

Maria Eduarda de Albuquerque Martins

Estudo de díodos emissores de luz para desinfecção de água

Mestrado em Biologia Molecular e Microbiana

Trabalho efetuado sob a supervisão de:

Dr^a.: Vanessa Pereira

Dr^a.: Margarida Ribau Teixeira



Faculdade de Ciências e Tecnologias

2024

Declaração de autoria de trabalho
Estudo de díodos emissores de luz para desinfecção de água

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

(Maria Eduarda de Albuquerque Martins)

Copyright © Maria Eduarda de Albuquerque Martins

A Universidade do Algarve reserva para si o direito, em conformidade com o disposto no Código do Direito de Autor e dos Direitos Conexos, de arquivar, reproduzir e publicar a obra, independentemente do meio utilizado, bem como de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição para fins meramente educacionais ou de investigação e não comerciais, conquanto seja dado o devido crédito ao autor e editor respetivos

Este trabalho foi desenvolvido no Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica (iBET), sob a supervisão de Vanessa Pereira e Ana Paula Marques.

Margarida Ribau Teixeira foi a supervisora interna, designada para orientar no âmbito do Mestrado em Biologia Molecular e Microbiana da Universidade do Algarve.



Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer à minha orientadora doutora Vanessa Pereira, pelo apoio constante e todo conhecimento transmitido durante a realização deste trabalho, bem como por toda a confiança depositada. Quero também agradecer à doutora Ana Paula Marques por toda a ajuda e sugestões transmitidas no decorrer deste ano.

Não posso deixar de agradecer ao João Sérgio pela sua contribuição numa parte importante da realização deste trabalho e às minhas colegas de laboratório, Carolina Santos e Kátia Luz por todos os momentos partilhados, ajuda e bom convívio, durante todo o processo.

Agradeço à minha orientadora interna doutora Margarida Ribau Teixeira por proporcionar a conexão entre o iBET e a Universidade do Algarve.

Para além disso, queria deixar um agradecimento especial aos meus pais e amigos, que sempre me apoiaram e motivaram, ao longo de todo o processo.

Quero ainda agradecer à Fundação para a Ciência e a Tecnologia o financiamento deste trabalho através do projeto LEDeffect, PTDC/EAM-AMB/1561/2021.

Resumo

A água é um recurso essencial à vida e, portanto, a sua qualidade deve ser preservada. Assim sendo, é essencial desenvolver processos de desinfecção eficazes que possam inativar uma variedade de microrganismos presentes nas diferentes fontes de água. A radiação ultravioleta é extremamente eficaz para garantir a inativação de vários microrganismos presentes em água eliminando ou reduzindo a utilização de desinfetantes químicos. Devido às suas vantagens, os díodos emissores de luz ultravioleta C podem vir a substituir as lâmpadas UV de mercúrio usadas para desinfecção de água.

Os ensaios realizados no âmbito deste trabalho tiveram como objetivo principal comparar a eficiência de díodos que emitem luz a diferentes comprimentos de onda (255, 260, 265, 270 e 280 nm) na inativação de microrganismos indicadores de contaminação fecal: *Escherichia coli* e *Enterococcus faecium*.

Os resultados obtidos revelaram que os díodos emissores de luz foram extremamente eficazes quer na inativação de bactérias inoculadas em tampão fosfato, quer na inativação de microrganismos presentes em matrizes de água superficial. A eficiência de inativação foi verificada com todos os comprimentos de onda testados. Uma dose de UV baixa (9 mJ/cm^2) garantiu uma inativação superior a 6-logs das bactérias alvo inoculadas em tampão fosfato.

As amostras foram comparadas antes e após a exposição aos UV LEDs em termos da morfologia das células e da formação de dímeros de ciclobutano pirimidina. A quantidade de dímeros de ciclobutano pirimidina formados após exposição à mesma dose (9 mJ/cm^2) de UV foi semelhante independentemente das bactérias alvo e dos comprimentos de onda emitidos pelos LEDs.

Os resultados obtidos neste estudo foram promissores no que diz respeito à inativação dos microrganismos alvo, com recurso a UV LEDs. Dessa forma, é possível que esta tecnologia de desinfecção venha a tornar-se num processo de desinfecção eficaz aplicável em estações de tratamento de água.

Palavras-chave: Tratamento de águas; Díodos emissores de luz ultravioleta; Desinfecção; Indicadores de contaminação fecal; Inativação bacteriana.

Abstract

Implementing effective disinfection water treatment technologies can enhance public health protection by eliminating harmful microorganisms and ensuring access to safe drinking water, which is essential for supporting life. The use of ultraviolet radiation is extremely effective to inactivate a wide range of microorganisms and is highly advantageous since it eliminates or decreases the need for chemical disinfectants.

UV-LEDs technology is gaining interest in water disinfection due to its advantages over traditional UV mercury lamps. This research study was conducted to test the effectiveness of LEDs that emit light at different wavelengths (255, 260, 265, 270 and 280 nm) to inactivate two different bacteria used as fecal indicators of water quality: *Escherichia coli* and *Enterococcus faecium*. The results obtained revealed that three small light-emitting diodes were effective in inactivating bacteria spiked in phosphate buffer saline solutions, as well as in inactivating microorganisms present at occurrence levels in real surface water matrices.

Low UV fluences (9 mJ/cm^2) guaranteed an inactivation greater than 6-logs of the two target bacteria spiked in phosphate buffer. To understand the effect of LEDs that emit light at different wavelengths on the morphology of cells, samples collected after exposure to this same UV fluence (9 mJ/cm^2) were compared with samples not exposed to the LEDs. Fluorescence microscopy images were analysed to evaluate cell morphology damages after exposure to UV LEDs. The formation of cyclobutane pyrimidine dimers was also measured and the concentration of dimers detected was similar regardless of the target bacteria tested and the wavelength emitted by the LEDs.

The results obtained in this study show that LEDs that emit light at different UV-C wavelengths are promising to inactivate bacteria used as faecal indicators of water quality. This technology may, in the future, become an effective disinfection process applicable in water treatment plants.

Keywords: Water treatment; Ultraviolet light emitting diodes; Disinfection; Indicators of faecal contamination in water; Inactivation of bacteria

Lista de Abreviaturas

CPD – Dímeros de ciclobutano pirimidina

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

ETAR – Estação de tratamento de águas residuais

β -GAL – Beta-Galactosidase

β -GLUC – Beta-Glucuronidase

ISO – Organização Internacional para Normalização

NMP – Número mais provável

MUG – 4-metil-umbeliferona

OMS – Organização Mundial de Saúde

LEDs – Díodos emissores de luz

6-4PP – Fotoprodutos de (6-4) pirimidina-pirimidona rpm – Rotações por minuto

TSA – Agar Triptona de Soja

UFC – Unidade Formadora de Colónia

UV – Ultravioleta

VMA – Valor Máximo Admissível

VMR – Valor Máximo Recomendado

LP-UV – Lâmpada Ultravioleta de Baixa Pressão

MP-UV – Lâmpada Ultravioleta de Média Pressão

ST – Sólidos Totais

TDS – Sólidos Totais dissolvidos

SST – Sólidos Suspensos Totais

ROS- Espécies Reativas de oxigénio

Lista de Unidades

°C – graus Celsius

h – Hora

L – Litro

mJ – milijoule

µg – microgramas

µW – microwatt

mg – miligramas

mL – mililitro

nm – nanómetro

cm² – centímetros quadrados

Índice

Agradecimentos	v
Resumo	vi
Abstract	vii
Lista de Abreviaturas	viii
Lista de Unidades.....	ix
1. Introdução.....	1
1.1 Desinfecção de água com recurso a radiação ultravioleta.....	1
1.2 LEDs como uma alternativa à inativação através de radiação UV	4
1.3 Bactérias como indicadores de contaminação fecal.....	6
1.4 Células Bacterianas: Bactérias Gram positivas e Gram negativas.....	8
1.5 Principais Objetivos	11
2. Materiais e métodos	12
2.1 Ensaios de inativação.....	12
2.1.1 Determinação da dose de UVs emitida por diferentes UV-LEDs.....	14
2.1.2 Ensaios de inativação de <i>Escherichia coli</i> e <i>Enterococcus faecium</i> fortificadas em soluções de tampão fosfato	15
2.2 Recolha e caracterização de amostras de água superficial	17
2.2.1 Caracterização microbiológica das amostras de água reais	18
2.2.2 Isolamento de <i>Enterococcus faecium</i> de amostras de água superficial	19
2.2.3 Análise de teor em sólidos das amostras.....	20
2.3 Análise de mecanismos de inativação	22
2.3.1 Danos morfológicos.....	22
2.3.2 Formação de dímeros	23
2.4 Análise dos dados.....	24
3. Resultados e Discussão.....	25

3.1	Ensaio de inativação com LEDs	25
3.1.1	Medições da intensidade dos UV LEDs	25
3.1.2	Ensaio de inativação de <i>Escherichia coli</i> e <i>Enterococcus faecium</i> em solução tampão fosfato.....	28
3.1.3	Ensaio de inativação em amostras reais.....	33
3.1.3.1	Caracterização das amostras de água superficial.....	33
3.1.3.2	Ensaio de inativação em água superficial.....	35
3.2	Análise de mecanismos de inativação	37
3.2.1	Danos morfológicos.....	37
3.2.2	Formação de dímeros	39
4.	Conclusão	41
5.	Referências Bibliográficas	42
6.	Anexo.....	48

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Espectro de emissão de luz ultravioleta. (Realizado em: Biorender).....	2
Figura 1.2 - Dímeros de pirimidina e fotoprodutos de pirimidina, formados no DNA após a exposição à radiação UV-C. Adaptado de Gharbi <i>et al.</i> , 2020.....	3
Figura 1.3 - Estrutura da membrana plasmática de: A-Bactéria Gram positiva; B-Bactéria Gram negativa. Realizado em: Biorender.....	8
Figura 2.1 - Montagem do sistema para ensaios de inativação, com díodos emissores de luz ultravioleta C. A - Reator UV LED. B - Suporte cilíndrico que permite o posicionamento do reator UV LED. C - Peça que permite a refrigeração da amostra a inativar, bem como o posicionamento correto do sistema de UV LEDs. D - Caixa preta, para proteção do utilizador contra a radiação, que é emitida durante o ensaio.....	13
Figura 2.2 - Sistema de medição da intensidade da radiação emitida pelos LEDs,A-Reator UVLED (AquiSense Technologies, USA). B- Radiómetro (SpectriLight International Light Technologies ILT950-UV).....	14
Figura 2.3 - Mapa ilustrativo da zona de recolha de amostras de água. A-Praia de Algés Fonte: Google Earth 2018 consultado a 17/05/2023.....	17
Figura 3.1 - Intensidade de luz emitida pelos diferentes LEDs testados neste trabalho.....	26
Figura 3.2 - Espectro de Intensidade de luz emitida pelos diferentes LEDs testados neste trabalho antes (A), (C), (E), (G), (I) e depois (B), (D), (F), (H) e (J) da padronização.....	27
Figura 3.3 - Inativação de <i>Escherichia coli</i> [$\log (C_i/C)$] em função da dose de UVs de LEDs que emitem a diferentes comprimentos de onda A:(260; 270 e 280); B:(255 & 265 nm). As barras de erro representam os resultados obtidos em réplicas.....	28

Figura 3.4 - Inativação de *Enterococcus faecium* [$\log (C_i/C)$] em função da dose de UVs de LEDs que emitem a diferentes comprimentos de onda A:(260; 270 e 280) B:(255 e 265 nm). As barras de erro representam os resultados obtidos em réplicas realizadas em duplicado.....29

Figura 3.5 - Número mais provável de coliformes totais, *Escherichia coli* e enterococos por 100 mL de amostra de água superficial.....34

Figura 3.6 - Redução logarítmica [$\log (C_i/C)$] de coliformes totais, *E. coli* e enterococos presentes numa amostra de água superficial após exposição a LEDs que emitem a diferentes comprimentos de onda (dose de UVs 9 mJ/cm²); “>” significa que os microrganismos não foram detetados nas amostras recolhidas após inativação.....35

Figura 3.7 - Resultados da microscopia de fluorescência de *Escherichia coli* antes e após exposição a LEDs que emitem a diferentes comprimentos de onda (dose de 9mJ/cm²). 1^a coluna - Imagem de microscopia, com contraste de fase (cinzento); 2^a coluna - Coloração do DNA de *E. coli* com DAPI (azul); 3^a coluna - Coloração da membrana celular com o corante FM4-64.....38

Figura 3.8 - Concentrações padrão de dímeros de ciclobutano pirimidina (CPD) usadas para determinar as concentrações de CPD das amostras analisadas.....39

Figura 3.9 - Concentração de dímeros de ciclobutano pirimidina (CPD) formados no DNA de *E. coli* (A) e *E. faecium* (B) antes e após exposição a uma dose de UV de 9 mJ/cm² dos UV LEDs que emitem luz a diferentes comprimentos de onda: 260, 270 e 280 nm. As barras de erro representam os resultados obtidos em duplicados.....40

Figura suplementar 6.1 – Redução logarítmica [$\log (C_i/C)$] de *Enterococcus faecium* após exposição a UV LEDs que emitem a diferentes comprimentos de onda em função do tempo em minutos. As barras de erro correspondem a réplicas realizadas em duplicado ou triplicado. A: 260 nm; B: 270 nm; C: 280 nm.....48

Figura suplementar 6.2 - Redução logarítmica [$\text{Log } (C_i/C)$] de *Enterococcus faecium* após exposição a UV LEDs que emitem a diferentes comprimentos de onda em função do tempo em minutos. As barras de erro correspondem a réplicas realizadas em duplicado ou triplicado. A: 255 nm; B: 265 nm; C: 255 & 265 nm.....49

Figura suplementar 6.3 - Redução logarítmica [$\text{Log } (C_i/C)$] de *Enterococcus faecium* após exposição a UV LEDs que emitem a diferentes comprimentos de onda em função do tempo em minutos. As barras de erro correspondem a réplicas realizadas em duplicado ou triplicado. A: 260 e 280 nm; B: 270 e 280 nm; C: 255 e 265 nm.....50

Figura suplementar 6.4 - Redução logarítmica [$\text{Log } (C_i/C)$] dos microrganismos alvo após exposição a UV LEDs que emitem a os comprimentos de onda de 260 e 270 nm, em função do tempo em minutos. As barras de erro correspondem a réplicas realizadas em duplicado ou triplicado. A: *Enterococcus faecium*; B: *Escherichia coli*.....51

Figura suplementar 6.5 - Redução logarítmica [$\text{Log } (C_i/C)$] de *Escherichia coli* após exposição a UV LEDs que emitem a diferentes comprimentos de onda em função do tempo em minutos. As barras de erro correspondem a réplicas realizadas em duplicado ou triplicado. A: 260 nm; B: 270 nm; C: 280 nm.....52

Figura suplementar 6.6 - Redução logarítmica [$\text{Log } (C_i/C)$] de *Escherichia coli* após exposição a UV LEDs que emitem a diferentes comprimentos de onda em função do tempo em minutos. As barras de erro correspondem a réplicas realizadas em duplicado ou triplicado. A: 255 nm; B: 265 nm; C: 255 e 265 nm.....53

Figura suplementar 6.7 - Redução logarítmica [Log (C_i/C)] de *Escherichia coli* após exposição a UV LEDs que emitem a diferentes comprimentos de onda em função do tempo em minutos. As barras de erro correspondem a réplicas realizadas em duplicado ou triplicado. A: 260 e 280 nm; B: 260, 270 e 280 nm; C: 270 e 280 nm.....54

Figura suplementar 6.8 - Gráficos com os resultados de inativação de *Escherichia coli* e *Enterococcus faecium* durante a exposição aos UV LEDs com comprimentos de onda (255, 260, 265, 270 e 280 nm). As barras de erro representam os ensaios realizados em duplicado ou triplicado.....55

Índice de Tabelas

Tabela 3.1 - Tabela com as constantes de inativação (k) obtidas para os microrganismos alvo – *Escherichia coli* e *Enterococcus faecium* – após exposição a LEDs que emitem a diferentes comprimentos de onda (255, 260, 265, 270 e 280 nm).....30

Tabela 3.2 - Doses (em mJ/cm²) necessárias para atingir diferentes níveis de inativação (2log, 4log e 6log) dos dois microrganismos alvo – *Escherichia coli* e *Enterococcus faecium* – após exposição a LEDs que emitem luz a diferentes comprimentos de onda (255, 260, 265, 270 e 280 nm).....32

Tabela 3.3 - Concentração de sólidos totais das amostras de água superficial.....33

Tabela 3.4 - Concentração de sólidos suspensos totais em amostras de água superficial.....33

Tabela 3.5 - Concentração de sólidos totais (ST), suspensos (SS) e dissolvidos (SD) em amostras de água superficial.....33

1. Introdução

1.1 Desinfecção de água com recurso a radiação ultravioleta

A destruição e prevenção do crescimento de microrganismos que podem comprometer a saúde pública é essencial. A desinfecção pode ser realizada com recurso a produtos químicos, calor, filtração ou radiação (Pepper *et al.*, 2014).

