluorescente convencional; este achado pode ter diversas aplicações práticas. Materiais com revestimento de nanopartículas podem ser utilizados para prevenção ou redução da colonização bacteriana de equipamentos médicos, como mobília e superfícies de trabalho, especialmente em ambientes como a UTI, onde a elevada prevalência de cepas de bactérias multirresistentes demanda medidas não farmacológicas para controlar a disseminação de infecções.

É, portanto, importante incrementar as propriedades químicas, físicas e morfológicas deste material para melhorar a desinfecção sob luz visível e estudar a atividade de outros microrganismos. Neste estudo de bancada, as nanopartículas foram aplicadas nos TET depositadas em um filtro de acetato. Para aplicações clínicas, é necessário o desenvolvimento de um método para deposição das nanopartículas na matriz polimérica do tubo.

### Limitações do estudo

Uma importante limitação deste estudo é que só foi testada uma fonte de luz; assim, não fomos capazes de estimar um limite de irradiação de luz necessário para iniciar o processo fotocatalítico. Como os TET são colocados profundamente dentro da traqueia, novos estudos devem investigar se a transmissão da luz ambiente através da parede do tubo é suficiente para ativar a fotocatalise, ou se uma fonte de luz especificamente projetada deve ser colocada próxima para permitir a atividade antimicrobiana. Neste último caso, o fato de que N-TiO<sub>2</sub> é ativado de forma mais efetiva pela luz fluorescente, sem a necessidade de uma fonte de luz UV, aumentaria a viabilidade clínica desta abordagem. A eficácia do revestimento não foi testada contra um comparador ativo, como um revestimento com antibiótico. Entretanto, a emergência na UTI de cepas bacterianas multirresistentes a antibióticos encoraja a pesquisa de estratégias de controle da infecção que não dependam do uso de medicamentos antibióticos. Mais ainda, futuros estudos devem investigar a atividade antibacteriana de N-TiO<sub>2</sub> contra outras cepas bacterianas e sua aplicabilidade *in vivo*.

## CONCLUSÕES

Analisou-se a inativação fotocatalítica de *P. aeruginosa* e *S. aureus* por TiO<sub>2</sub> comercial e N-TiO<sub>2</sub> sintetizado. O produto comercial de nanopartículas TiO<sub>2</sub> e N-TiO<sub>2</sub> inibem o crescimento bacteriano sob a luz fluorescente visível. N-TiO<sub>2</sub> teve uma maior atividade antibacteriana contra *S. aureus* em comparação a TiO<sub>2</sub>. Os resultados deste estudo mostram que a fotocatalise com o método usando N-TiO<sub>2</sub> foi uma ferramenta eficaz para inativação bacteriana. Segundo nossos achados, a irradiação com luz natural ou com iluminação ambiente pode ser suficiente para ativação de N-TiO<sub>2</sub>, de forma que este método de desinfecção poderia funcionar continuamente.

## AGRADECIMENTOS

Os autores desejam expressar sua gratidão a Cristina Bernini e Laura Negretti por sua ajuda na caracterização com a microscopia de varredura eletrônica. O trabalho foi parcialmente financiado pelo MIUR italiano, por meio do projeto FIRB RBAP115AYN, *Oxides at the nanoscale: multifunctionality and applications*.

## Contribuição dos autores

V. Caratto e L. Ball contribuíram igualmente para este manuscrito. V. Caratto, L. Ball e E. Sanguineti delinearam o estudo, coletaram os dados, redigiram e revisaram o manuscrito. M. Ferretti e P. Pelosi delinearam o estudo, interpretaram os resultados, redigiram e revisaram o manuscrito. I. Firpo e S. Alberti coletaram os dados e revisaram o manuscrito. L. Ball e A. Insorsi realizaram a análise dos dados e revisaram o manuscrito. Todos os autores revisaram a versão final do manuscrito.

## ABSTRACT

**Objective:** The aim of this study was to assess the antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* of two nanoparticle endotracheal tube coatings with visible light-induced photocatalysis.

