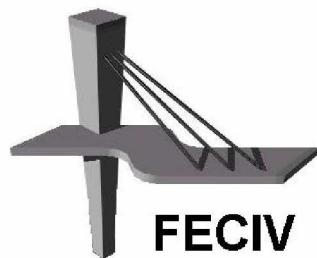


Dissertação DE MESTRADO

**VERIFICAÇÃO DA CAPACIDADE FOTODEGRADANTE DE
UM COMPÓSITO POLIMÉRICO COM RESÍDUO VÍTREO
VISANDO À INATIVAÇÃO DE PATÓGENOS**

PEDRO DE ALMEIDA CARÍSIO

UBERLÂNDIA, 05 de outubro de 2016



FACULDADE DE ENGENHARIA CIVIL
Programa de Pós-graduação em Engenharia Civil



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

FACULDADE DE ENGENHARIA CIVIL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL



Pedro de Almeida Carísio

**VERIFICAÇÃO DA CAPACIDADE FOTODEGRADANTE DE
UM COMPÓSITO POLIMÉRICO COM RESÍDUO VÍTREO
VISANDO A INATIVAÇÃO DE PATÓGENOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia Civil da Universidade Federal de Uberlândia, como parte dos requisitos para a obtenção do título de **Mestre em Engenharia Civil**.

Orientador: Prof. Dr. João Fernando Dias

Co-Orientador: Prof. Dr. Geraldo Batista de Melo

Uberlândia, 05 de Outubro de 2016.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

C321v
2016

Carísio, Pedro de Almeida, 1990-

Verificação da capacidade fotodegradante de um compósito polimérico com resíduo vítreo visando à inativação de patógenos / Pedro de Almeida Carísio. - 2016.

135 f. : il.

Orientador: João Fernando Dias.

Coorientador: Geraldo Batista de Melo.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil.

Inclui bibliografia.

1. Engenharia civil - Teses. 2. Compósitos poliméricos - Teses. 3. Fotocatálise - Teses. 4. Infecção hospitalar - Teses. 5. Biofilme - Teses.
I. Dias, João Fernando. II. Melo, Geraldo Batista de, 1952-. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil. IV. Título.



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL - PPGEC

ATA Nº: 170/2016

CANDIDATO: Pedro de Almeida Carísio

Nº. Matrícula: 11412ECV012

ORIENTADOR: Prof. Dr. João Fernando Dias

TÍTULO: "Verificação da capacidade fotodegradante de um compósito polimérico com resíduo vítreo visando a inativação de patógenos".

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Estruturas e Construção Civil

LINHA DE PESQUISA: Construção Civil

PROJETO DE PESQUISA: Reciclagem e Sustentabilidade na Construção Civil

DATA DA DEFESA: 05 de outubro de 2016

LOCAL: Sala de Projeções Prof. Celso Franco de Gouvêa - bloco 1Y.

HORÁRIO INÍCIO/TÉRMINO: 14:00 / 16:15

Reuniu-se na **Sala de Reuniões Prof. Marcio Antônio Ribeiro da Silva, bloco 1Y - Campus Santa Mônica** da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do PPGEC, assim composta: Professores Doutores: **Prof. Dr. Antônio de Paulo Peruzzi – FECIV/UFU; Carlos Eduardo Marmorato Gomes – FEC/UNICAMP e João Fernando Dias** orientador do candidato. Ressalta-se que todos os membros da banca participaram da defesa in loco.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa **Prof. Dr. João Fernando Dias** apresentou a Comissão Examinadora e concedeu ao discente a palavra para a exposição do trabalho. A seguir, o senhor presidente concedeu a palavra aos examinadores, que passaram a arguir o candidato. Ultimada a arguição, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais. Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato APROVADO. Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos e foi lavrada a presente ata que após lida e aprovada foi assinada pela Banca Examinadora.

Professor Orientador: **Prof. Dr. João Fernando Dias – FECIV/UFU**

Membro externo: **Prof. Dr. Carlos Eduardo Marmorato Gomes – FEC/UNICAMP**

Membro interno: **Prof. Dr. Antônio de Paulo Peruzzi – FECIV/UFU**

Uberlândia, 05 de OUTUBRO de 2016.