Os produtos químicos possuem a desvantagem de formar sub-produtos, por reação com os componentes da água (por exemplo a matéria orgânica), que podem ter efeitos tóxicos sobre os seres humanos e para o ambiente (Collivignarelli *et al.*, 2018). A desinfecção através da radiação ultravioleta, já é amplamente utilizada em estações de tratamento de águas e em estações de tratamento de águas residuais, recorrendo a lâmpadas de mercúrio de baixa pressão (LP-UV) e média pressão (MP-UV).

Este método de desinfecção possui inúmeras vantagens relativamente às outras formas de desinfecção pois não produz subprodutos tóxicos, sabor ou odor na água (Pepper *et al.*, 2014).

As lâmpadas de mercúrio de baixa e média pressão têm sido utilizadas nos sistemas de desinfecção de águas residuais e águas de consumo, numa fase final de tratamento da água, com o intuito de inativar diversos microrganismos presentes na água (Nyangaresi *et al.*, 2018).

A radiação UV pode ser subdividida em diferentes regiões: UVA (315 a 400 nm), UVB (280 a 315 nm) e UVC (200 a 280 nm) (Kim *et al.*, 2016), tal como indicado na Figura 1.1.

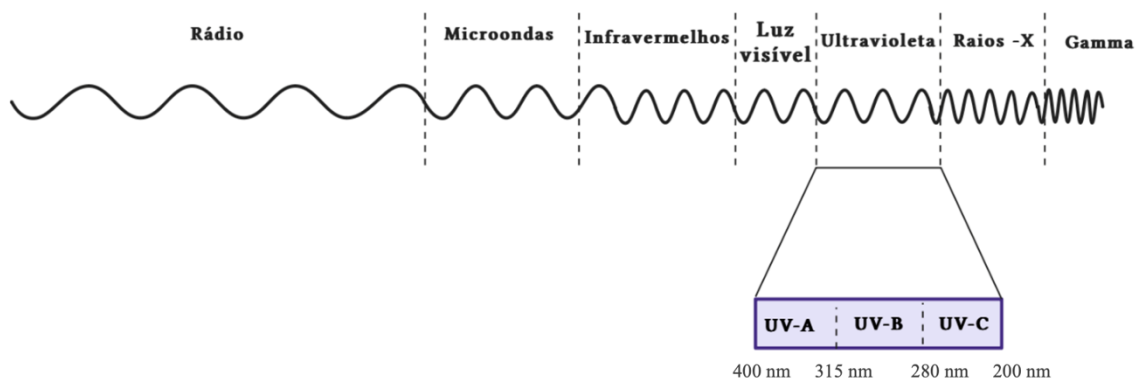


Figura 1.1 – Três bandas do espectro da radiação ultravioleta. Realizado em: Biorender

Os comprimentos de onda UVA têm diferentes mecanismos de inativação, a radiação nesta gama causa a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), como radicais hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) (Nyangaresi *et al.*, 2023). Já os comprimentos de onda na gama do UVB e UVC podem provocar lesões no DNA. Os comprimentos de onda UVC são extremamente eficazes para inativar uma grande variedade de microrganismos (protozoários, fungos, bactérias e vírus) por coincidirem com o espectro de absorção do DNA (Nyangaresi *et al.*, 2023).

Os dois danos principais no DNA induzidos pela luz ultravioleta, são devido à formação de dímeros de pirimidina de ciclobutano (CPD) e de foto produtos de pirimidina 6-4 pirimidona (6-4 PP) (Nyangaresi *et al.*, 2018). A formação de dímeros, esquematizado na Figura 1.2, inibe a replicação do DNA. Determinar a suscetibilidade dos microrganismos a sistemas de UV que emitem luz a diferentes comprimentos de onda é fundamental para quantificar a dose de UV necessária para garantir uma desinfecção adequada da água. A eficiência da luz UV pode ser condicionada pela eventual aglomeração de células, turvação e matéria orgânica presentes na água (Pepper *et al.*, 2014). A matéria inorgânica influencia o desempenho do tratamento com LEDs, uma vez que interfere na turbidez da amostra, limitando a luz disponível para desinfecção. Para além disso a formação as espécies reativas de oxigênio (ROS), como radicais hidroxilo, peróxido de hidrogênio e oxigênio, podem reagir com componentes celulares causando a morte celular (Prasad *et al.*, 2020).

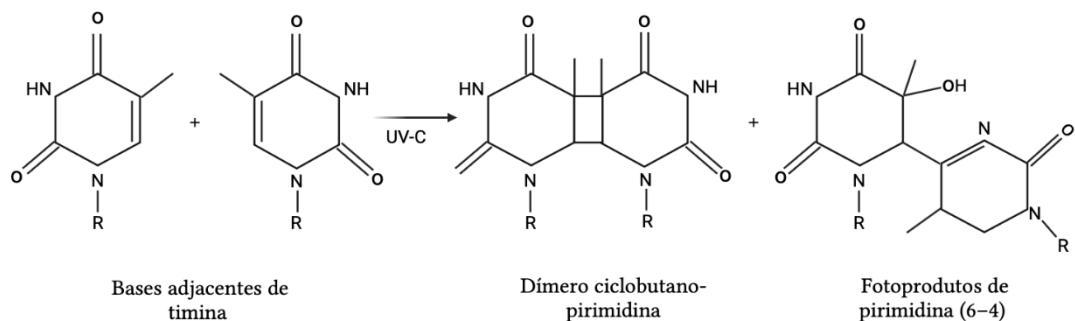


Figura 1.2 - Dímeros de pirimidina e fotoprodutos de pirimidina, formados no DNA após exposição à radiação UV-C. Adaptado de Cell Biolabs, 2022.

A inativação microbiana é proporcional á dose de UV, que é expressa em milijoule por centímetro quadrado (mJ/cm^2). As lâmpadas de mercúrio de baixa pressão emitem luz monocromática a 254 nm, enquanto as lâmpadas de mercúrio de média pressão emitem luz policromática entre 200 e 500 nm. Estas lâmpadas são atualmente amplamente utilizadas para desinfecção através de radiação UV, por serem extremamente eficazes na inativação de diversos microrganismos. No entanto, estas lâmpadas possuem algumas desvantagens que são a vida útil curta de cerca de 10.000 horas, possuem mercúrio na sua composição, alto consumo de energia e quando o seu uso é prolongado atingem elevadas temperaturas (Song *et al.*, 2016).

1.2 LEDs como uma alternativa à inativação através de radiação UV

Os LEDs surgiram como uma alternativa de desinfecção às tradicionais lâmpadas ultravioletas de mercúrio (Li *et al.*, 2019). Para além disso, as lâmpadas de mercúrio possuem uma maior sensibilidade à variação de temperatura, assim como uma pegada ecológica maior, já que consomem muito mais energia do que os LEDs (Minh *et al.*, 2019).

Os LEDs são dispositivos semicondutores que produzem luz quando é permitido que a corrente flua no circuito do lado positivo tipo p ou ânodo, para o lado negativo (tipo n ou cátodo), a isto chama-se a 'junção p-n'. O comprimento de onda da radiação emitida depende da banda de energia entre dois níveis consecutivos do material semicondutor (Song, *et al.*, 2016). São dispositivos extremamente compactos, com baixos consumos energéticos, podendo emitir luz a diferentes comprimentos de onda na região do ultravioleta C, o que pode representar uma nova forma de inativação de microrganismos patogénicos, e ter consequentemente um elevado interesse para a indústria da água (Oliveira *et al.*, 2020).

O recente surgimento dos LEDs oferece não só uma elevada diversidade de comprimentos de onda, como diversos padrões de emissão e intensidades (Sholtes *et al.*, 2019). No entanto, o desenvolvimento e a comercialização de dispositivos LED necessita de protocolos específicos, que permitam a comparação entre LEDs de diferentes fabricantes (Sholtes, *et al.*, 2019). A seleção de métodos apropriados de determinação da dose de UV (UV fluence) é um parâmetro expresso em energia por unidade de área, calculada como o produto da intensidade da luz a um determinado comprimento de onda e o tempo de exposição. Quanto maior a altura da água que a luz atravessa, menor é a intensidade recebida (Sun, *et al.*, 2022).

Uma vez que a escolha do comprimento de onda é um fator essencial no processo de desinfecção da água, a capacidade dos UV LEDs emitirem vários comprimentos de onda e efetuar o uso combinado dos mesmos, promovendo sinergias (Li *et al.*, 2019). Os UV LEDs possuem uma baixa emissão de calor na forma de radiação, o que permite a sua utilização em situações que exigem uma alta fluência UV, já que os mesmos podem ser

utilizados por períodos mais longos, sem provocar um sobreaquecimento (Cheng *et al.*, 2020). Para além disso, possuem um período de estabilização curto, o que leva a um consumo de energia muito menor, quando comparado com as lâmpadas de mercúrio (Song, *et al.*, 2016).

O espectro de comprimentos de onda que se encontra descrito na literatura, como sendo mais efetivo no efeito germicida, situa-se entre os 260 e os 265 nm, no qual o DNA absorve mais radiação UV (Kim *et al.*, 2016). O DNA da maioria dos microrganismos tem um máximo de absorção entre os 260 e os 270 nm (Nyangaresi *et al.*, 2018).

Estudos anteriores mostraram que três pequenos díodos emissores de luz que emitem a 265 nm, (comprimento de onda mais próximo do pico de absorção do DNA), possuem uma maior eficiência de inativação de fungos em comparação com a utilização de três pequenos díodos emissores de luz que emitem a 255 nm, comprimento de onda semelhante ao que é emitido pelas lâmpadas de mercúrio de baixa pressão (Oliveira *et al.*, 2020).

No que diz respeito às proteínas, geralmente o pico de absorção máxima situa-se entre 275 e 280 nm, devido à absorção dos aminoácidos aromáticos triptofano, tirosina e cistina (Nyangaresi *et al.*, 2018). A radiação UV emitida a 280 nm é absorvida pelas proteínas, o que provoca um nível mais elevado de deterioração das proteínas da membrana em comparação com valores de comprimentos de onda mais baixos, como os 254 nm que possuem em teoria um efeito germicida mais elevado (Cheng *et al.*, 2020).

A comparação da eficiência de LEDs que emitem luz a diferentes comprimentos de onda e as suas combinações poderá desencadear o desenvolvimento de novos processos de desinfeção mais eficazes.

1.3 Bactérias como indicadores de contaminação fecal

A análise microbiológica da qualidade da água é determinada com base em organismos indicadores, uma vez que não é possível determinar todos os microrganismos patogênicos entéricos existentes em amostras de água (Collivignarelli *et al.*, 2018). Os organismos indicadores mais comuns são o grupo de microrganismos coliformes (Reitter *et al.*, 2021).

A qualidade microbiológica é avaliada, portanto, de forma indireta recorrendo a indicadores de contaminação fecal. *Escherichia coli* (coliforme fecal) e enterococos são bactérias indicadoras de poluição fecal, analisadas através de métodos de detecção simples. A sua presença na água acima de determinados valores indica a possível presença nessa amostra de microrganismos patogênicos que podem causar doenças gastrointestinais.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o aumento do número de contaminações por *E. coli* é majoritariamente causado pelo contato com fezes de animais. *Escherichia coli* pode sobreviver durante períodos de tempo elevados em sedimentos e fontes de água contaminadas (World Health Organization, 2018).

A *Escherichia coli* é uma bactéria Gram negativa, em forma de bastonete, que pode ser encontrada no trato gastrointestinal dos organismos de sangue quente. É considerado na maioria dos casos um organismo inofensivo, no entanto algumas estirpes podem ser causadoras de gastroenterites que afetam especialmente crianças em países menos desenvolvidos (Pepper *et al.*, 2014). A *E.coli*, possui uma elevada diversidade genética, o seu genoma possui aproximadamente 4700 genes, no entanto apenas 2000 genes são conservados entre membros do mesmo gênero, os restantes genes possuem uma elevada plasticidade, o que se traduz numa grande capacidade por parte desta espécie de se adaptar a várias condições ambientais (Devane *et al.*, 2020).

Os enterococos podem ser encontrados predominantemente no intestino de diversos animais, e estão presentes numa elevada quantidade nas fezes, no entanto não se multiplicam facilmente na natureza, o que representa uma das razões pelas quais estes organismos podem ser escolhidos como indicadores de contaminação fecal (Tamai & Suzuki, 2023).

À semelhança dos coliformes, os enterococos são omnipresentes em ambientes aquáticos, sendo capazes de persistir durante longos períodos nessas zonas (Boehm *et al.*, 2014). Alguns patógenos oportunistas do género Enterococos podem infetar hospedeiros cuja imunidade esteja comprometida levando a diversas doenças, incluindo infeções do trato urinário e doenças infecciosas do sistema nervoso central (Boehm *et al.*, 2014). Para além disso, alguns estudos sugerem que os enterococos podem sobreviver durante mais tempo em sistemas de água subterrâneas não tratadas, do que *E.coli*, o que pode indicar uma vulnerabilidade maior desse meio (Health Canada, 2019).

Ao contrário das águas subterrâneas, as águas superficiais são mais suscetíveis a contaminações que afetam a produção de água potável ou atividades recreativas (Reitter *et al.*, 2021). A contaminação fecal representa diversos riscos para a saúde dos seres humanos, portanto, a monitorização microbiológica é essencial para avaliar a qualidade da água (Reitter *et al.*, 2021).

Diversos estudos evidenciaram uma correlação direta entre uma maior concentração de enterococos em águas superficiais e um maior risco de desenvolvimento de gastroenterites por parte de banhistas que desenvolvem atividades recreativas nessas zonas (Pepper, *et al.*, 2014).

Alguns microrganismos, como é o caso de *Escherichia coli* e *Enterococcus faecium*, são exemplos de bactérias que estão presentes no sistema gastrointestinal da maior parte dos mamíferos e por isso, são um bom indicador de contaminação fecal, em diversas amostras de sistemas de água (Tac, *et al.*, 2022). Existe uma necessidade emergente em resolver o problema da contaminação fecal de águas, para que este não se torne numa ameaça epidemiológica para todos os utilizadores de água (Tac, *et al.*, 2022).

De forma a combater essa questão, é necessária a proteção das zonas de abastecimento de águas, contra a contaminação fecal para salvaguardar o abastecimento público de água, assim como das águas que são utilizadas para fins recreativos (Pepper, *et al.*, 2014).

1.4 Células Bacterianas: Bactérias Gram positivas e Gram negativas

As bactérias possuem a necessidade de manter a sua forma e estrutura e evitar a ruptura celular, e têm diferentes mecanismos para efetuar a importação e exportação de nutrientes sendo estruturalmente separadas em dois grupos distintos (Gram positivas ou Gram negativas) de acordo com seu invólucro celular (Pepper, *et al.*, 2014).

A composição das bactérias é relativamente simples. São pequenas, possuem uma elevada relação área de superfície/volume, bem como uma elevada plasticidade genética que lhes permite adaptarem-se rapidamente a diferentes condições ambientais (Pepper, *et al.*, 2014).

Tanto as bactérias Gram positivas como as Gram negativas possuem peptidoglicanos na parede celular, que lhes permite manter a forma celular e conferem proteção mecânica (Figura 1.3). A parede celular das bactérias permite à célula manter a sua forma, confere rigidez e garante a proteção contra pressões exteriores (Gumbart *et al.*, 2014).

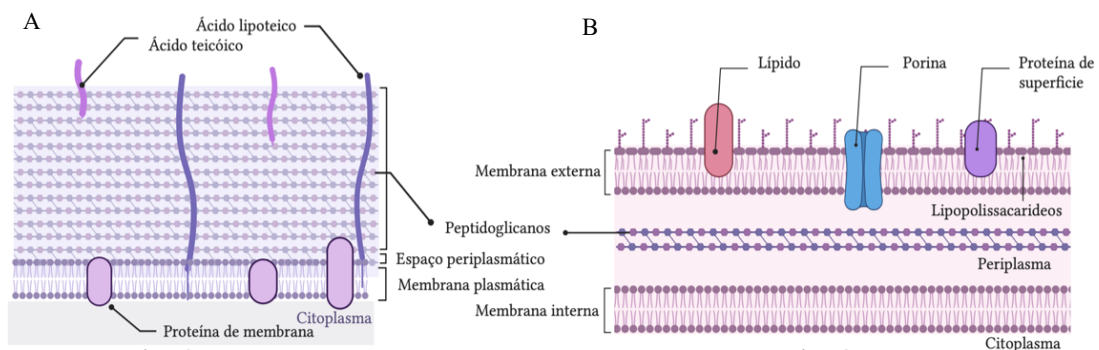


Figura 1.3 - Estrutura da parede celular A: Bactéria Gram positiva; B: Bactéria Gram negativa. Realizado em: Biorender.

Nas bactérias Gram negativas, a parede celular pode ter entre 2 a 7 nm de espessura (Gumbart *et al.*, 2014). O invólucro celular das Gram negativas, possui uma segunda membrana externa que se encontra associada à parede celular por lipoproteínas (Pepper, *et al.*, 2014). Por outro lado, as bactérias Gram positivas possuem uma parede celular com uma camada de peptidoglicanos mais espessa, com cerca de 20 a 35 nm (Gumbart *et al.*, 2014). As bactérias com este tipo de parede celular são constituídas por diversas camadas

de peptidoglicanos empilhadas, sendo essa a razão pela qual as mesmas possuem uma estrutura mais espessa (Pepper, *et al.*, 2014).