**Methods:** Two types of titanium dioxide nanoparticles were tested: standard anatase (TiO<sub>2</sub>) and N-doped TiO<sub>2</sub> (N-TiO<sub>2</sub>). Nanoparticles were placed on the internal surface of a segment of commercial endotracheal tubes, which were loaded on a cellulose acetate filter; control endotracheal tubes were left without a nanoparticle coating. A bacterial inoculum of 150 colony forming units was placed in the endotracheal tubes and then exposed to a fluorescent light source (3700 lux, 300-700 nm wavelength) for 5, 10, 20, 40, 60 and 80 minutes. Colony forming units were counted after 24 hours of incubation at 37°C. Bacterial inactivation was calculated as the percentage reduction of bacterial growth compared to endotracheal tubes not exposed to light.

**Results:** In the absence of light, no relevant antibacterial activity was shown against neither strain. For *P. aeruginosa*, both coatings had a higher bacterial inactivation than controls at any time point ( $p < 0.001$ ), and no difference was observed between TiO<sub>2</sub> and N-TiO<sub>2</sub>. For *S. aureus*, inactivation was higher than for controls starting at 5 minutes for N-TiO<sub>2</sub> ( $p = 0.018$ ) and 10 minutes for TiO<sub>2</sub> ( $p = 0.014$ ); inactivation with N-TiO<sub>2</sub> was higher than that with TiO<sub>2</sub> at 20 minutes ( $p < 0.001$ ), 40 minutes ( $p < 0.001$ ) and 60 minutes ( $p < 0.001$ ).

**Conclusions:** Nanosized commercial and N-doped TiO<sub>2</sub> inhibit bacterial growth under visible fluorescent light. N-TiO<sub>2</sub> has higher antibacterial activity against *S. aureus* compared to TiO<sub>2</sub>.

**Keywords:** Pneumonia, ventilator associated; Intubation, intratracheal/instrumentation; Titanium; Coated materials, biocompatible; Antibacterial agents