“Portanto, quer comais quer bebais, ou façais, qualquer outra coisa,
fazei tudo para a glória de Deus” (1 Coríntios 10:31).

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação:

Aos meus pais Bruno e Lúcia, por toda dedicação e esforço em sempre querer fazer o melhor para mim. Que, apesar da distância e minha ausência, me colocam em suas orações e lembrança, sempre compreendendo e torcendo por mim. Se até aqui cheguei, foi em grande parte por todo apoio e incentivo deles.

A GRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus pois sei que se cheguei até aqui foi por ajuda dEle. Ele que me deu forças, saúde e capacidade para a realização deste trabalho. Sem Ele, nada sou.

Agradeço imensamente ao meu orientador, Professor João Fernando Dias, por toda paciência, dedicação e esforço em me orientar. Por todo o tempo dedicado em me incentivar em progredir na pesquisa. Sem dúvidas, toda a sua participação foi determinante para a conclusão deste trabalho.

Também agradeço ao meu co-orientador, Professor Geraldo Batista de Melo. Para mim foi um grande desafio aliar minha área de formação e com uma outra área. Não digo que foi fácil mas, com sua orientação, paciência e dedicação em me ensinar, se tornou menos difícil.

Sendo assim, sou muito grato, em especial, a esses dois professores que se dispuseram e depositaram sua confiança em mim.

Aos membros do grupo de pesquisa, Prof. Noélio Oliveira Dantas, Prof. Anielle Christine Almeida Silva e Prof. Luiz R. Goulart, que com todo o “*know-how*” e trabalho me ajudaram, com fornecimento de materiais e técnicas. Além de todo o incentivo.

Aos técnicos do laboratório de Materiais e Técnicas de Construção Civil, Cristiane Pires, Wanderly Geraldo da Silva e Avelino Gomes que, também dispuseram de tempo para ajuda em algumas situações das quais eu necessitei.

Aos técnicos do laboratório de Microbiologia, Claudete Freitas, Lícia Ludendorff Queiroz e Ricardo Oliveira França, por toda paciência em me ensinar como me portar no laboratório, manuseio dos equipamentos e emprego das técnicas microbiológicas, muito obrigado. Também estendo às professoras Lizandra Ferreira de Almeida e Borges, Helisângela de Almeida Silva, Karinne Spirandelli Carvalho Naves, Denise Von Dolinger de Brito e Rosineide Marques Ribas.

Ao Eng. MsC. José Anceloann Lago Grande Martins que quando solicitado, se tornou disponível e me passou boa parte de seus conhecimentos, mostrando o “caminho das pedras”.

Ao PPGEC e seu colegiado, que sempre me ouviram com atenção e disposição.

Aos amigos e companheiros do PPGEC, que juntos sofremos e nos regozijamos durante essa jornada, chorando, rindo e aprendendo.

Não poderia deixar de citar, à toda comunidade FECIV, os quais foram meus companheiros durante parte desta jornada.

Aos Laboratórios de Microscopia, como o Laboratório Multusuário de Microscopia (LMM) do Instituto de Química, o Laboratório Ensino Pesquisa e Usinagem (LEPU) da Faculdade de Engenharia Mecânica e, por fim o Laboratório de Pesquisa Multusuário do Instituto de Química. Também aos técnicos desses laboratórios como o Rafael (Engenharia Química), Magaiver (Química) e o Prof. Edson Nossol. Também agradeço ao Guilherme, técnico do laboratório de Física, que ajudou com a microscopia de força atômica.

Ao Pessoal da “MAZ”, que sempre com descontração me deram todo apoio, incentivo e oraram por mim. Se tornaram minha família em Uberlândia.

Minha toda a minha família, que sempre estão na torcida, me dando forças, além de confiança. É tão incrível como me apoiam, vendo um potencial do qual não vejo. São minha inspiração.

Encerro com o agradecimento à FAPEMIG, por todo o seu incentivo à pesquisa por meio de uma bolsa integral para a realização desta dissertação.