Diversos estudos indicam que o tratamento com radiação UV induz danos na membrana celular das bactérias, o que apoia a hipótese da utilização desta técnica na inativação bacteriana (Kim, *et al.* 2017). O *Enterococcus faecium* e *Escherichia coli* são bactérias Gram positivas e Gram negativas, respectivamente e, portanto, podem ter um comportamento diferente à luz UV devido às diferenças na parede celular (Zhang *et al.*, 2019).

A camada mais espessa de peptidoglicanos das bactérias Gram positivas, em teoria, pode absorver mais radiação UV. Para além disso, a cadeia lateral de quatro péptidos, na camada de peptidoglicanos das Gram positivas, é mais complexa do que as ligações químicas nas bactérias Gram negativas (Zhang *et al.*, 2019).

A radiação UV pode afetar de forma diferente os microrganismos. Segundo Pullerits *et al.* (2020). A *E.coli* pode ser mais sensível a radiação UV do que o *E.faecium*, mais uma vez esta ideia é reforçada pela configuração da parede celular das bactérias Gram positivas, ser mais espessa. No entanto outros fatores devem ser tidos em consideração, relativamente à resistência das bactérias Gram positivas em detrimento das bactérias Gram negativas, uma vez que não é linear que as bactérias Gram positivas sejam mais resistentes à radiação UV.

A resistência à radiação UV tem sido atribuída às características morfológicas e fisiológicas das bactérias (Romero *et al.*, 2023). No entanto, existem outros estudos que evidenciam uma morte celular facilitada por parte das bactérias Gram positivas, quando expostas à radiação, sem observação de modificações ao nível da parede celular destas bactérias. Assim sendo, podem estar envolvidos diferentes mecanismos de foto inativação (Pal *et al.*, 2007).

No entanto, este tema apresenta alguma controvérsia pois há estudos que evidenciaram o contrário. Romero *et al* (2023) reportaram que a estrutura da membrana das bactérias Gram positivas se comporta como um escudo contra a radiação UV e por isso fornece uma maior resistência à radiação UV em relação às bactérias Gram negativas. Para além disso, de acordo com Pal *et al.*, (2007), as bactérias Gram negativas são mais sensíveis à desinfeção através de radiação UV devido à configuração da parede celular

A utilização de corantes fluorescentes permite a observação microscópica de certas propriedades fisiológicas celulares das bactérias, tais como a integridade da membrana, atividade enzimática e danos no DNA. O iodeto de propídio é um exemplo de corante que permite observar a integridade das membranas, antes e após a exposição das bactérias à radiação UV (Kim, *et al.*, 2017).

Para além disso, o corante DAPI é capaz de corar o material genético bacteriano, pois liga-se a regiões do DNA que possuem ligações A-T (adenosina-timina), permitindo emitir uma coloração azul fluorescente (Navarro *et al.*, 2020). Os corantes fluorescentes permeáveis à membrana das células, como é o caso do DAPI permitem investigar danos causados ao DNA decorrentes da radiação UV (Johnson & Criss 2013).

Kim *et al.* (2017) reportaram que as células de bactérias Gram positivas apresentaram uma menor fluorescência, o que indica uma menor atividade celular, do que as bactérias Gram negativas depois da exposição à mesma quantidade de radiação UV. De acordo com os autores, como as bactérias Gram negativas possuem uma membrana externa e lipopolissacarídeos, os danos ao nível da membrana das bactérias demonstraram serem menores, quando comparados com os danos provocados às membranas das bactérias Gram positivas.

1.5 Principais Objetivos

Os principais objetivos deste trabalho foram:

- Comparar a eficiência de díodos que emitem luz a diferentes comprimentos de onda (255 nm, 260 nm, 265nm, 270 nm e 280 nm) em termos da inativação de bactérias indicadoras de contaminação fecal com diferentes morfologias – Gram negativas (*Escherichia coli*) e Gram positivas (*Enterococcus faecium*) - inoculadas em tampão fosfato ou presentes a níveis de ocorrência em amostras de água superficial;
- Avaliar os danos na membrana celular e DNA provocados pela exposição a LEDs que emitem luz a diferentes comprimentos de onda.

2. Materiais e métodos

2.1 Ensaios de inativação

Os ensaios de inativação foram realizados com recurso a dois reatores laboratoriais de UV LEDs (PearlLab Beam, da AquiSense Technologies, USA). Cada um dos reatores contém nove LEDs (três LEDs que emitem a três comprimentos de onda diferentes), um dissipador de calor integrado e um conector para uma fonte de alimentação (AquiSense Technologies, USA). Os comprimentos de onda UV-C testados foram: 255 nm e 265 nm presentes num dos reatores e 260 nm, 270 nm e 280 nm, no outro reator. Os ensaios de inativação foram realizados (em duplicado ou triplicado) com o intuito de testar o potencial de desinfecção de LEDs que emitem radiação UV-C a diferentes comprimentos de onda (Figura 2.1).

Cada comprimento de onda (255, 260, 265, 270 e 280 nm) foi avaliado individualmente e em combinação (amostras expostas simultaneamente a mais do que um comprimento de onda presentes num determinado reator): 270+280nm, 260+280 nm, 260+270 nm, 260+270+280 nm e 255+265 nm.

Foram realizados ensaios de inativação de *Escherichia coli* e *Enterococcus faecium* fortificados em soluções de tampão fosfato e ensaios de inativação em matrizes de água real (água superficial recolhida no rio Tejo).

As amostras foram submetidas ao efeito dos UV LEDs, durante um período definido. Em todos os ensaios, para além das amostras expostas aos UVs, foi também testado um controlo no escuro, em que a mesma suspensão bacteriana foi mantida no escuro durante o ensaio. O objetivo destas amostras (controlos mantidos no escuro) foi garantir que a concentração bacteriana não variava ao longo do tempo de cada ensaio e que qualquer efeito de diminuição de concentração medido nas amostras é apenas devido ao efeito da exposição das amostras à radiação UV-C.

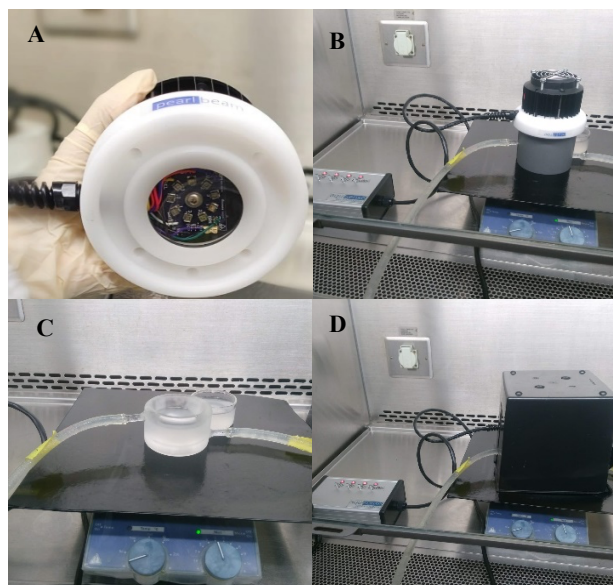


Figura 2.1 - Montagem do sistema para ensaios de inativação com díodos emissores de luz ultravioleta C. A - Reator UV LED. B - Suporte cilíndrico que permite o posicionamento do reator UV LED. C - Copo refrigerado que permite a refrigeração da amostra a inativar. D - Caixa preta, para proteção do utilizador contra a radiação, que é emitida durante o ensaio.

Em cada um dos ensaios foram retiradas amostras após diferentes tempos de exposição a UV LEDs que emitem luz a diferentes comprimentos de onda. Os tempos de exposição foram convertidos em doses de UVs (UV fluence) de forma a permitir a comparação dos resultados obtidos por sistemas de LEDs com intensidades de luz diferente bem como a comparação dos resultados obtidos com resultados publicados. A conversão dos dados para doses de UV está descrita no capítulo 2.6.

2.1.1 Determinação da dose de UVs emitida por diferentes UV-LEDs

De forma a permitir a comparação entre resultados de diferentes experiências foi determinada a dose de UVs (mJ/cm^2) correspondente a diferentes tempos de exposição das amostras.

O cálculo da dose de UVs teve em conta a intensidade da radiação emitida pelos LEDs que emitem luz a diferentes comprimentos de onda, medida com recurso a um radiómetro (SpectriLight International Light Technologies ILT950-UV; representado na Figura 2.2), e os seguintes fatores de correção: fator de reflexão: 0,90, “petri factor”: 0,98, fator de divergência: 0,64, e “water factor”, calculado tendo em conta a transmitância das amostras.



Figura 2.2 - Sistema de medição da intensidade da radiação emitida pelos LEDs, A- Reator UVLED (AquiSense Technologies, USA). B- Radiómetro (SpectriLight International Light Technologies ILT950-UV)

O radiómetro, é o dispositivo que permite a determinação da intensidade de luz emitida pelos reatores UV LEDs. A medição foi feita à distância de 4 cm, a mesma distância entre a fonte de luz e a amostra usada nos ensaios de inativação.

A conversão dos tempos de exposição em doses de UV permite a comparação entre os resultados obtidos com LEDs com diferentes intensidades.

2.1.2 Ensaio de inativação de *Escherichia coli* e *Enterococcus faecium* fortificadas em soluções de tampão fosfato

Dois isolados de coleção de cultura foram fortificados nos ensaios de inativação em soluções de tampão fosfato. As bactérias alvo neste estudo foram escolhidas por serem indicadores de qualidade da água e pela sua morfologia celular distinta em termos da composição da parede celular e forma.

A suspensão celular de *Enterococcus faecium*, foi preparada recorrendo a um isolado de coleção de cultura *Enterococcus faecium* (DSM 109923), que foi colocado a crescer em Caldo Cérebro-Coração, a 37°C durante a noite. A densidade ótica a 600 nm do isolado foi ajustada entre 0,4 e 0,6 unidades de Macfarland no espectrofotómetro (Ultrospec 21000 pro). A concentração inicial do inóculo bacteriano foi de aproximadamente $4,1 \times 10^8$ UFC/mL.

O mesmo procedimento foi realizado para um isolado de *Escherichia coli* K12 MG1655 (DSM 18039), colocado a crescer em meio Luria Bertani a 37°C durante aproximadamente dezoito horas. A densidade ótica a 600 nm foi ajustada entre os 0,4 a 0,5 unidades de Macfarland com uma solução de tampão fosfato (PBS) estéril (solução 1X, pH 7,4), com uma concentração inicial de aproximadamente $1,2 \times 10^8$ UFC/mL.

Durante o processo de crescimento da suspensão bacteriana, em cada um dos casos foi realizado um controlo do meio, de forma a garantir que não houve nenhuma contaminação do meio utilizado para o crescimento destas bactérias.

A suspensão celular foi submetida a centrifugações sucessivas na centrífuga (Eppendorf; centrifuge 5430 R), durante 15 minutos a 6000 rpm. Entre centrifugações foram efetuadas lavagens com PBS (1x). Este procedimento foi realizado para as duas suspensões celulares, sendo as mesmas expostas separadamente aos ensaios de inativação.

A quantificação de bactérias em cultura foi determinada através da quantificação das unidades formadoras de colónias (UFCs), em placas com meio de Triptona de soja com agar (TSA). Por fim, o sobrenadante foi descartado e adicionado PBS a cada tubo falcon.

O número de unidades formadoras de colónia por mililitro das amostras foi determinado através da inoculação em placa de diferentes diluições, de amostras antes e após a exposição aos UV LEDs.

As amostras foram inoculadas em placas de agar triptona de soja (TSA), em duplicado, e o espalhamento realizado com recurso a esferas de vidro. De forma a realizar o controlo de esterilidade das esferas de vidro, bem como do PBS e do meio utilizado foram inoculados 100 μ L de PBS em placa de TSA.

2.2 Recolha e caracterização de amostras de água superficial

Uma vez que a composição da matriz de água (por exemplo o seu teor em sólidos suspensos) pode influenciar a eficiência dos processos de inativação, foram recolhidas amostras de água superficial, analisada a sua composição e realizados posteriormente os ensaios de inativação com LEDs.

As amostras de água superficial, provenientes do rio Tejo, foram recolhidas na praia de Algés (Figura 2.3) e analisadas tendo em conta a sua composição microbiológica e a concentração de sólidos totais, suspensos e dissolvidos.



Figura 2.3 - Mapa ilustrativo da zona de recolha de amostras de água. A - Praia de Algés.

Fonte: Google Earth 2018 consultado a 17/05/2023.

2.2.1 Caracterização microbiológica das amostras de água reais

As amostras recolhidas foram analisadas para a deteção e quantificação de coliformes totais, *E. coli* e enterococos utilizando os métodos enzimáticos Colilert-18 e Enterolert da IDEXX (EUA), de acordo com normas ISO 9308-2:2012. O quanti-tray/2000 permite a quantificação do número mais provável dos microrganismos na amostra. Com o Quanti-Tray/2000, cada amostra de 100mL é automaticamente dividida em vários poços e selada com um Quanti-Tray Sealer PLUS.

Ao distribuir automaticamente a amostra em 97 poços de 2 tamanhos diferentes, o Quanti-Tray/2000 permite um intervalo de contagem entre 1 e 2419. O teste Colilert-18 (IDEXX Labs, Westbrook, Maine), que deteta simultaneamente a presença de coliformes totais e *Escherichia coli*, foi utilizado nas amostras de água recolhidas. O reagente foi adicionado às diferentes amostras e diluições, e as amostras foram incubadas durante um período de 18 horas a $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Os fatores de diluição utilizados nas análises das amostras foram de 1:1 (não diluído), 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} para a amostra de água do rio. Os coliformes utilizam a β -galactosidase para metabolizar o substrato ONPG (o-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo), traduzindo-se numa mudança de incolor para amarelo. No caso da deteção de *E.coli* nas amostras de água, sabe-se que esta bactéria utiliza β -glucuronidase para metabolizar o substrato MUG (4-metil-umbeliferil- β -D-glucuronídeo) e emitir fluorescência.

No caso do Colilert-18, depois de quantificar o número mais provável de coliformes totais através da contagem do número de poços amarelos, determinou-se o número de poços amarelos e fluorescentes, através do uso de uma lâmpada de luz UV (360nm), permitindo assim determinar o número mais provável de *E. coli* presentes em 100 mL de amostra (NMP/100 mL). O número de poços fluorescentes são contabilizados sob uma lâmpada de luz UV, que emite luz a um comprimento de onda de 360 nm.

No teste Enterolert a produção de 4 metil-umbeliferona indica a presença nas amostras de água de enterococos. Para a análise de enterococos, nas amostras de água superficial, foram realizados os seguintes fatores de diluição 1:1, 10^{-1} e 10^{-2} . Seguidamente, cada amostra de 100 mL foi colocada em QuantiTrays seladas que foram incubadas a 41°C durante 24 horas.

2.2.2 Isolamento de *Enterococcus faecium* de amostras de água superficial

A técnica de filtração por membrana combinada com um meio cromogéneo seletivo para detecção de *Enterococcus faecium* (*Enterococcus faecium* ChromoSelect Agar) permitiu o isolamento de *Enterococcus faecium* presentes em amostras de água superficial.

De forma a proceder à análise das amostras de água, foi utilizada a técnica de filtração por membrana, a qual consiste num sistema de filtração, estéril (Nalgene®, Rochester, NY, EUA), ao qual é acoplada uma bomba de vácuo (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, EUA), que permite que as amostras de água sejam filtradas.

As amostras foram previamente preparadas em diluições seriadas 1:1 (não diluído), 1:10 e 1:100, com PBS estéril (solução 1X, pH 7,4), e posteriormente filtradas. As membranas de filtração, que são colocadas no sistema de filtração possuem um diâmetro de 47 mm e tamanho médio de poro de 0,45 µm (MF-Millipore™ gridded).

As membranas utilizadas de 0,45 µm foram posteriormente colocadas em placas com meio cromogéneo seletivo em base de agar, para *Enterococcus*, e com meio cromogénico com antibiótico.

A detecção de *Enterococcus faecium* foi realizada com recurso a um meio cromogéneo em base de agar que permite a sua detecção em diversos tipos de amostras (fezes, solo, água, etc.). O *E. faecium* fermenta a arabinose o que provoca a clivagem do substrato cromogéneo presente no meio para produzir colónias de cor verde juntamente com uma coloração amarela no meio. Este meio cromogéneo contém um suplemento que contém aztreonam, e que inibe as bactérias Gram negativas, incluindo a *Pseudomonas aeruginosa* e *E coli*.

Após isolamento, a identificação dos isolados foi verificada por sequenciação pela empresa STAB Vida (100% homologia entre a base de dados NCBI e a sequência obtida após amplificação do gene 16S rDNA). Estes isolados serão usados em trabalhos futuros para comparar os resultados de inativação obtidos com microrganismos de coleção de culturas (trabalho descrito nesta tese) com os resultados de inativação obtidos com microrganismos ambientais (trabalho futuro).