## REFERÊNCIAS

- Klompas M, Anderson D, Trick W, Babcock H, Kerlin MP, Li L, Sinkowitz-Cochran R, Ely EW, Jernigan J, Magill S, Lyles R, O'Neil C, Kitch BT, Arrington E, Balas MC, Kleinman K, Bruce C, Lankiewicz J, Murphy MV, E Cox C, Lautenbach E, Sexton D, Fraser V, Weinstein RA, Platt R; CDC Prevention Epicenters. The preventability of ventilator-associated events. The CDC Prevention Epicenters Wake Up and Breathe Collaborative. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;191(3):292-301.
- Dalmora CH, Deuschendorf C, Nagel F, dos Santos RP, Lisboa T. Defining ventilator-associated pneumonia: a (de)construction concept. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2013;25(2):81-6.
- Rello J, Ollendorf DA, Oster G, Vera-Llonch M, Bellm L, Redman R, Kollef MH; VAP Outcomes Scientific Advisory Group. Epidemiology and outcomes of ventilator-associated pneumonia in a large US database. *Chest*. 2002;122(6):2115-21.
- Safdar N, Dezfulian C, Collard HR, Saint S. Clinical and economic consequences of ventilator-associated pneumonia: a systematic review. *Crit Care Med*. 2005;33(10):2184-93.
- American Thoracic Society; Infectious Diseases Society of America. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171(4):388-416.
- Eom JS, Lee MS, Chun HK, Choi HJ, Jung SY, Kim YS, et al. The impact of a ventilator bundle on preventing ventilator-associated pneumonia: a multicenter study. *Am J Infect Control*. 2014;42(1):34-7.
- Ataee RA. To: The use of 2% chlorhexidine gel and toothbrushing for oral hygiene of patients receiving mechanical ventilation: effects on ventilator-associated pneumonia. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2014;26(4):438-9.
- Adair CG, Gorman SP, Feron BM, Byers LM, Jones DS, Goldsmith CE, et al. Implications of endotracheal tube biofilm for ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med*. 1999;25(10):1072-6.
- Loo CY, Lee WH, Young PM, Cavaliere R, Whitchurch CB, Rohanizadeh R. Implications and emerging control strategies for ventilator-associated infections. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2015;13(3):379-93.
- Berra L, Kolobow T, Laquerriere P, Pitts B, Bramati S, Pohlmann J, et al. Internally coated endotracheal tubes with silver sulfadiazine in polyurethane to prevent bacterial colonization: a clinical trial. *Intensive Care Med*. 2008;34(6):1030-7.
- Tarquinio K, Confreda K, Shurko J, LaPlante K. Activities of tobramycin and polymyxin E against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm-coated medical grade endotracheal tubes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(3):1723-9.
- Tarquinio KM, Kothurkar NK, Goswami DY, Sanders RC Jr, Zaritsky AL, LeVine AM. Bactericidal effects of silver plus titanium dioxide-coated endotracheal tubes on *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Int J Nanomedicine*. 2010;5:177-83.
- Berra L, Curto F, Li Bassi G, Laquerriere P, Pitts B, Baccarelli A, et al. Antimicrobial-coated endotracheal tubes: an experimental study. *Intensive Care Med*. 2008;34(6):1020-9.
- Machado MC, Tarquinio KM, Webster TJ. Decreased *Staphylococcus aureus* biofilm formation on nanomodified endotracheal tubes: a dynamic airway model. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:3741-50.
- Wolfum EJ, Huang J, Blake DM, Maness PC, Huang Z, Fiest J, et al. Photocatalytic oxidation of bacteria, bacterial and fungal spores, and model biofilm components to carbon dioxide on titanium dioxide-coated surfaces. *Environ Sci Technol*. 2002;36(15):3412-9.
- Li Q, Mahendra S, Lyon DY, Brunet L, Liga MV, Li D, et al. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: potential applications and implications. *Water Res*. 2008;42(18):4591-602.
- Caratto V, Aliakbarian B, Casazza AA, Setti L, Bernini C, Perego P, et al. Inactivation of *Escherichia coli* on anatase and rutile nanoparticles using UV and fluorescent light. *Mater Res Bull*. 2013;48(6):2095-101.
- Liou JW, Chang HH. Bactericidal effects and mechanisms of visible light-responsive titanium dioxide photocatalysts on pathogenic bacteria. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2012;60(4):267-75.
- Ren G, Hu D, Cheng EW, Vargas-Reus MA, Reip P, Allaker RP. Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. *Int J Antimicrob Agents*. 2009;33(6):587-90.
- Cioffi N, Torsi L, Ditaranto N, Tantillo G, Ghibelli L, Sabbatini L, et al. Copper Nanoparticle/polymer composites with antifungal and bacteriostatic properties. *Chem Mater*. 2005;17(21):5255-62.
- Sondi I, Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci*. 2004;275(1):177-82.
- Mathur A, Parashar A, Chandrasekaran N, Mukherjee A. Nano-TiO<sub>2</sub> enhances biofilm formation in a bacterial isolate from activated sludge of a waste water treatment plant. *Int Biodeterior Biodegrad*. 2017;116:17-25.
- Qiang L, Shi X, Pan X, Zhu L, Chen M, Han Y. Facilitated bioaccumulation of perfluorooctanesulfonate in zebrafish by nano-TiO<sub>2</sub> in two crystalline phases. *Environ Pollut*. 2015;206:644-51.
- Caratto V, Setti L, Campodonico S, Carnasciali MM, Botter R, Ferretti M. Synthesis and characterization of nitrogen-doped TiO<sub>2</sub> nanoparticles prepared by sol-gel method. *J Sol-Gel Sci Technol*. 2012;63(1):16-22.
- Caballero L, Whitehead KA, Allen NS, Verran J. Inactivation of *Escherichia coli* on immobilized TiO<sub>2</sub> using fluorescent light. *J Photochem Photobiol Chem*. 2009;202(2-3):92-8.
- Barros J, Grenho L, Manuel CM, Ferreira C, Melo L, Nunes OC, et al. Influence of nanohydroxyapatite surface properties on *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. *J Biomater Appl*. 2014;28(9):1325-35.
- Foster HA, Ditta IB, Varghese S, Steele A. Photocatalytic disinfection using titanium dioxide: spectrum and mechanism of antimicrobial activity. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011;90(6):1847-68.
- Kim B, Kim D, Cho D, Cho S. Bactericidal effect of TiO<sub>2</sub> photocatalyst on selected food-borne pathogenic bacteria. *Chemosphere*. 2003;52(1):277-81.