A todos vocês, o meu OBRIGADO!!!

Carísio, P. de A. Verificação da capacidade fotodegradante de um compósito polimérico com resíduo vítreo visando a inativação de patógenos. 135 p. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia Civil, Universidade Federal de Uberlândia, 2016.

RESUMO

Os principais meios de transmissão das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) ocorrem pelo contato direto com a equipe do hospital, instrumentos e superfícies contendo micro-organismos patogênicos, gotículas de aerossol de outros pacientes doentes ou até mesmo as refeições e líquidos fornecidos em hospitais. Nas superfícies onde não há o controle dos micro-organismos, podem surgir os biofilmes, os quais são formados quando micro-organismos se juntam e tornam-se uma comunidade, sendo conhecidos pela sua resistência a antimicrobianos e como um dos principais causadores das IRAS. Por meio da fotocatálise, esses micro-organismos podem ser neutralizados. A fotocatálise é um processo que acelera as reações de oxidação e redução de substâncias orgânicas, entre elas, as bactérias. Desse modo, por meio do preparo de um compósito polimérico com teores de TiO₂ e resíduo vítreo, a pesquisa busca determinar uma mistura, na tentativa de controle contra o surgimento de biofilmes. Os compósitos foram imersos em meios de cultura contendo bactérias de *Staphylococcus aureus* formadoras de biofilme, nas placas de cultura celular de 24 poços, os quais foram submetidos, em estufa, por um período de 48h sob iluminação UV e no escuro. Por meio da microscopia eletrônica de varredura, foram geradas imagens das superfícies dos compósitos, a fim de investigar se houve ou não a formação de biofilmes. Com a pesquisa, foram testados dois tipos de TiO₂ (com tamanhos de nanocristais diferentes) e três variações dos teores de mistura do compósito, formado por resina epóxi, TiO₂ e pó de vidro. O resultado obtido mostra que as composições testadas inibem, em parte, a ação do biofilme.

Palavras-chave: Compósito polimérico – Fotocatálise – TiO₂ – Resíduo de vidro - Biofilmes

Carísio, P. de A. Photodegradation capacity verification of a polymeric composite with glassy residue aiming the pathogens inactivation. 135 p. MSc Dissertation, College of Civil Engineering, Federal University of Uberlândia, 2016.

ABSTRACT

The main means of transmission of infections Related to Health Care (HAIs) occurs by direct contact with the hospital staff, instruments and surfaces containing pathogenic micro-organisms, aerosol droplets from other sick patients or even meals and liquids supplied in hospitals. In areas where there is no control of micro-organisms may arise biofilms, which are formed when microorganisms come together and become a community, they are known for their resistance to antimicrobials and as a major cause of HAIs. By means of photocatalysis, these micro-organisms can be neutralized. Photocatalysis is a process which accelerates the oxidation and reduction reactions of organic substances, among them bacteria. Thus, through the preparation of a polymeric composite with TiO₂ and glassy residue content, search attempts to determine a mixture, in an attempt to control the biofilm emergence. The composites were soaked in culture medium containing *Staphylococcus aureus* bacteria forming biofilms within cell culture plates in 24-well plates, which were subjected in an oven, for a period of 48h under UV illumination and in the dark. Through scanning electron microscopy were generated images of the surfaces of composite in order to investigate whether occurred or not the formation of biofilms. Through research, we tested two types of TiO₂ (nanocrystals with different sizes) and three variations of the composite content, composed of epoxy resin, TiO₂ and glass powder. The result shows that the tested compositions inhibit partly the action of the biofilm.