2.2.3 Análise de teor em sólidos das amostras

Para além disso, foi realizada uma caracterização do teor de sólidos totais, suspensos e dissolvidos das amostras recolhidas.

A determinação dos sólidos suspensos totais (SST) de uma amostra de água permite determinar o peso seco real de sólidos suspensos na água. Neste processo, a água (250 mL de cada amostra) é passada através de um filtro de 1,2 μm (Whatman GF/C CAT No. 1822-047), o qual é pesado previamente, sendo as partículas que permanecem no mesmo após a secagem (durante a noite a 100°C) classificadas como SST. Os sólidos dissolvidos foram determinados subtraindo o peso das amostras de sólidos totais (obtidos após a evaporação de 30 mL de amostra a 100°C) ao das amostras de sólidos totais suspensos.

Os sólidos dissolvidos totais (TDS) incluem sais inorgânicos, como cálcio, magnésio, potássio, sódio, bicarbonatos, cloretos, sulfatos e pequenas quantidades de matéria orgânica. A concentração de TDS corresponde ao total de substâncias filtráveis na água que podem ser determinadas gravimetricamente.

2.2.3.1 Ensaios de inativação em matriz de água real

Os ensaios em matriz de água real foram realizados submetendo a amostra recolhida, proveniente do rio Tejo, ao reator UV LEDs, que possui os comprimentos de 260, 270 e 280 nm. As amostras foram expostas aos diferentes comprimentos de onda durante diferentes tempos de exposição correspondentes à dose máxima de UVs utilizada nos ensaios de inativação das suspensões bacterianas (9 mJ/cm²).

A cada 100µL de amostra (e suas diluições) foram espalhados em meio de cultura RAPID' *E.coli* 2 suplementado, que permite a enumeração de colónias *Escherichia coli* e bactérias coliformes em amostras de água destinada ao consumo humano e águas residuais (Biorad, 2023). As placas foram incubadas a 37°C e as contagens de colónias feitas 18 h a 24 h após incubação.

A deteção destes microrganismos é efetuada através das atividades enzimáticas, β-D-galactosidase (GAL) e β-D-glucuronidase (GLUC) que permitem a identificação simultânea de *E. coli* e coliformes. A clivagem da β-D-glucuronidase permite a deteção de colónias de *E.coli*, porque é uma espécie de Enterobacteriaceae que possui esta enzima.

Desta forma, identificam-se as colónias de *E.coli* (com cores violeta/rosa) devido à atividade da β-D-galactosidase e β-D-glucuronidase (GAL+/GLUC+) enquanto que as colónias das outras bactérias coliformes apresentam cor azul/verde (GAL+/GLUC-).

2.3 Análise de mecanismos de inativação

2.3.1 Danos morfológicos

O processo de preparação das lâminas e observação das imagens de microscopia foram realizadas por João Sério. De forma a determinar danos morfológicos, 3 mL de amostras recolhidas antes e após os ensaios de inativação foram centrifugadas para garantir que se obtém um precipitado. O precipitado celular de *Escherichia coli* foi então combinado com 1 µl de corante vermelho FM™ 4-64 (N-(3-Trietilamôniopropil) -4-(6-(4-(Dietilamino) Fenil) Hexatrienil) Dibrometo de Piridinium) um corante de membrana lipofílica a 10 µg/mL e 1 µl de corante ciano DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol, uma coloração de DNA a 5 ng/mL).

Posteriormente, a solução foi novamente centrifugada, o sobrenadante removido e as células (4 µl) colocados em lâminas previamente preparadas. Para a sua preparação, 800 µl de agarose dissolvida em água destilada com a concentração de 17 g/L foram depositados nas lâminas de microscopia, servindo de suporte às amostras. Após a deposição das amostras com os corantes nas lâminas estas foram imediatamente analisadas.

As imagens de microscopia foram obtidas através do microscópico vertical Leica DM 600 EMCCD, com uma câmara Andor iXon 885 EMCCD e controlado pelo software MetaMorph V5.8. As imagens de microscopia foram adquiridas com a objetiva de imersão 100 x optovar 1,6x em modo de contraste de fase e utilizando de filtros de fluorescência: TX2 e DAPI.

2.3.2 Formação de dímeros

De forma a avaliar os danos provocados no DNA, antes e depois da exposição aos UV LEDs, o DNA extraído foi quantificado relativamente à presença de dímeros de ciclobutano (CPD).

Primeiramente, o DNA foi extraído de dezoito amostras, com recurso ao kit de extração de DNA, DNeasy® UltraClean® Microbial Kit (Qiagen, USA). As doses de UV a que amostras foram submetidas foram as mesmas para cada comprimento de onda – a dose máxima de UVs utilizada nos ensaios de inativação das suspensões bacterianas (9 mJ/cm²).

Seguidamente as amostras foram quantificadas tendo em conta a concentração de DNA no NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo fisher scientific, USA).

O DNA foi convertido em cadeia simples através do processo de desnaturação, em que a amostra de DNA foi incubada num termociclador a 95°C. As amostras de CPD-DNA foram adicionadas a cada um dos poços, em duplicado, e em seguida foi adicionada uma “binding solution”, para permitir a adesão das amostras aos poços. A reação enzimática pode ser observada depois da adição da solução substrato e do período de incubação.

2.4 Análise dos dados

A eficiência de inativação dos microrganismos foi determinada em função da redução do logaritmo das concentrações medidas (C_i/C_f). C_i é a concentração inicial em CFU/mL da suspensão celular antes da exposição aos UV LEDs e C_f é a concentração final em CFU/mL da suspensão celular após exposição aos UV LEDs por um determinado tempo que corresponde a uma certa dose de UVs (UV_f). A constante k diz respeito à constante de inativação que pode ser calculada em função do tempo de exposição (Kt) ou dose de UVs (Kf).

$$\log(C_i/C_f) = Kf \times UV_f$$

De forma a permitir a comparação de resultados entre ensaios diferentes foi calculada a dose de UV (UV fluence; UV_f ; mJ/cm^2), que pode ser calculada pelo produto da irradiância corrigida dos UV LED e do tempo em segundos.

3. Resultados e Discussão

3.1 Ensaios de inativação com LEDs

3.1.1 Medições da intensidade dos UV LEDs

A intensidade de luz emitida pelos LEDs testados neste trabalho está representada na Figura 3.1.

As oscilações nas medições da intensidade de luz observadas antes da construção do sistema de medição da intensidade da radiação emitida pelos LEDs (ilustrado na Figura 2.2.) demonstraram a importância da colocação do reator sempre na mesma posição em relação ao radiômetro para garantir uma maior reprodutibilidade das medições da intensidade da luz emitida (Figura 3.2).

De acordo, com os dados obtidos nas medições realizadas com o radiômetro (Figura 3.1), observa-se que o comprimento de onda que apresenta uma maior intensidade emite luz a 280 nm, enquanto os LEDs 255 nm emitem luz com uma intensidade inferior aos outros todos comprimentos de onda testados ($I_{280\text{ nm}} > I_{260\text{ nm}} \sim I_{270\text{ nm}} > I_{65\text{ nm}} > I_{55\text{ nm}}$).

As intensidades de luz emitidas pelas LEDs que emitem a diferentes comprimentos de onda mostram a necessidade de calcular a dose de UV, de forma a perceber o efeito dos diferentes comprimentos de onda na eficácia de inativação dos UV-LEDs.

Os resultados de inativação em função do tempo que estão representados nas Figuras Suplementares 6.1 a 6.8, poderiam mostrar que as LEDs que emitem a 280 nm são mais eficazes para atingir uma inativação superior dos microrganismos. Nesse caso, o resultado poderia ser devido ao comprimento de onda ou à intensidade da luz emitida por estas LEDs ser superior.

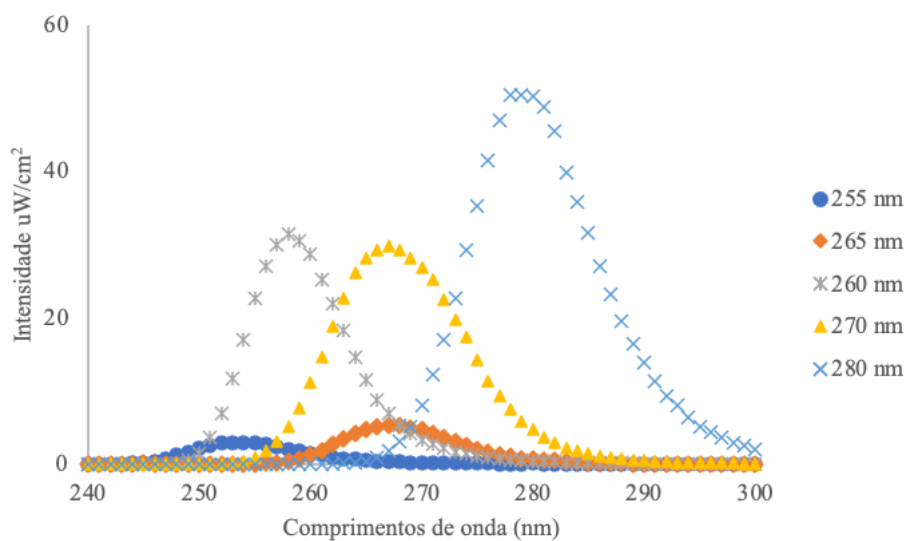


Figura 3.1 - Intensidade de luz emitida pelos diferentes LEDs testados neste trabalho.

Assim sendo, é importante efetuar as leituras de intensidade da luz emitida antes de cada ensaio de inativação, replicando as mesmas condições de medição, ou seja, com radiômetro colocado sempre na mesma posição em relação às LEDs, de forma a garantir que a dose de UV está bem calculada e que os resultados entre diferentes ensaios podem ser comparados entre si, assim como com resultados de inativação descritos na literatura.

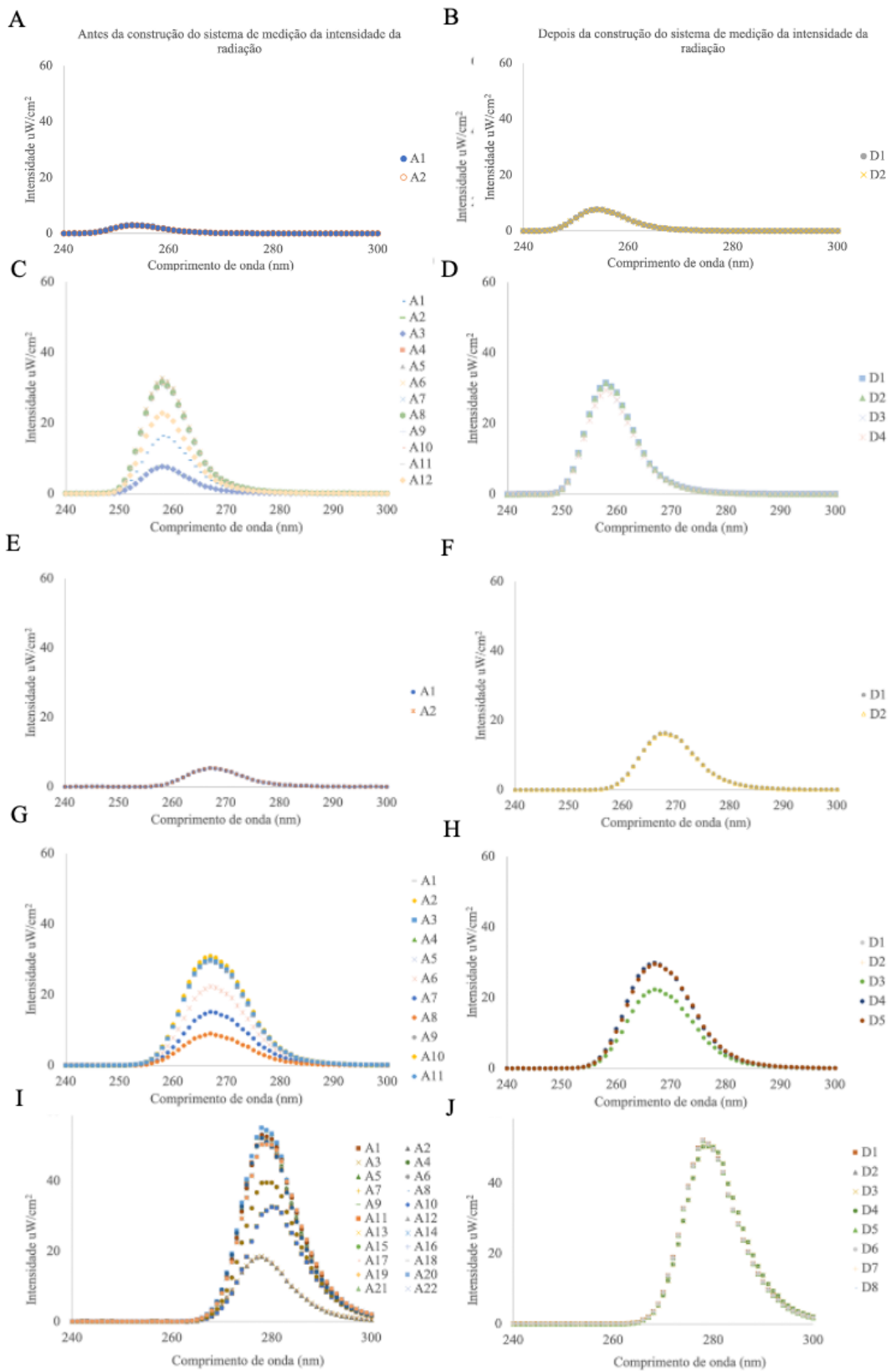


Figura 3.2 - Intensidade de luz emitida pelos diferentes LEDs testados neste trabalho antes (A), (C), (E), (G), (I) e depois (B), (D), (F), (H) e (J) da padronização.

3.1.2 Ensaios de inativação de *Escherichia coli* e *Enterococcus faecium* em solução tampão fosfato

Os ensaios de inativação têm como objetivo demonstrar a capacidade de inativação de bactérias alvo, através da utilização de LEDs que emitem na gama ultravioleta C. Dessa forma quanto maior os valores de redução logarítmica, melhor a capacidade de desinfecção desses UV LEDs.

As Figuras 3.3 e 3.4 representam, respetivamente, os resultados de inativação de *Escherichia coli* e *Enterococcus faecium* obtidos em dois reatores de LEDs que emitem a diferentes comprimentos de onda (reator I – 260 nm, 270 nm e 280 nm e reator II – 255 nm e 265 nm).

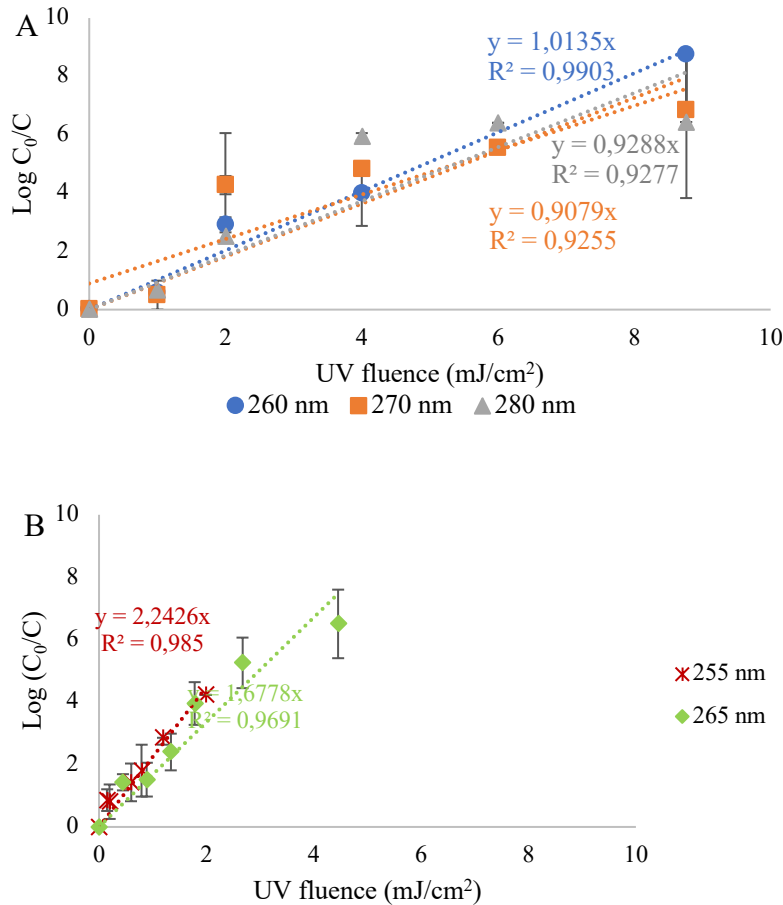


Figura 3.3 - Inativação de *Escherichia coli* [$\log (C_i/C)$] em função da dose de UVs de LEDs que emitem a diferentes comprimentos de onda A:(260;270 e 280 nm); B:(255 e 265 nm). As barras de erro representam os resultados obtidos em réplicas.

Os resultados quando são traduzidos para doses de UV demonstram que os comprimentos de onda 255 e 265 nm são mais eficientes a inativar *Escherichia coli* do que os comprimentos de onda de 270 e 280 nm, possivelmente pelo facto de o espectro de emissão dos comprimentos de onda de 255, 260 e 265 nm sobrepor-se ao pico de absorção relativa de UV da maioria dos microrganismos (Li *et al.*, 2019).