Keywords: Polymeric composites - Photocatalysis – TiO₂ – Glass waste - Biofilms

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Formação do Biofilme	33
Figura 2 – Estruturas dos biofilmes: a) Modelo de Mosaico Heterogêneo; b) Modelo em forma de Cogumelo	35
Figura 3 - As influências envolvidas na relação estrutura/atividade em biofilmes	35
Figura 4 - Desenvolvimento do biofilme. A atuação do <i>quorum-sensing</i>	38
Figura 5 - Resistência do Biofilme ao antibiótico	40
Figura 6 - Atividade metabólica em uma micro colônia de biofilmes	41
Figura 7 - Esquema de fotoativação do catalisador	44
Figura 8 - Diferenças entre os orbitais de compostos condutores, semicondutores e isolantes	45
Figura 9 - Ilustração esquemática do processo de fotodegradação da <i>E. coli</i> em um filme de TiO ₂ (de a-c).	47
Figura 10 - Igreja Dives in Misericordia	49
Figura 11 – Difratograma de Raios-X dos nanocristais de TiO ₂	59
Figura 12 – Curva granulométrica do Resíduo de vidro	61
Figura 13 - Fabricação da fôrma do molde.....	68
Figura 14 – Preparação dos moldes dos exemplares	68
Figura 15 - Exemplares dispostos em seus moldes no tempo de cura.....	70
Figura 16 - Divisão dos experimentos do ensaio microbiológico	72
Figura 17 - Tubos contendo caldo de TSB e 2% de sacarose.....	73
Figura 18 - Placas de TSA com colônias formadas.....	74
Figura 19 - Microplacas posicionadas na estufa.....	75
Figura 20 – Exemplares metalizados com ouro.....	76

Figura 21 – Imagens da superfície do exemplar da amostra REFERÊNCIA obtidas no Microscópio de Força Atômica 80

Figura 22 - Microscopia eletrônica de varredura do exemplar 3 da amostra de REFERÊNCIA da etapa 2 82

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Tamanho médio dos diâmetros dos TiO ₂	59
Quadro 2 – Características da mistura	60
Quadro 3 - Etapas do procedimento experimental	64
Quadro 4 - Nomenclatura utilizada para as amostras das etapas 1,2 e 3	65
Quadro 5 – Experimentos do ensaio microbiológico	66
Quadro 6 - Nomenclatura utilizada para as amostras da etapa 4	66
Quadro 7 – Etapa1: composição das amostras e quantidade de exemplares	79
Quadro 8 – Etapa 3: composição das amostras e quantidade de exemplares	83
Quadro 9 – Imagens da microscopia eletrônica de varredura do exemplar 3 contaminado com <i>Staphylococcus aureus</i> 25923 icaD+ (1º Ensaio)	85
Quadro 10 – Imagens da microscopia eletrônica de varredura do exemplar 1 contaminado com <i>Staphylococcus aureus</i> 25923 icaD+ (Duplicata)	86
Quadro 11 – Imagens da microscopia eletrônica de varredura do exemplar 3 contaminado com <i>Staphylococcus aureus</i> N 321 (1º Ensaio).....	87
Quadro 12 – Imagens da microscopia eletrônica de varredura do exemplar 1 contaminado com <i>Staphylococcus aureus</i> N 321 (Duplicata)	89
Quadro 13 – Imagens da microscopia eletrônica de varredura do exemplar 1 contaminado com <i>Staphylococcus aureus</i> 25923 icaD+ (1º Ensaio).....	90
Quadro 14 – Imagens da microscopia eletrônica de varredura do exemplar 3 contaminado com <i>Staphylococcus aureus</i> 25923 icaD+ (Duplicata)	92
Quadro 15 – Imagens da microscopia eletrônica de varredura do exemplar 3 contaminado com <i>Staphylococcus aureus</i> N 321 (1º Ensaio).....	93
Quadro 16 – Imagens da microscopia eletrônica de varredura do exemplar 1 contaminado com <i>Staphylococcus aureus</i> N 321 (Duplicata)	94
Quadro 17 – Etapa 4: composição das amostras e quantidade de exemplares	95

Quadro 18 – Imagens da microscopia eletrônica de varredura dos exemplares 3 contaminados com <i>Staphylococcus aureus</i> 25923 icaD+ (1º Ensaio).....	97
Quadro 19 – Imagens da microscopia eletrônica de varredura após ensaio microbiológico do exemplar 3 contaminado com <i>Staphylococcus aureus</i> 25923 icaD+ (Duplicata)	98
Quadro 20 – Imagens da microscopia eletrônica de varredura após ensaio microbiológico do exemplar 3 contaminado com <i>Staphylococcus aureus</i> 25923 icaD+ (Triplicata)	99

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	16
INTRODUÇÃO	16
1.1 Objetivos	23
1.1.1 Objetivo Geral	23
1.1.2 Objetivo Específico	24
1.2 Justificativa	24
CAPÍTULO 2	29
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
2.1 Biofilme	29
2.1.1 Formação de Biofilme	30
2.1.2 Estrutura e Composição dos Biofilmes	34
2.1.3 Propriedades do Biofilme	36
2.1.4 Mecanismos de Resistência do Biofilme	39
2.2 Fotocatálise	42
2.2.1 Fotocatálise Heterogênea	43
2.2.2 Fatores que Influenciam no Desempenho da Fotocatálise	48
2.2.3 Aplicações	49
2.3 Dióxido de Titânio (TiO ₂)	51
2.4 Pó de Vidro	53
2.5 Resina Epóxi	55
CAPÍTULO 3	58
MATERIAIS E MÉTODOS	58
3.1 Materiais	58

3.1.1	Dióxido de Titânio (TiO_2)	58
3.1.2	Resina Epóxi.....	59
3.1.3	Pó de Vidro.....	61
3.1.4	Meios de Cultura	61
3.1.5	Cepas de micro-organismos	62
3.2	Procedimento Experimental.....	62
3.2.1	Fabricação dos Exemplares (pastilhas).....	64
3.2.2	Ensaios Microbiológicos	71
3.2.3	Avaliação da Formação de Biofilmes.....	76
	CAPÍTULO 4	78
	RESULTADOS E ANÁLISES	78
4.1	Etapa 1	78
4.2	Etapa 2	81
4.3	Etapa 3	83
4.3.1	Experimento 1 - Contaminação por <i>Staphylococcus aureus</i> 25923 icaD+ - Exposição à Iluminação UV	84
4.3.2	Experimento 2 - Contaminação por <i>Staphylococcus aureus</i> N 321 - Exposição à Iluminação UV	87
4.3.3	Experimento 3 - Contaminação por <i>Staphylococcus aureus</i> 25923 icaD+ - Exposição ao Escuro.....	90
4.3.4	Experimento 4 - Contaminação por <i>Staphylococcus aureus</i> N 321 - Exposição ao Escuro.....	92
4.4	Etapa 4	95
4.5	Análise dos Resultados	99
	CAPÍTULO 5	102
	CONCLUSÃO	102
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104

APÊNDICE A	117
A.1 Etapa 3	117
A.1.1 1º Ensaio - Exposição à Iluminação UV.....	117
A.1.2 1º Ensaio – Exposição ao Escuro	120
A.1.3 Duplicata – Exposição à Iluminação UV	123
A.1.4 Duplicata – Exposição ao Escuro	126
A.2 Etapa 4	130
A.2.1 1º Ensaio - Exposição à Iluminação UV.....	130
A.2.2 Duplicata - Exposição à Iluminação UV	132
A.2.3 Triplicata - Exposição à Iluminação UV	133

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

As Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) são grandes problemas mundiais. De acordo com a Lei Federal nº 9 431/97, Brasil (1997), entende-se como essas infecções, que também pode ser denominada como hospitalar, institucional ou nosocomial, a aquisição de qualquer infecção após a internação de um paciente em hospital, que venha a se manifestar, durante ou mesmo após o período de internação, sendo possível sua relação com a hospitalização (internação ou procedimentos hospitalares).

As infecções decorrentes dos cuidados à saúde, nos dias de hoje, se mostram como um dos principais determinantes no aumento da morbidade, mortalidade, nos custos diretos e indiretos associados à assistência à saúde e do prolongamento do tempo de internação do paciente, ganhando a forma de um grande problema social e econômico significativo, tanto para os pacientes, quanto para o sistema de saúde (FIGUEIREDO, 2012).

Em Khan, Ahmad e Mehboob (2015) é dito que as IRAS são causadas por vários micro-organismos e relacionam-se também com o tamanho e a complexidade da unidade de serviço. Os autores afirmam que as bactérias são responsáveis por volta de 90% das infecções, restando 10% para protozoários, fungos e vírus.