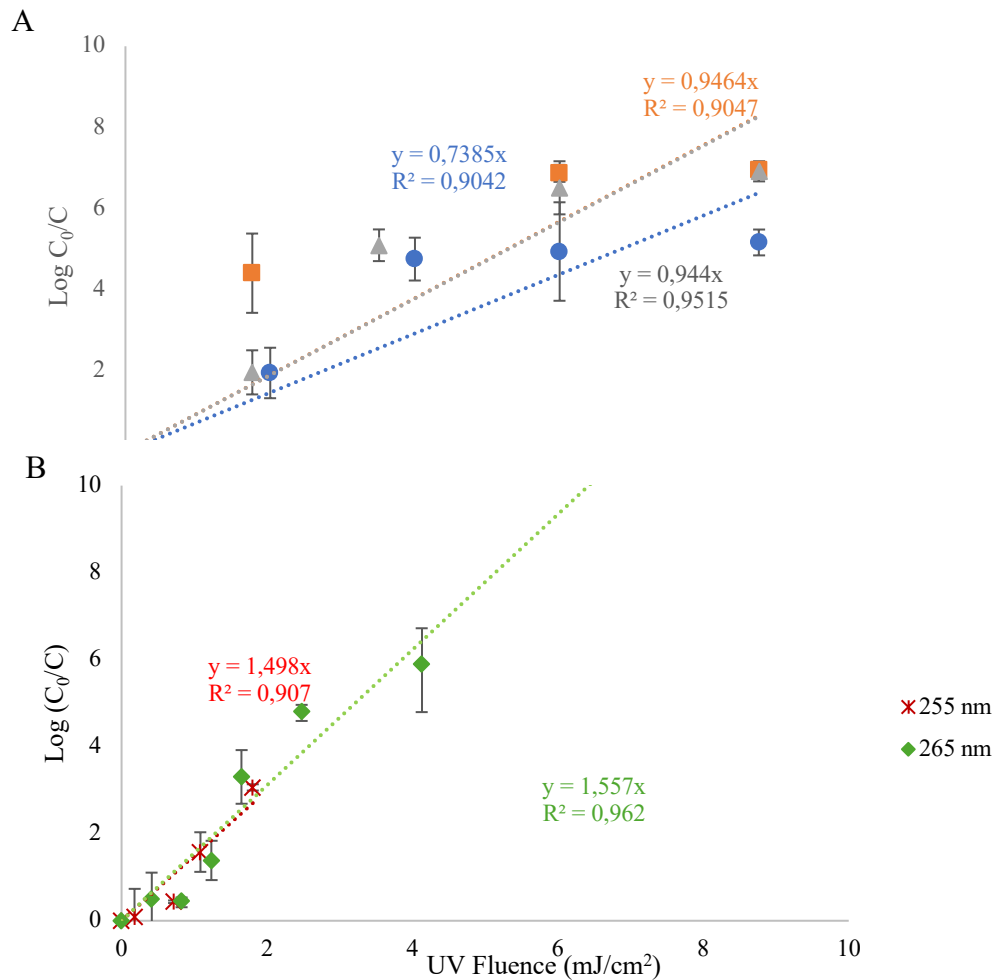


Figura 3.4 - Inativação de *Enterococcus faecium* [$\log (C_i/C)$] em função da dose de UVs de LEDs que emitem a diferentes comprimentos de onda A:(260;270 e 280) B:(255 e 265 nm). As barras de erro representam os resultados obtidos em réplicas realizadas em duplicado.

A sensibilidade à radiação UV pode ser medida através da determinação da constante de inativação por fotólise direta (k), que corresponde ao declive das retas representadas nas Figuras 3.3 e 3.4.

A tabela 3.1 sintetiza as constantes de inativação obtidas nos vários ensaios de inativação.

Tabela 3.1 - Tabela com as constantes de inativação (k) obtidas para os microrganismos alvo – *Escherichia coli* e *Enterococcus faecium* – após exposição a LEDs que emitem a diferentes comprimentos de onda (255, 260, 265, 270 e 280 nm).

λ (nm)	<i>E. coli</i>	<i>E. faecium</i>
	k (cm ² /mJ) [R ²]	k (cm ² /mJ) [R ²]
255	2,243 ± 0,550 [0,985]	1,498 ± 0,100 [0,907]
260	1,0135 ± 0,254 [0,990]	0,739 ± 0,175 [0,904]
265	1,678 ± 0,293 [0,969]	1,557 ± 0,041 [0,962]
270	0,908 ± 0,138 [0,926]	0,946 ± 0,069 [0,905]
280	0,929 ± 0,250 [0,928]	0,944 ± 0,129 [0,952]

De acordo com os resultados representados nas Figuras 3.3, 3.4 e a Tabela 3.1, é possível constatar que, independentemente do comprimento de onda testado, os três pequenos UV LEDs que emitem luz a diferentes comprimentos de onda foram extremamente eficientes na inativação dos microrganismos alvo: *Escherichia coli* e *Enterococcus faecium*.

A eficiência de inativação dos LEDs que emitem a diferentes comprimentos de onda foi diferente para os dois microrganismos testados:

$$- \textit{Escherichia coli} - k_{255\text{nm}} > k_{265\text{nm}} > k_{260\text{nm}} > k_{280\text{nm}} \sim k_{270\text{nm}}$$

$$- \textit{Enterococcus faecium} - k_{265\text{nm}} > k_{255\text{nm}} > k_{270\text{nm}} \sim k_{280\text{nm}} > k_{260\text{nm}}$$

As constantes de inativação foram determinadas para as diferentes bactérias testadas nos ensaios realizados com os LEDs que emitem luz a 255, 260 e 265 nm. Nos ensaios realizados com estes comprimentos de onda, *E. faecium* foi mais resistente à radiação UV. Esta observação, está de acordo com o que foi descrito por Li *et al.*, (2019) na literatura. Este facto pode ser atribuído às características morfológicas e fisiológicas das bactérias, uma vez que, nas bactérias Gram positivas a estrutura da membrana externa poderá conferir resistência em relação à radiação (Nyangaresi, *et al.*, 2023).

De acordo com Zhang *et al.*, (2019), a abundância de bactérias Gram negativas diminui gradualmente com doses crescentes de UV, enquanto na inativação de bactérias Gram positivas são necessárias doses maiores de UV para atingir uma redução logarítmica idêntica. O mesmo foi verificado neste estudo, com o comprimento de onda de 255 nm, sendo necessárias doses ligeiramente superiores de UV para inativar *E. faecium*, comparativamente com *E.coli*.

Uma possível explicação para este fenómeno pode ser o facto de que as bactérias Gram positivas possuem uma estrutura da parede celular diferente, com uma camada mais espessa de peptidoglicanos que absorve mais radiação UV e portanto, impede a penetração da mesma na célula (Zhang *et al.*, 2019).

Esta diferença não foi registada nos ensaios realizados com os LEDs que emitem os comprimentos de onda de 270 e 280 nm. Estudos mais aprofundados ao nível dos componentes da membrana e mecanismos de inativação poderão ajudar a justificar estes resultados.

As Figuras 3.3 e 3.4 demonstram que com qualquer um dos comprimentos de onda testados os valores de inativação obtidos foram elevados, sendo superiores a 4 log de inativação, com doses de UV relativamente baixas.

Os coeficientes de determinação descritos na Tabela 3.1 mostram que a regressão linear explica bem os resultados obtidos e que as constantes de inativação obtidas podem ser usadas para estimar as doses necessárias para atingir diferentes níveis de inativação (Tabela 3.2).

A Tabela 3.2 mostra que são necessárias doses extremamente baixas (entre 2 e 5 mJ/cm²) para obter uma redução logarítmica de 4 logs. Como comparação, as doses de UV normalmente utilizadas para inativação variam entre 40-200 mJ/cm² (Beck *et al.* 2021).

Tabela 3.2 - Doses (em mJ/cm^2) necessárias para atingir diferentes níveis de inativação (2log, 4log e 6log) dos dois microrganismos alvo – *Escherichia coli* e *Enterococcus faecium* – após exposição a LEDs que emitem luz a diferentes comprimentos de onda (255, 260, 265, 270 e 280 nm).

$\lambda(\text{nm})$	<i>E. coli</i>			<i>E. faecium</i>		
	2-log	4-log	6-log	2-log	4-log	6-log
255	1	2	3	1	3	4
260	2	4	6	3	5	8
265	1	2	4	1	3	4
270	2	4	7	2	4	6
280	2	4	6	2	4	6

As Figuras suplementares 6.1 a 6.8 representam os resultados experimentais obtidos em função do tempo de exposição aos LEDs que emitem radiação a diferentes comprimentos de onda e suas combinações. Os resultados de inativação representados em função do tempo não permitem distinguir a eficiência de inativação dos diferentes comprimentos de onda em estudo, uma vez que os LEDs usados com diferentes comprimentos de onda emitem luz com uma intensidade muito diferente (Figura 3.1). As respostas de inativação para as bactérias em estudo foram semelhantes entre comprimentos de onda e em cada um dos reatores assim como para as combinações testadas.

Para além disso, o comprimento de onda de 260 nm também demonstrou ser eficiente na inativação de *E.coli* e *E.faecium*, e a explicação desse acontecimento pode estar no facto de que os 260 nm corresponderem ao pico de absorção de radiação UV para a maioria dos microrganismos (Beck *et al.*, 2021).

No seguimento destes resultados foram realizados ensaios de inativação com LEDs que emitem aos comprimentos de onda de 260, 270 e 280 nm, com a dose máxima de UV aplicada ($9 \text{ mJ}/\text{cm}^2$), para verificar a inativação usando matrizes reais e avaliar diferentes mecanismos de inativação.

3.1.3 Ensaios de inativação em amostras reais

3.1.3.1 Caracterização das amostras de água superficial

A água superficial recolhida foi caracterizada em termos do seu conteúdo em sólidos totais, suspensos e dissolvidos e microrganismos indicadores da qualidade da água (coliformes totais, *Escherichia coli* e enterococos). Os dados referentes às análises dos sólidos encontram-se presentes nas tabelas 3.3, 3.4 e 3.5.

Tabela 3.3 - Concentração de sólidos totais das amostras de água superficial.

Amostras	Peso do cadinho (g)	Peso do cadinho com amostra (g)	Resíduo (mg)	Volume (mL)	ST (g/L)
1	20,30195	20,93008	628,13	30	20,94
2	20,52545	21,16981	644,36		21,48
3	20,27249	20,90228	629,79		20,99
4	20,89523	21,53489	639,66		21,32

Tabela 3.4 - Concentração de sólidos suspensos totais em amostras de água superficial.

Amostras	Peso do filtro (g)	Peso do filtro com amostra (g)	Resíduo (mg)	Volume (mL)	SST (mg/L)
1	0,47922	0,49958	20,36	500	40,72
2	0,29632	0,3138	17,48		34,96
3	0,35112	0,36931	18,19		36,38
4	0,27583	0,29513	19,3		38,60

Tabela 3.5 - Concentração de sólidos totais (ST), suspensos (SS) e dissolvidos (SD) em amostras de água superficial.

Amostras	ST (mg/L)	SS (mg/L)	SDT (mg/L)
1	20937,67	40,72	20896,95
2	21478,67	34,96	21443,71
3	20993,00	36,38	20956,62
4	21322,00	38,60	21283,40
Média ± desvio padrão	21182,83 ± 260,15	37,67 ± 2,53	21145,17 ± 261,66

Os valores determinados mostram que a água superficial analisada possui uma baixa concentração de sólidos uma vez que, o valor máximo de sólidos suspensos totais determinados foi 40,7mg/L, que se encontra abaixo do valor máximo recomendado (VMR), de 60mg/L descrito no (*Decreto-Lei n.o 236/98*, 1998).

A Figura 3.5 representa os valores de ocorrência de coliformes totais, *E. coli* e enterococos medidos na água superficial recolhida.

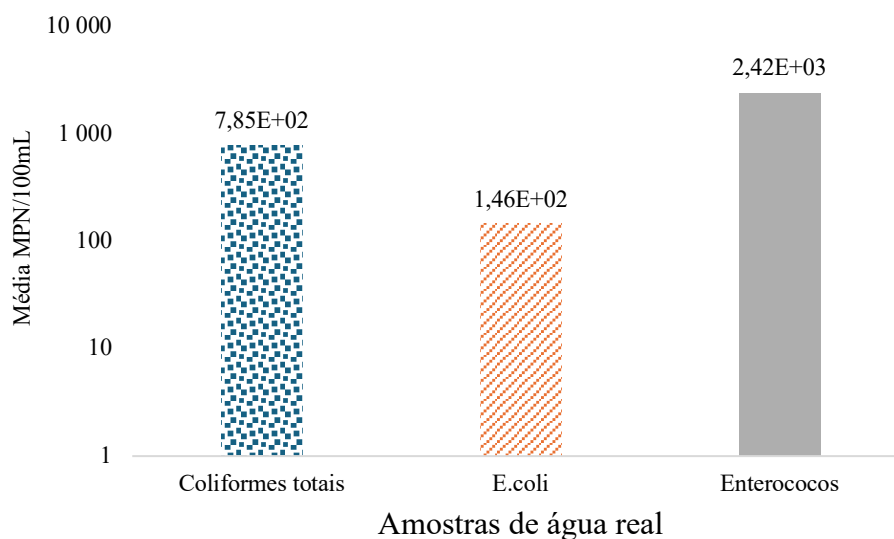


Figura 3.5 - Número mais provável de coliformes totais, *Escherichia coli* e enterococos por 100mL, de amostra de água superficial.

O número mais provável de enterococos é superior ao de coliformes totais, na amostra de água recolhida o que pode ser explicado pelo facto das espécies deste género poderem persistir durante mais tempo do que *E. coli* e coliformes em ambientes aquáticos. (Shergill, S., & Pitt, R., 2012).

Os dados referentes à ocorrência de coliformes totais e *E.coli* em água superficial representados na Figura 3.5 estão concordantes com outras análises realizadas na mesma matriz (Lopes, 2022).

3.1.3.2 Ensaio de inativação em água superficial

A Figura 3.6 representa os resultados de inativação de coliformes totais, *E. coli* e enterococos presentes numa amostra de água superficial após exposição a LEDs que emitem a diferentes comprimentos de onda com a dose máxima de UVs utilizada nos ensaios de inativação descritos na secção 3.1.2 (9 mJ/cm²). O símbolo “>” significa que os microrganismos não foram detetados nas amostras recolhidas após inativação.

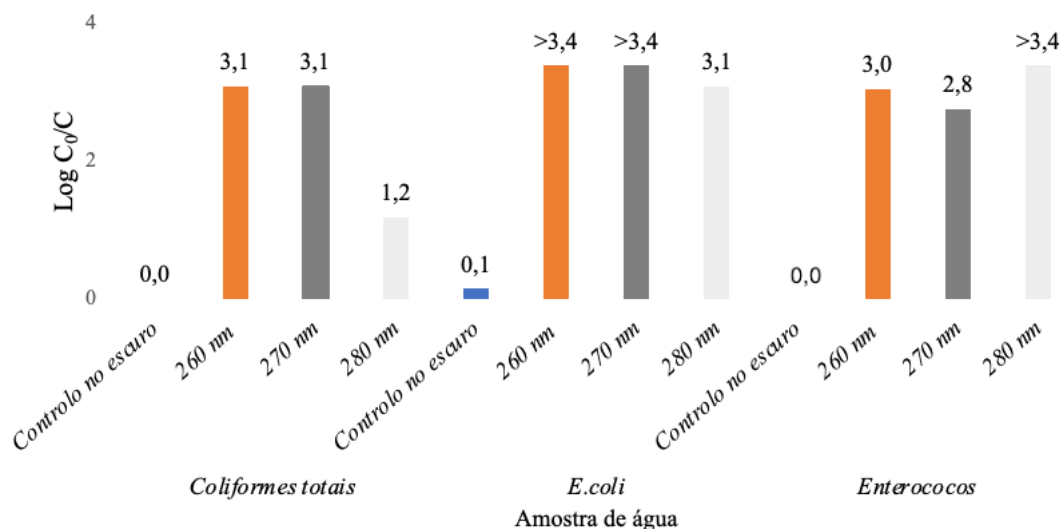


Figura 3.6 - Redução logarítmica [log (Ci/C)] de coliformes totais, *E. coli* e enterococos presentes numa amostra de água superficial após exposição a três pequenos LEDs que emitem luz a diferentes comprimentos de onda (dose de UVs 9 mJ/cm²); “>” significa que os microrganismos não foram detetados nas amostras recolhidas após inativação.

O tratamento aplicado com UV LEDs, na amostra de água superficial recolhida provocou a diminuição do número de UFCs de todos os microrganismos testados, com reduções logarítmicas superiores a: 3 obtidas com os LEDs que emitem luz a 260 nm, 2,8 com os LEDs que emitem luz a 270 nm e 1,2 com os LEDs que emitem luz a 280 nm (Figura 3.6).