As IRAS atingem várias partes do mundo e, o grande problema é que também representa uma das causas de mortes em pacientes hospitalizados. Enquanto os Estados Unidos e a

Europa apresentam uma taxa de mortalidade, causadas por infecção, de 10%, o Brasil apresenta uma taxa de 15%, de acordo com Levy (2004).

Estimativa feita por Klevens *et al.* (2007) considerou que o número de mortes associadas com infecções nosocomiais nos hospitais dos Estados Unidos da América (EUA), no ano de 2002, foram por volta de 99 mil, sendo: 35.967 por pneumonia; 30.665 por infecções na corrente sanguínea; 13.088 por infecções do trato urinário; 8.205 por locais cirúrgicos; e 11.062 para infecções de outros lugares. Esses valores foram considerados para o caso de 1.700.000 pacientes que tiveram infecções hospitalares, representando um total de mortalidade de quase 6%.

No Brasil, a situação é mais desfavorável. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através de seu panorama do controle da infecção hospitalar no Brasil (200-?), apresenta valores de taxas de infecções hospitalares reportadas, como também, os óbitos ocorridos por IRAS. No caso dos óbitos, a taxa, foi de 14,35% dos pacientes que adquiriram as infecções.

Isto evidencia sérios problemas relacionados aos cuidados à saúde em todo mundo, como aumento no número de internações, aumento dos dias de internações, estrangulando a oferta de leitos hospitalares, gerando maiores custos. Entretanto, o fator mais importante e assustador que traz preocupação, é a possibilidade da letalidade.

Para que se evitem tais situações, torna-se importante conhecer os meios que geram as condições que favorecem estas infecções. Como principais fatores que influenciam a aquisição das mesmas, de acordo com Barros e Menezes (2012), são: o status imunológico; a idade (recém-nascidos e idosos tem vulnerabilidades maiores); o uso abusivo de antimicrobiano; os procedimentos médicos, principalmente os invasivos; e as falhas nos procedimentos de controle de infecção.

Segundo o *Environmental & Public Health Consultants* (EHA) (2015), essas infecções podem ser adquiridas no hospital, lar de idosos, centros de reabilitação, bem como instalações de cuidados prolongados. Pacientes com imunidade comprometida, idosos e crianças pequenas são geralmente mais suscetíveis do que as outras. Os meios de transmissão das mesmas se dá pelo contato direto com a equipe do hospital, instrumentos e superfícies inadequadamente processados visando o controle de micro-organismos (na esterilização, desinfecção, sanitização, etc.), gotículas de aerossol de outros pacientes doentes ou até mesmo as refeições e líquidos fornecidos em hospitais.

De acordo com Breathnach (2013), os fatores de risco para a aquisição dessas infecções são por meio de doenças de base, indivíduos restritos ao leito, solução de continuidade com ruptura das barreiras (pele e mucosas), o uso recente de antimicrobianos, alteração da microbiota do indivíduo, procedimentos invasivos, incisões cirúrgicas, instalação de próteses, terapias imunossupressoras, e o estado de colonizado por micro-organismos potencialmente patogênicos.

Os agentes mais envolvidos nessas infecções incluem: *Streptococcus* spp., *Acinetobacter* spp., *Enterococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus* coagulase-negativo, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Legionella* e família Enterobacteriaceae, incluindo os membros *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumonia*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*. Dentre esses, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli*, *Acinetobacter* spp. e *Enterococcus* spp. tem maior ocorrência (KHAN, AHMAD & MEHBOOB, 2015).

O Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (CDC), por meio de Horan *et al* (1984), identifica os patógenos mais comuns que causam as infecções nosocomiais, como sendo: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Escherichia coli*. As principais infecções que ocorrem são: as do trato urinário, pulmonares, sítios cirúrgicos, corrente sanguínea, trato gastrointestinal e de pele. Levy (2004) também cita os sítios de maior incidência atingidos pelas infecções sendo o trato urinário, sítios cirúrgicos e o trato respiratório.