De acordo com os resultados obtidos, o comprimento de onda que parece ter sido mais eficiente na inativação de coliformes totais, *E. coli* e Enterococos foram os UV LEDs de 260 nm, uma possível explicação para esta ocorrência é o facto dos 260 nm corresponderem ao pico de absorção do DNA (Minh *et al.*, 2019).

Os menores valores de redução obtidos nas matrizes reais em relação aos ensaios realizados em tampão fosfato podem ser explicados devido à composição da matriz e menor concentração de microrganismos presentes na matriz de água real. Para além disso, nestes ensaios os microrganismos testados estavam presentes na matriz de água (microrganismos ambientais), enquanto nos ensaios em tampão fosfato foram usados microrganismos de coleção de culturas.

Os microrganismos ambientais podem ter adquirido resistência aos UVs devido à sua exposição prolongada à radiação solar. Este efeito foi reportado por outros autores (Pereira *et al.*, 2013) ao comparar as taxas de inativação da mesma espécie de leveduras isoladas de água superficial e água subterrânea. Adicionalmente, as amostras de água real possuem matéria orgânica e sólidos que podem proteger os microrganismos na inativação.

No entanto, os resultados obtidos demonstraram que uma dose de UVs baixa emitida por três pequenos LEDs garantiu uma inativação elevada de diferentes microrganismos usados como indicadores de qualidade da água.

3.2 Análise de mecanismos de inativação

3.2.1 Danos morfológicos

As imagens de microscopia de fluorescência permitiram analisar a morfologia das células antes e após a exposição aos UV LEDs. As amostras de *Escherichia coli* foram expostas aos UV LEDs que emitem a diferentes comprimentos de onda durante tempos de exposição diferentes que correspondem à mesma dose: 9 mJ/cm².

De uma maneira geral, as células de *E.coli* não parecem ter sofrido alterações visíveis ao nível das membranas, depois da exposição aos UV LEDs (Figura 3.7). O filtro vermelho representado na Figura 3.7 corresponde ao corante FM4-64, que marca a membrana de *E.coli* onde não se denota nenhum dano visível nas membranas, deixando assim de lado a hipótese de que os LEDs poderiam comprometer esta estrutura com a dose aplicada.

Através da utilização do corante ciano DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindole), foi possível observar o material genético de *E.coli*, destacando-se nas imagens com coloração azul zonas menos homogêneas nas amostras sujeitas aos UVs. Não é possível observar diferenças visíveis da exposição aos LEDs que emitem a diferentes comprimentos de onda. De acordo com Shibai *et al.*, (2017), as zonas menos homogêneas podem indicar possível stress celular induzido pela radiação UV. Estas análises deverão ser repetidas após ensaios de inativação com doses mais elevadas.

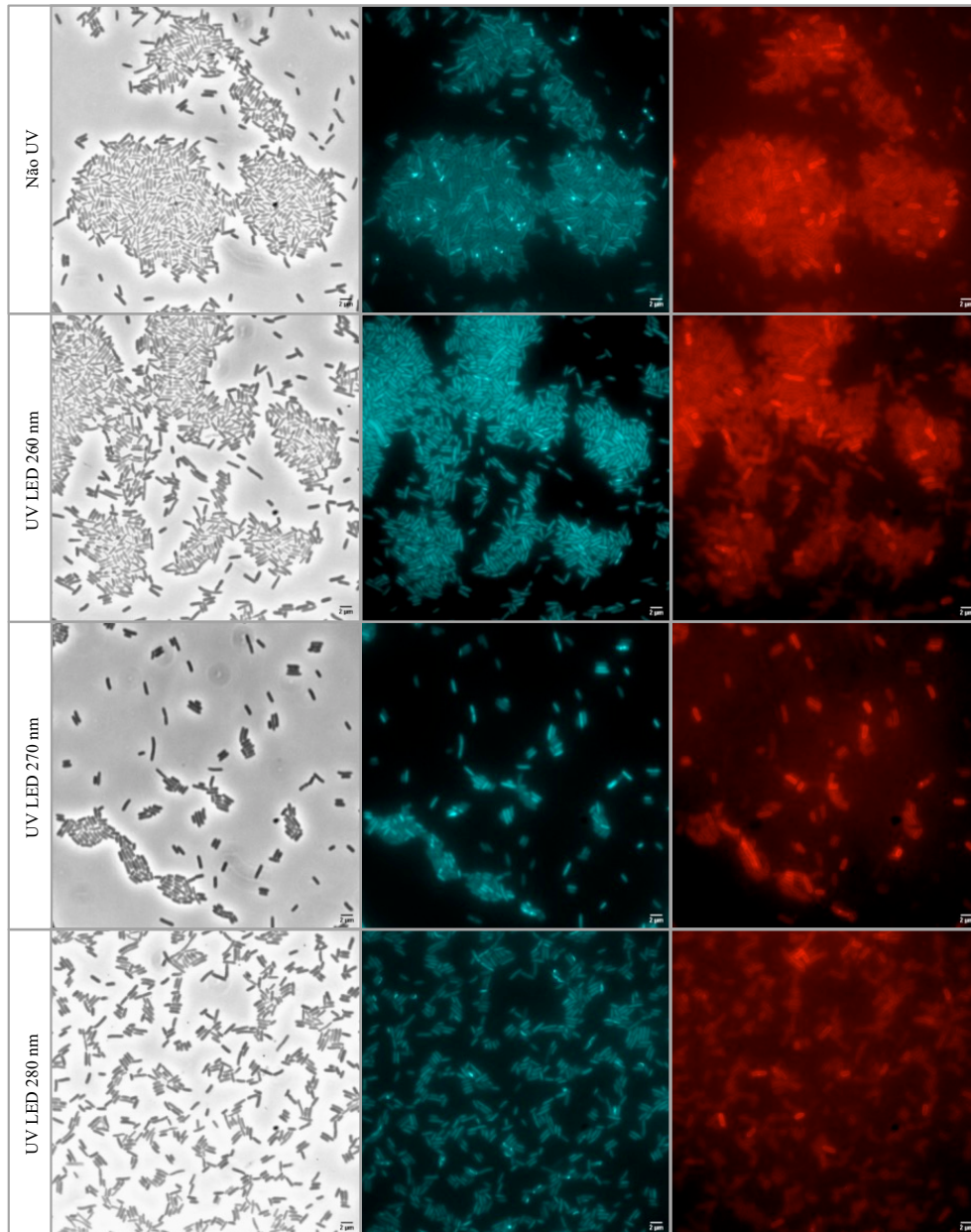


Figura 3.7 - Resultados da microscopia de fluorescência de *Escherichia coli* antes e após exposição a LEDs que emitem a diferentes comprimentos de onda (dose de $9\text{mJ}/\text{cm}^2$). 1ª coluna - Imagem de microscopia, com contraste de fase (cinzento); 2ª coluna - Coloração do DNA de *E. coli* com DAPI (azul); 3ª coluna - Coloração da membrana celular com o corante FM4-64.

3.2.2 Formação de dímeros

A inativação pela radiação UV-B e UV-C é efetuada através da formação de danos no DNA dos microrganismos. As principais lesões no DNA resultado da radiação UV são a formação de dímeros de ciclobutano pirimidina (CPDs) (Nyangaresi *et al.*, 2018).

De forma a quantificar os danos provocados no DNA, induzidos pela radiação UV, foi medida a concentração de CPDs formados quando a mesma dose de UV de 9 mJ/cm² foi aplicada usando LEDs que emitem luz a diferentes comprimentos de onda (Figura 3.9). A Figura 3.8 representa a curva de calibração usada para determinar as concentrações de CPDs das amostras analisadas.

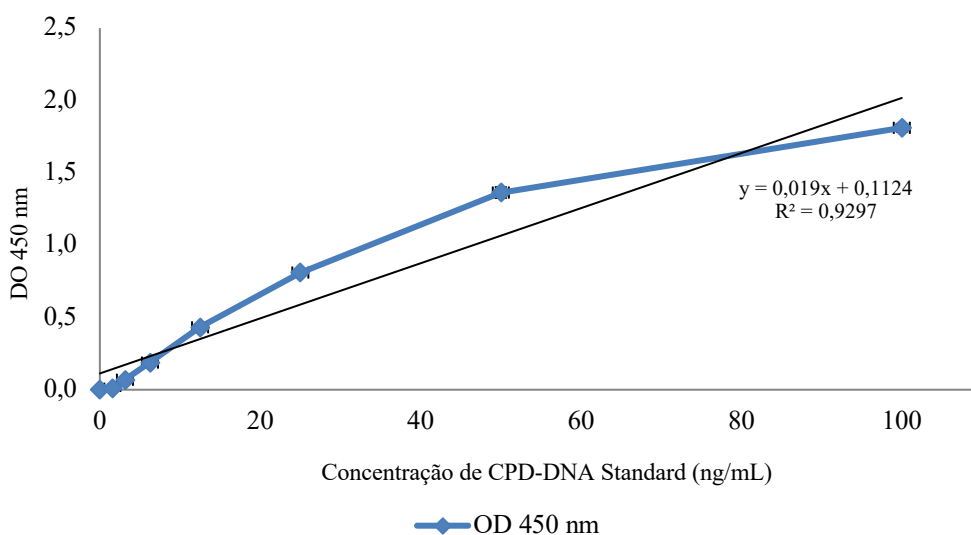


Figura 3.8 – Curva de calibração usada para determinar as concentrações de CPD das amostras analisadas.

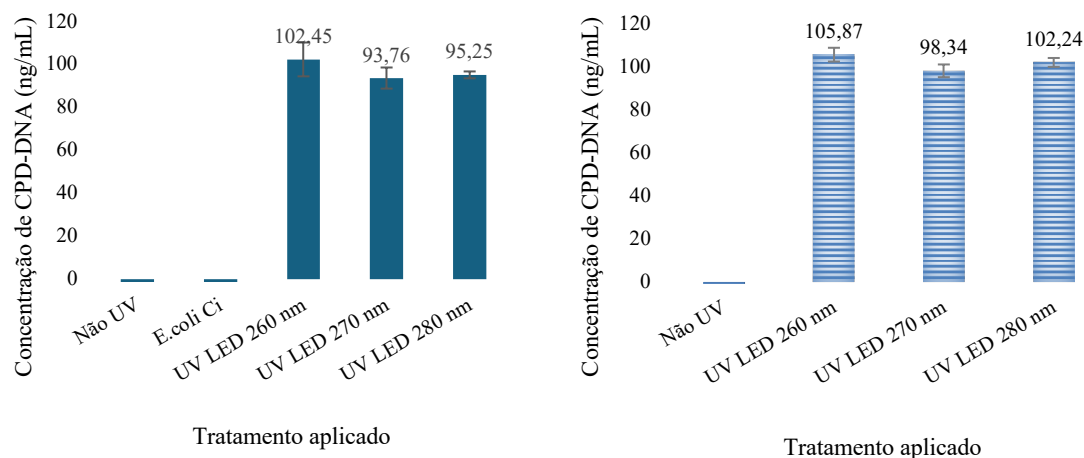


Figura 3.9 - Concentração de dímeros de ciclobutano pirimidina (CPD) formados no DNA de *E. coli* (A) e *E. faecium* (B) antes e após exposição a uma dose de UV de 9 mJ/cm² dos UV LEDs que emitem luz a diferentes comprimentos de onda: 260, 270 e 280 nm. As barras de erro representam os resultados obtidos em duplicados.

Os resultados obtidos demonstram que não foram detetados dímeros nas amostras que não foram sujeitas aos UVs e que os UV LEDs afetaram o DNA das bactérias alvo.

A concentração de dímeros de ciclobutano pirimidina medida quando a mesma dose (9 mJ/cm²) foi aplicada usando LEDs que emitem luz a diferentes comprimentos de onda (260 nm, 270 nm e 280 nm) foi semelhante. A formação de dímeros de ciclobutano pirimidina medidos após inativação das diferentes bactérias alvo (*Escherichia coli* e *Enterococcus faecium*) com um mesmo comprimento de onda também foi extremamente semelhante.

O ligeiro aumento da concentração de dímeros de ciclobutano pirimidina medido após exposição das duas bactérias alvo às LEDs que emitem luz a 260 nm comparativamente à concentração de dímeros medida após exposição às LEDs que emitem luz a 270 nm e 280 nm poderá ser devido ao pico de absorção do DNA.

4. Conclusão

O presente trabalho permitiu avaliar a eficiência dos UV LEDs na inativação de duas bactérias alvo, *Enterococcus faecium* e *Escherichia coli*, bem como a inativação de microrganismos em matriz de água real. De acordo com os resultados obtidos para a dose máxima de UV aplicada (9 mJ/cm^2), três pequenos LEDs que emitem luz a diferentes comprimentos de onda foram eficazes para inativar bactérias provenientes de coleção de culturas e bactérias ambientais. Esta dose baixa não permitiu detetar, por microscopia, danos visíveis nas membranas celulares. Foram observados danos no DNA através das análises de microscopia de fluorescência e da quantificação de dímeros de ciclobutano pirimidina.

A formação de dímeros de ciclobutano pirimidina foi semelhante nas duas bactérias alvo após exposição à mesma dose de UVs. Para além disso, a formação de dímeros de ciclobutano pirimidina foi também semelhante após exposição a LEDs que emitem luz a diferentes comprimentos de onda.

No entanto seria interessante realizar estudos mais aprofundados ao nível dos componentes da membrana e mecanismos de inativação que possam justificar os resultados de inativação obtidos em tampão fosfato. Para além disso, devem ser realizados ensaios com microrganismos ambientais para verificar a eficácia da aplicação de LEDs em matrizes de água reais.

Para além disso, é importante testar o potencial de foto reativação das estirpes de bactérias utilizadas neste estudo, no escuro e na presença de luz, de forma a confirmar a eficiência dos LEDs e garantir as melhores condições de inativação de microrganismos presentes em amostras de água.

5. Referências Bibliográficas

Beck, S., Suwan, P., Rathnayake, T., Nguyen, T., Huanambal-Sovero, V., Boonyapalanant, B., Hull, N. & Koottatep, T. (2021). ‘*Woven-Fiber Microfiltration (WFMF) and Ultraviolet Light Emitting Diodes (UV LEDs) for Treating Wastewater and Septic Tank Effluent*’. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/w13111564>.

Biorad (2023). *RAPID'E.coli 2 Medium*. <https://www.bio-rad.com/en-pt/product/rapide-coli-2-medium?ID=2611b802-04d7-43f5-a63e-e2dca473f65f>.

Boehm, A. & Sassoubre L., *Enterococci as Indicators of Environmental Fecal Contamination*. (2014). De: Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; 2014-. PMID: 24649503.

Cell biolabs. (2022). OxiSelect™ UV-Induced DNA Damage ELISA Kit (CPD Quantitation). <https://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/STA-322-cpd-elisa-kit.pdf>

Chapman, D. (1992). *Water Quality Assessments, Water Quality Assessments*. Taylor & Francis. <https://doi.org/10.4324/9780203476710>.

Cheng, Y., Chen, H., Basurto, L., Protasenko, V., Islam, M. & Moraru, C. (2020). ‘Inactivation of *Listeria* and *E. coli* by Deep-UV LED: effect of substrate conditions on inactivation kinetics’, *Scientific reports*, 10 (1), p. 3411. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60459-8>.

Collivignarelli, M., Abbà, A., Benigna, I., Sorlini, S. & Torretta, V. (2018). ‘Overview of the main disinfection processes for wastewater and drinking water treatment plants’, *Sustainability (Switzerland)*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/su10010086>.

Diário da República n.º 176/1998, Série I-A (1998). Ministério do ambiente. (3676-3722). *Decreto-Lei n.º 236/98* <https://diariodarepublica.pt/dr/detalhe/diario-republica/176-1998-108665>.

Devane, M. Moriarty, E., Weaver, L., Cookson, A. & Gilpin, B. (2020). 'Fecal indicator bacteria from environmental sources; strategies for identification to improve water quality monitoring', *Water Research*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116204>.

Enterolert*-IDEXX US. (n.d.). https://www.idexx.com/en/water/water_products_services/enterolert/.

Fitzhenry, K. Clifford, E., Rowan, N. & Val del rio, A. (2021). 'Bacterial inactivation, photoreactivation and dark repair post flow-through pulsed UV disinfection', *Journal of Water Process Engineering*, 41(Abril), p. 102070.: <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2021.102070>.

James, C., Gumbart, J., Bebb, M. Jensen G. & Roux, B. (2014). 'Escherichia coli Peptidoglycan Structure and Mechanics as Predicted by Atomic-Scale Simulations', *PLoS Computational Biology*, 10(2):. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003475>.

Johnson, M. B., & Criss, A. K. (2013). Fluorescence microscopy methods for determining the viability of bacteria in association with mammalian cells. *Journal of Visualized Experiments*, (79). <https://doi.org/10.3791/50729>

Health Canada (2019). 'Guidance on the use of Enterococci bacteria as indicators in Canadian drinking water supplies. <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/publications/healthy-living/guidance-use-enterococci-indicator-canadian-drinking-water-supplies.html>

Kim, D., Kim, S. & Kang, D (2017). 'Bactericidal effect of 266 to 279 nm wavelength UVC-LEDs for inactivation of Gram positive and Gram negative foodborne pathogenic bacteria and yeasts', *Food Research International*. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.04.009>.