Medidas visando a contenção e controle de micro-organismos iniciam-se com a desinfecção do instrumental contaminado, uma boa lavagem, secagem e empacotamento para esterilização e uma adequada estocagem. Com relação ao ambiente, a utilização adequada de desinfetantes e sanitizantes se dá para a remoção das sujidades e diminuir a carga microbiana.

Assim, são realizados dois tipos de limpeza: a concorrente e a terminal. A finalidade primordial de ambas, é impedir a disseminação de micro-organismos que colonizam as superfícies. Desse modo, no processo de limpeza de unidades de saúde, tem sido recomendada a utilização de produtos químicos com ação germicida, eficazes para a remoção e destruição de micro-organismos existentes na superfície. A utilização de substâncias germicidas tem levado à mudança na terminologia, alterando de “limpeza” para “desinfecção” (ANDRADE, ANGERAMI & PADOVANI, 2000).

Contudo, o uso indiscriminado de germicidas tem um grande impacto, exercendo uma força opressora, selecionando os micro-organismos resistentes. E a presença de micro-organismos resistentes a antissépticos e desinfetantes podem ser resultado do uso incorreto desses produtos no ambiente hospitalar, como citam alguns autores, tais como, Reis *et al* (2011) e Mota, Turrini & Proveda (2015).

Além das bactérias desenvolverem resistência aos antimicrobianos (desinfetantes) em geral, por vários mecanismos, muitas conseguem a formação de biofilmes, o que dificulta a sua remoção do ambiente. A penetração de antimicrobianos no interior desses biofilmes é dificultada pelo ambiente de proteção criado pelas bactérias ali existentes, além disso, o baixo metabolismo das bactérias, nas camadas mais internas, impede a ação dos produtos desinfetantes.

Enfatiza-se então que, a presença de bactérias em ambientes de serviço de saúde acarreta grandes problemas no tratamento de pacientes e, com isso, um aumento da preocupação no que tange a desinfecção desses locais. Caso contrário, fatores como: aplicação incorreta de bactericidas; produtos desinfetantes inadequados; falta de periodicidade na limpeza; falta

de técnica para desinfecção, etc., podem gerar condições propícias para a instalação de bactérias. As dificuldades são ainda maiores, quando se tem a formação de biofilmes.

Biofilmes são formados quando micro-organismos se juntam para formar uma comunidade que adere em uma superfície sólida e se envolve em uma matriz exopolissacarídea (EPS). Vários passos estão envolvidos na formação dos biofilmes, incluindo o transporte de micro-organismos para a superfície, adesão inicial, a formação das micro colônias, a maturação do biofilme e o destacamento das células dos biofilmes. O conhecimento desses processos ajuda a entender o mecanismo de resistência do biofilme, de forma que se consiga criar estratégias para o controle do seu desenvolvimento (MELO, 2013).

De acordo com Donlan e Costerton (2002), a definição de um biofilme se dá pela derivação de uma comunidade microbiana séssil, caracterizada por células que estão fortemente aderidas a um substrato ou uma interface ou umas às outras, incorporadas numa matriz de substâncias poliméricas extracelulares produzidas por elas mesmas, exibindo um fenótipo alterado a respeito da taxa de crescimento e da transcrição de genes.

Existe preocupação em relação aos biofilmes, pois estes motivam a maioria das infecções no mundo, fato que provocou uma renovação no interesse pelos mecanismos resistentes envolvidos. Esses micro-organismos vão adquirindo características funcionais e funções complexas, resistência a vários grupos de antimicrobianos, chegando a serem chamados pela imprensa leiga de superbactérias (ARCE, AUAD & CABEZAS, 2013).

Martins (2013) apresenta uma lista dos principais produtos utilizados na desinfecção em ambientes de serviços de saúde, afirmando que esses produtos são necessários para evitar a proliferação de micro-organismos, todavia, o uso dessas substâncias, geram efeitos secundários indesejados e perigosos nos aplicadores, tais como: o ressecamento da pele, irritação dos olhos e mucosas e, além da proibição da utilização de compósitos fenólicos em berçários e áreas de contato com alimentos, mediante à sua toxicidade.