Kim S-J, Kim D-K & Kang D-H. (2016). Using UVC light-emitting diodes at wavelengths of 266 to 279 nanometers to inactivate foodborne pathogens and pasteurize sliced cheese. *Appl Environ Microbiol* 82:11–17. <https://doi.org/10.1128/AEM.02092-15>.

Li, X., Cai, M., Wang, L. Fanfan, N., Yang, D. & Zhang, G. (2019). 'Evaluation survey of microbial disinfection methods in UV-LED water treatment systems', *Science of the Total Environment*, 659, pp. 1415–1427. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.344>.

Lopes, L. (FCUL) (2022). Inactivation of antibiotic-resistant bacteria present in water using light emitting diodes and a photocatalytic membrane reactor. (Dissertação de mestrado). Faculdade de Ciências da Universidade Lisboa.

Lui, G., Roser, D., Corkish, R., Ashbolt, N. & Stuetz, R. (2016). 'Point-of-use water disinfection using ultraviolet and visible light-emitting diodes', *Science of the Total Environment*, 553, pp. 626–635. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.02.039>.

Morrison, C. M., Hogard, S., Pearce, R., Gerrity, D., von Gunten, U., & Wert, E. C. (2022). Ozone disinfection of waterborne pathogens and their surrogates: A critical review. *Water Research*, 214, 118206. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.118206>.

Nguyen, T., Suwan, P., Koottatep, T. & Beck S. (2019). 'Application of a novel, continuous-feeding ultraviolet light emitting diode (UV-LED) system to disinfect domestic wastewater for discharge or agricultural reuse', *Water Research*, 153, pp. 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.01.006>.

Navarro, M. O., Dilarri, G., Simionato, A. S., Grzegorzcyk, K., Dealis, M. L., Cano, B. G., Barazetti, A. R., Afonso, L., Chryssafidis, A. L., Ferreira, H., & Andrade, G. (2020). Determining the targets of fluopsin C action on gram-negative and gram-positive bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01076>.

Nyangaresi, P., Qin, Y., Chen, G., Zhang, B. & Shen, Y. (2018). 'Effects of single and combined UV-LEDs on inactivation and subsequent reactivation of *E. coli* in water disinfection', *Water Research*, 147, p. 11. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.10.014>.

Nyangaresi, P., Rathnayake, T. & Beck, S. (2023). 'Evaluation of disinfection efficacy of single UV-C, and UV-A followed by UV-C LED irradiation on *Escherichia coli*, *B. spizizenii* and MS2 bacteriophage, in water', *Science of the Total Environment*, p. 8. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160256>.

Oliveira, B; Crespo, M. & Pereira, V. (2020). Small but powerfull: Light emitting diodes for inactivation of *Aspergillus* species in real water matrices. *WaterResearch* p. 11 <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115108>.

Pal, A., Pehkonen, S. O., Yu, L. E., & Ray, M. B. (2007). Photocatalytic inactivation of gram-positive and gram-negative bacteria using fluorescent light. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 186(2–3), 335–341. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2006.09.002>

Pepper, I.L., Gerba, C.P. & Gentry, T.J. (2014). *Environmental Microbiology: 3ªEdição*. Academic Press. Elsevier. ISBN: 978-0-12-394626-3 pp. 13-16, 511-624.

Pereira, V., Ricardo, J., Galinha, R. Benoliel, M. & Crespo, M. (2013). ‘Occurrence and low-pressure ultraviolet inactivation of yeasts in real water sources’, in *Photochemical and Photobiological Sciences*. Royal Society of Chemistry, pp. 626–630. <https://doi.org/10.1039/c2pp25225b>.

Pullerits, K., Ahlinder, J., Holmer, L., Salomonsson, E., Öhrman, C., Jacobsson, K., Dryselius, R., Forsman, M., Paul, C. J., & Rådström, P. (2020). Impact of UV irradiation at full scale on bacterial communities in drinking water. *Npj Clean Water*, 3(1). <https://doi.org/10.1038/s41545-020-0057-7>

Reitter, C., Petzoldt, H., Korth, A., Schwab, F. Stange, C., Hamsch, B. Tiehm, A., Lagkouvardos, I., Gescher, J., Hügler, M. (2021). ‘Seasonal dynamics in the number and composition of coliform bacteria in drinking water reservoirs’, *Science of the Total Environment*, 787. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147539>.

Romero-Martínez, L., Duque-Sarango, P., González-Martín, C., Moreno-Andrés, J., Acevedo-Merino, A. & Nebot, E. (2023). ‘Inactivation efficacy and reactivation of fecal bacteria with a flow-through LED ultraviolet reactor: Intraspecific response prevails over interspecific differences’, *Journal of Water Process Engineering*, 52(January). <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2023.103497>.

Saravanan, A., Kumar, P., Jeevanantham, S., Karishma, S. Tajsabreen, B. Yaashikaa, P. & Reshma, B. (2021). 'Effective water/wastewater treatment methodologies for toxic pollutants removal: Processes and applications towards sustainable development', *Chemosphere*, 280, p. 130595.: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130595>.

Sathya, K., Nagarajan, K., Malar, G. Rajalakshmi, S. & Lakshmi, P. (2022). 'A comprehensive review on comparison among effluent treatment methods and modern methods of treatment of industrial wastewater effluent from different sources', *Applied Water Science*, 12(4), pp. 1–27. <https://doi.org/10.1007/s13201-022-01594-7>.

Shergill, S.S. & Pitt, R. (2012). 'Quantification of *Escherichia coli* and Enterococci Levels in Wet Weather and Dry Weather Flows', *Proceedings of the Water Environment Federation*, 2004(10), pp. 746–774. <https://doi.org/10.2175/193864704784131446>.

Shibai, A., Takahashi, Y., Ishizawa, Y., Motooka, D., Nakamura, S., Ying, B. & Tsuru, S. (2017). 'Mutation accumulation under UV radiation in *Escherichia coli*', pp. 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15008-1>.

Sholtes, K., Keliher, R. & Linden, K. (2019). 'Standardization of a UV LED Peak Wavelength, Emission Spectrum, and Irradiance Measurement and Comparison Protocol'. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b02567>.

Song, K., Mohseni, M. & Taghipour, F. (2016). 'Application of ultraviolet light-emitting diodes (UV-LEDs) for water disinfection: A review', *Water Research*, 94, pp. 341–349. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.03.003>.

Sun, Z., Li, M., Li, W., & Qiang, Z. (2022). A review of the Fluence Determination Methods for UV reactors: Ensuring the reliability of UV disinfection. *Chemosphere*, 286, 131488. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131488>

Tacão, M., Laço, J., Teixeira, P. & Henriques, I. (2022). 'CTX-M-Producing Bacteria Isolated from a Highly Polluted River System in Portugal'. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ijerph191911858>.

Tamai, S. & Suzuki, Y. (2023). 'Diversity of Fecal Indicator Enterococci among Different Hosts: Importance to Water Contamination Source Tracking', *Microorganisms*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11122981>.

World Health Organization (2018). *World Health Organization*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/e-coli> (Accessed: 16 August 2023).

Zhang, Z., Li, B., Li, N., Sardar, M., Song, T., Zhu, C., Lv, X., & Li, H. (2019). 'Effects of UV disinfection on phenotypes and genotypes of antibiotic-resistant bacteria in secondary effluent from a municipal wastewater treatment plant', *Water Research*, 157, pp. 546–554. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.03.079>.

Zhou, M., Zhang, Y., Wang, J., Shi, Y. & Puig, V. (2022). 'Water Quality Indicator Interval Prediction in Wastewater Treatment Process Based on the Improved BES-LSSVM Algorithm', *Sensors*, 22(2), pp. 1–24. <https://doi.org/10.3390/s22020422>.

6. Anexo

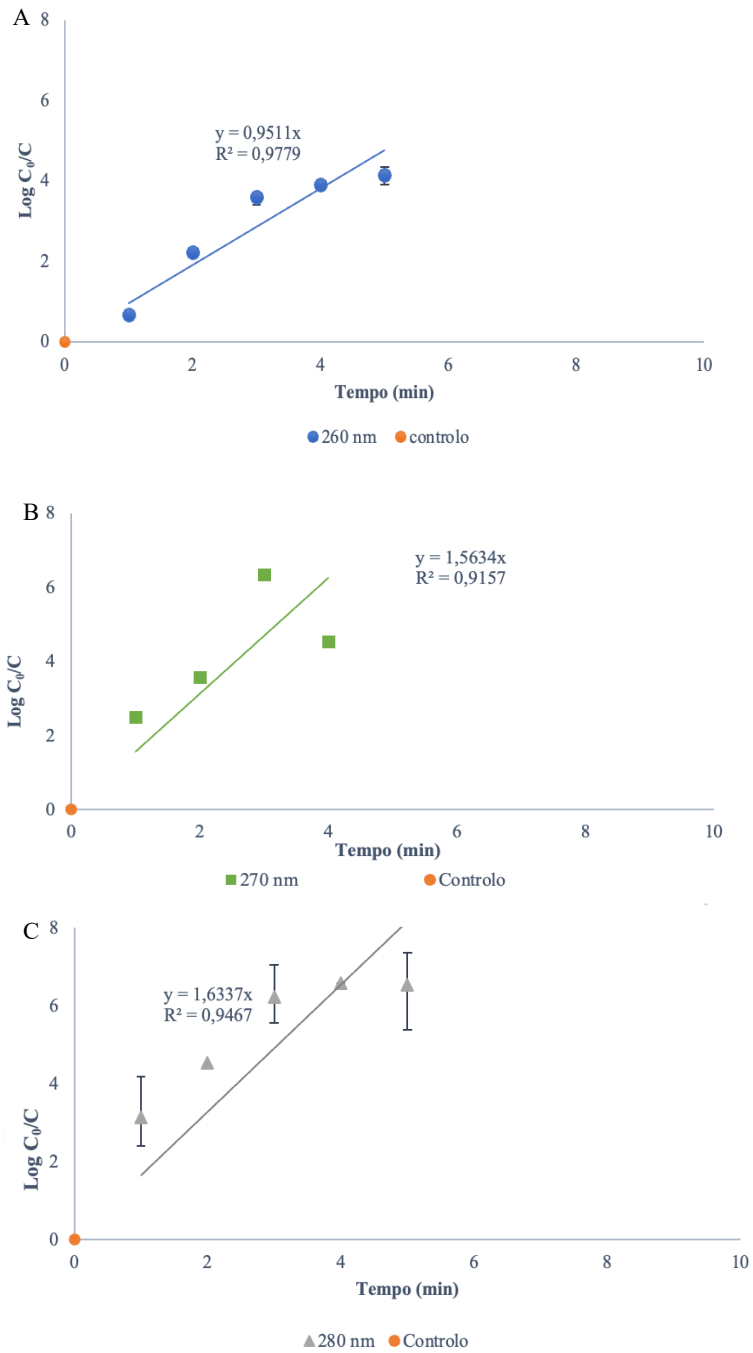


Figura suplementar 6.1 – Redução logarítmica [$\log (C_i/C)$] de *Enterococcus faecium* após exposição a UV LEDs que emitem a diferentes comprimentos de onda em função do tempo em minutos. As barras de erro correspondem a réplicas realizadas em duplicado ou triplicado. A: 260nm; B: 270 nm; C: 280 nm.

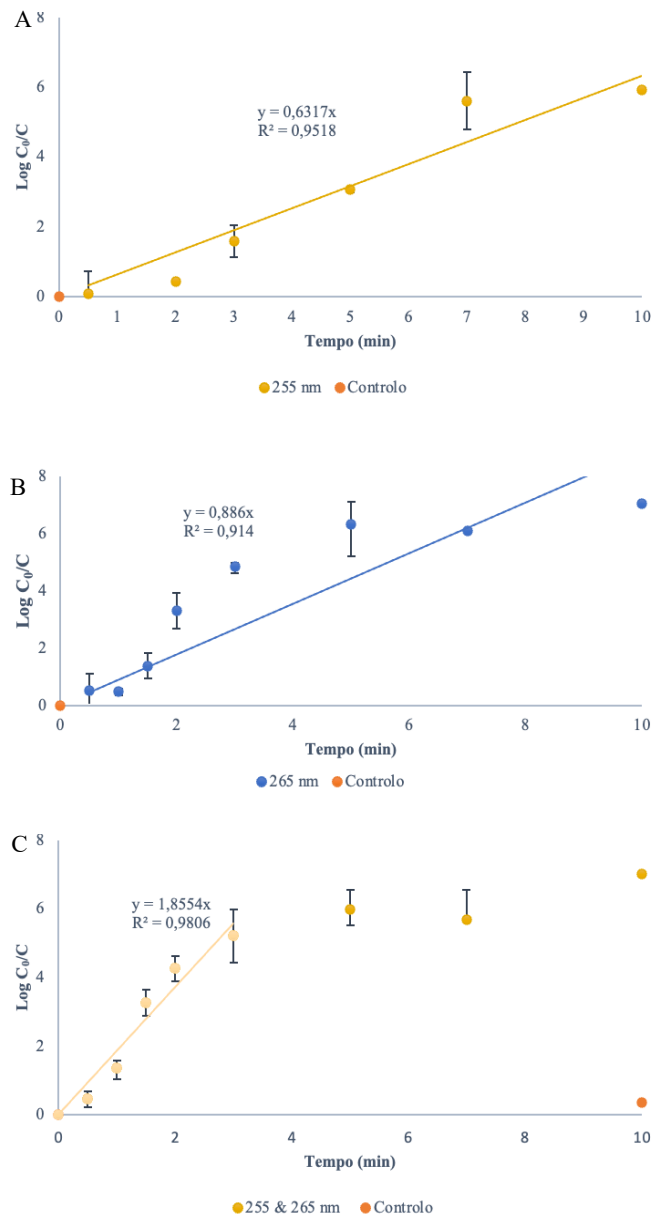


Figura suplementar 6.2 – Redução logarítmica [$\log (C_i/C)$] de *Enterococcus faecium* após exposição a UV LEDs que emitem a diferentes comprimentos de onda em função do tempo em minutos. As barras de erro correspondem a réplicas realizadas em duplicado ou triplicado. A: 255 nm; B: 265 nm; C: 255 e 265 nm.

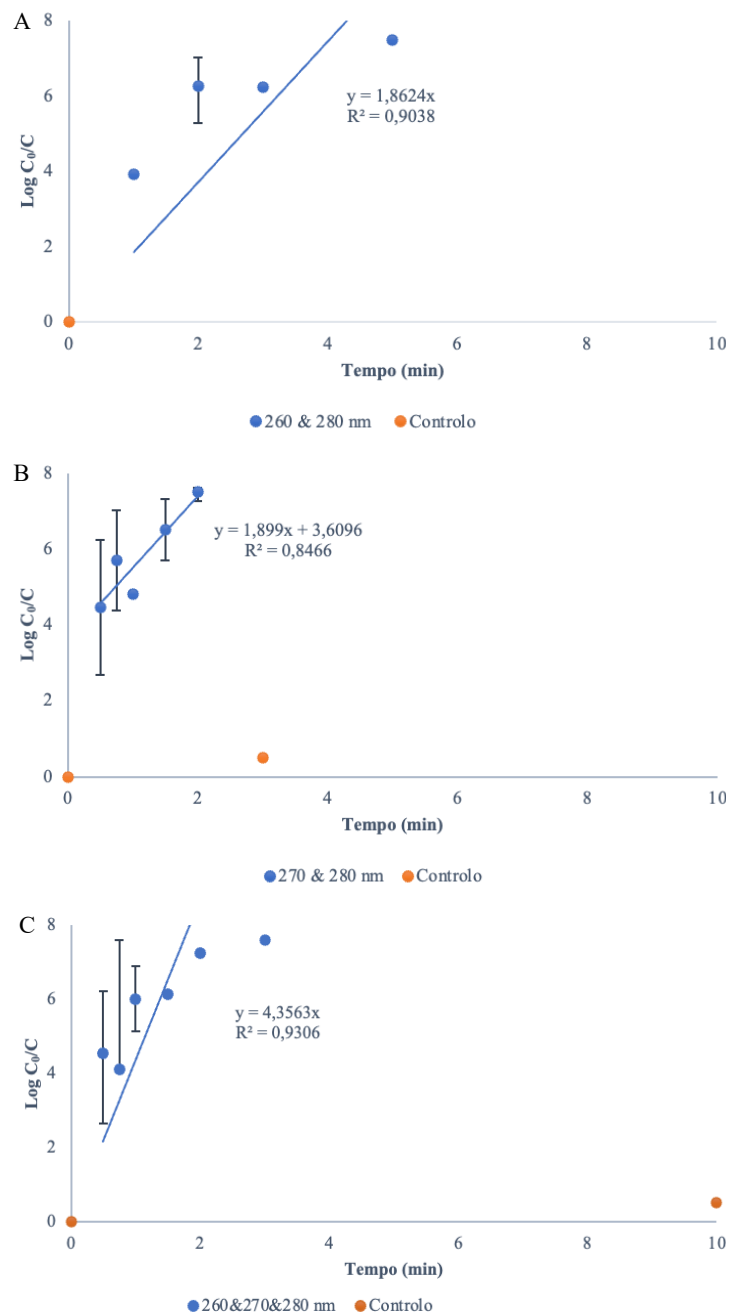


Figura suplementar 6.3 - Redução logarítmica [$\log (C_0/C)$] de *Enterococcus faecium* após exposição a UV LEDs que emitem a diferentes comprimentos de onda em função do tempo em minutos. As barras de erro correspondem a réplicas realizadas em duplicado ou triplicado. A: 260 e 280 nm; B: 270 e 280 nm; C: 255 e 265 nm.

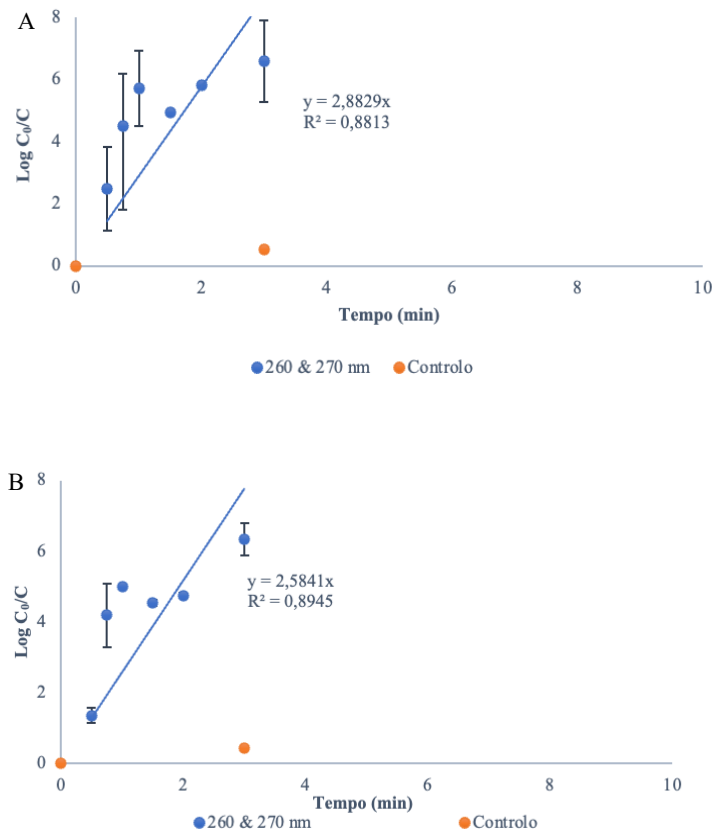


Figura suplementar 6.4 - Redução logarítmica [$\text{Log}(C_i/C)$] dos microrganismos alvo após exposição a UV LEDs que emitem a os comprimentos de onda de 260 e 270 nm, em função do tempo em minutos. As barras de erro correspondem a réplicas realizadas em duplicado ou triplicado. A: *Enterococcus faecium*; B: *Escherichia coli*.

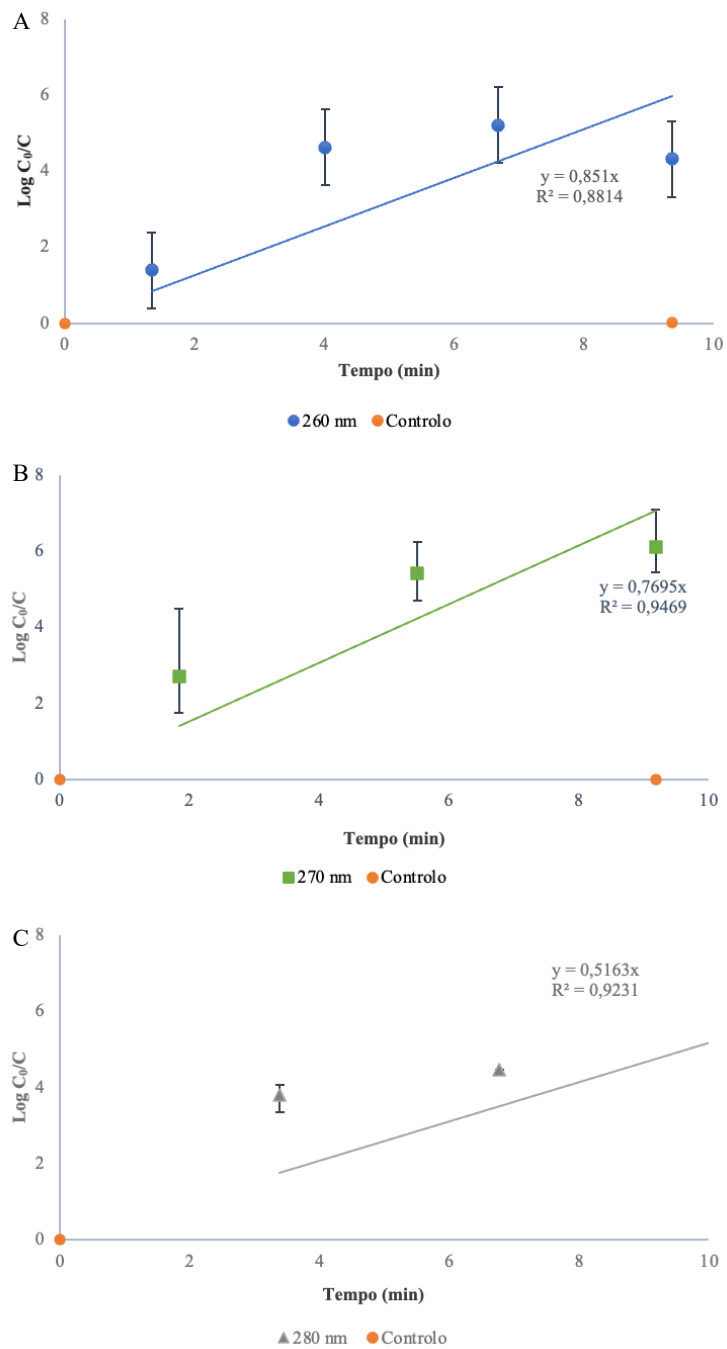


Figura suplementar 6.5 - Redução logarítmica [$\log(C_t/C)$] de *Escherichia coli* após exposição a UV LEDs que emitem a diferentes comprimentos de onda em função do tempo em minutos. As barras de erro correspondem a réplicas realizadas em duplicado ou triplicado. A: 260nm; B: 270 nm; C: 280 nm.

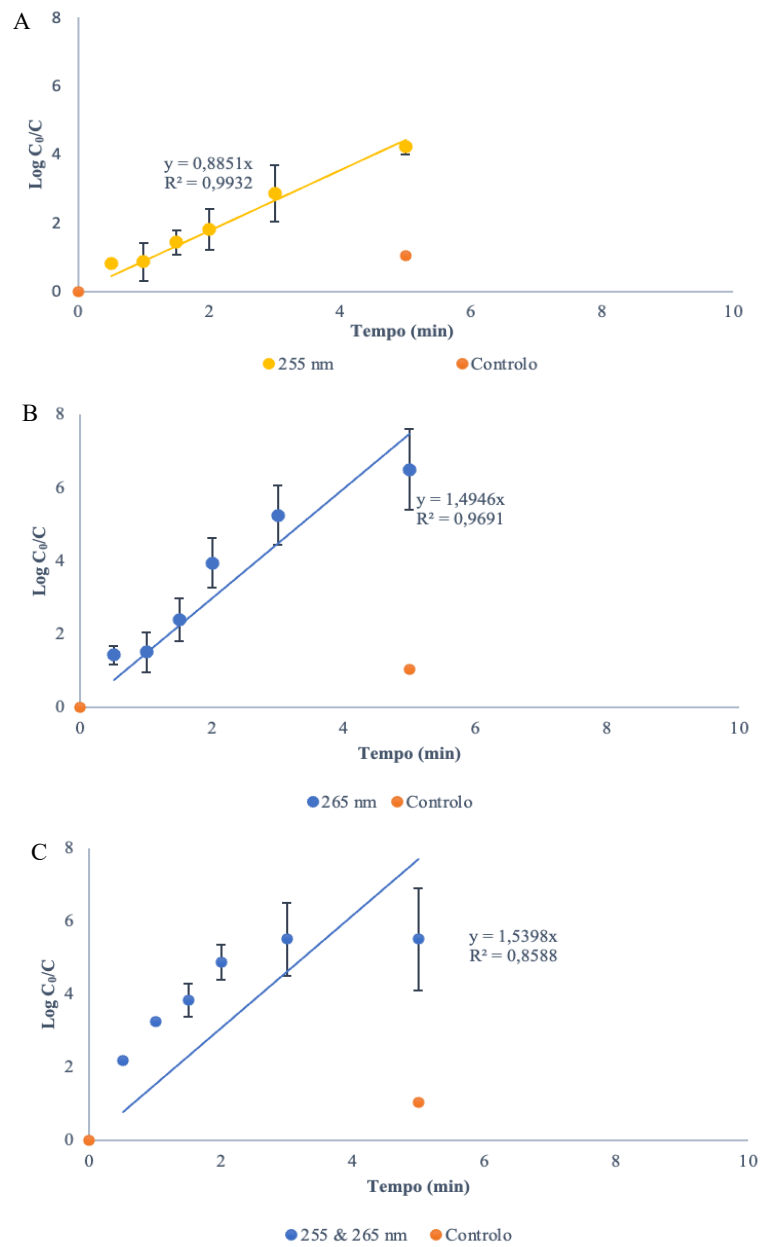


Figura suplementar 6.6 - Redução logarítmica [$\log (C_i/C)$] de *Escherichia coli* após exposição a UV LEDs que emitem a diferentes comprimentos de onda em função do tempo em minutos. As barras de erro correspondem a réplicas realizadas em duplicado ou triplicado. A: 255nm; B: 265 nm; C: 255 e 265 nm.

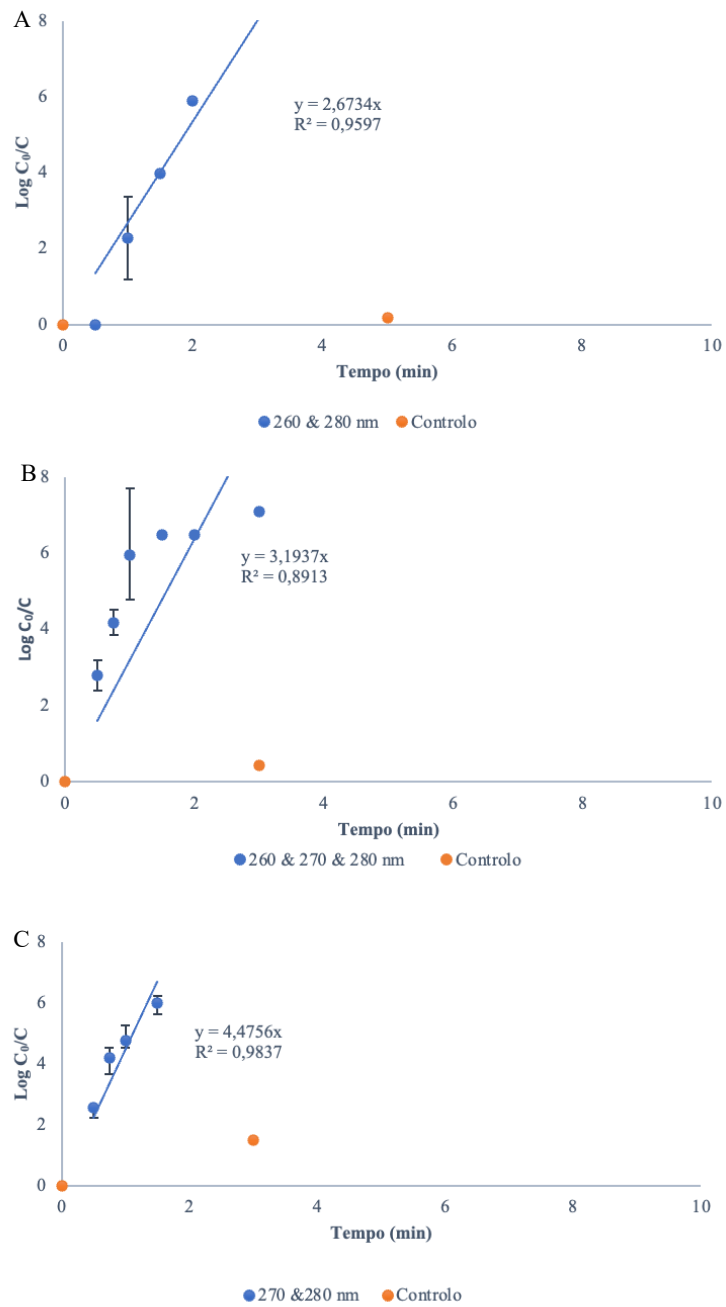


Figura suplementar 6.7 - Redução logarítmica [$\log (C_i/C)$] de *Escherichia coli* após exposição a UV LEDs que emitem a diferentes comprimentos de onda em função do tempo em minutos. As barras de erro correspondem a réplicas realizadas em duplicado ou triplicado. A: 260 & 280nm; B: 260, 270 & 280 nm; C: 270 & 280 nm.

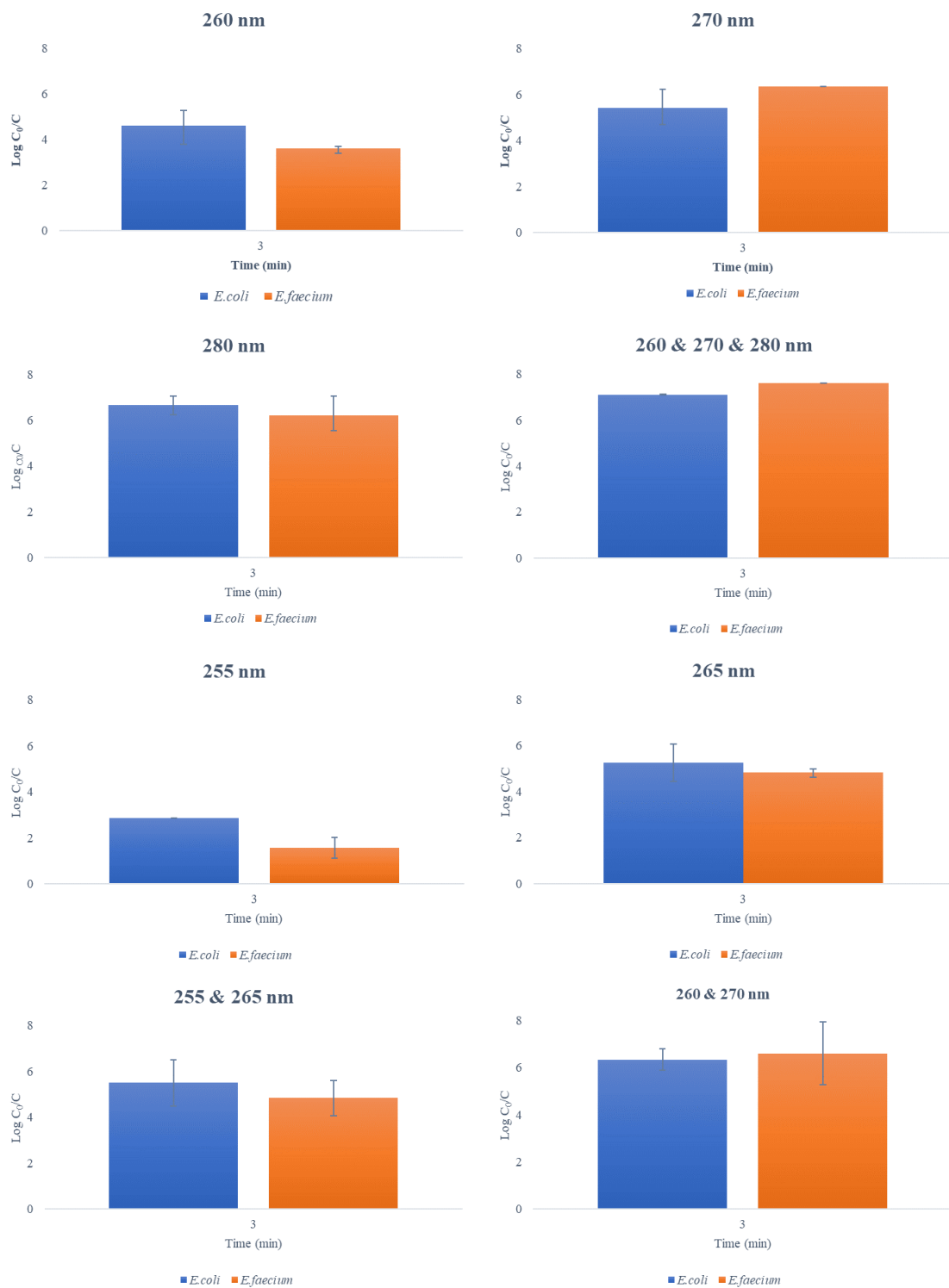


Figura suplementar 6.8 - Gráficos com os resultados de inativação de *Escherichia coli* e *Enterococcus faecium* durante a exposição aos UV LEDs com comprimentos de onda (255, 260, 265, 270 e 280 nm). As barras de erro representam os ensaios realizados em duplicado ou triplicado.