Reis *et al* (2011) alertam sobre o uso de biocidas com concentrações inferiores às estabelecidas, que podem levar a resultados insatisfatórios em relação a alguns micro-organismos. Entretanto, o uso abusivo dos mesmos, podem resultar em sérias intoxicações a pacientes e funcionários. O aumento da concentração desses também pode potencializar a ação corrosiva em objetos metálicos e mármore.

Por isso, pesquisas e desenvolvimento de materiais antimicrobianos de base não farmacológica, que eliminem ou ao menos diminuam o uso de produtos químicos agressivos ao ser humano e a natureza, são uma grande contribuição social e ambiental (MARTINS, 2013).

Desse modo, alguns pesquisadores têm se dedicado para criar medidas restritivas ao desenvolvimento microbiano. A fotodegradação ou fotocatálise tem sido promissora para essa finalidade.

A Fotocatálise faz parte dos Processos Oxidativos Acelerados (POA). Segundo Irie e Hashimoto (2005), ao processo eletroquímico que é capaz de acelerar as reações de oxidação de substâncias orgânicas pela incidência de energia, se dá o nome de fotocatálise.

Os POA se dividem em dois tipos de sistemas: os homogêneos e os heterogêneos. De acordo com Nogueira e Jardim (1997), os sistemas homogêneos utilizam-se de ozônio, peróxido de hidrogênio, decomposição catalítica de peróxido de hidrogênio em meio ácido (reação de Fenton ou foto-Fenton); obtém-se a dita fotocatálise heterogênea, com a utilização de semicondutores, como o dióxido de titânio.

Para Simonsen *et al* (2009), a fotocatálise heterogênea é um dos processos avançados de oxidação que se atinge por meio da combinação entre a luz ultravioleta de baixa energia com semicondutores atuando como fotocatalisadores. Mediante a este processo se consegue completamente a mineralização dos poluentes orgânicos alcançando desde o dióxido de carbono até os ácidos minerais.

De acordo com Ziolli e Jardim (1998), classificam-se os POA como um processo que se baseia na irradiação de um catalisador, se tratando de um semicondutor inorgânico (dióxido de titânio - TiO₂, óxido de zinco - ZnO, ou sulfeto de cádmio - CdS), que desencadeia uma excitação, ou melhor dizendo, uma transição eletrônica, por meio de uma energia de um fóton que deve ser maior ou igual a energia do “*band gap*”. Tem-se por transição eletrônica, a promoção de um elétron da banda de valência para a banda de condução, onde se formam sítios oxidantes e redutores que atuam na catalisação das reações químicas, oxidando os compostos orgânicos em CO₂ e H₂O e a redução de metais dissolvidos ou outras espécies.

Encontra-se como uma das principais vantagens da fotocatálise heterogênea, a possibilidade da utilização da luz solar como fonte de ativação do semicondutor, sendo o dióxido de titânio (TiO₂) um dos mais utilizados e eficientes (NOGUEIRA & JARDIM, 1997).

De acordo com Breitbach (2011), o TiO₂ na forma anatase nanométrica, apresenta uma fotocatálise quando exposto à radiação UVA e por isso, tem sido estudado de forma a incorporar propriedades aos materiais de construção. As novas propriedades contribuem para melhorar a qualidade do ar em seu entorno, oxidando nitratos, CO₂ e vários poluentes orgânicos, e também trabalha de modo a preservar as superfícies livres de biodeterioração, podendo então, proporcionar maior durabilidade aos revestimentos de fachada.

Martins (2013) estudou a capacidade de um compósito contendo TiO₂ e resíduo vidro, em degradar bactérias *Staphylococcus aureus*, por fotocatálise, indicando a condição e o tempo de exposição mais eficiente. O compósito contaminado com as bactérias ficaram expostos à luz solar direta e indireta, além da exposição a uma lâmpada fluorescente.

Diante desse panorama apresentado, este estudo representa uma continuidade das pesquisas realizadas por Martins (2013), com o interesse geral de investigar a capacidade

de compósitos poliméricos com incorporação de TiO e resíduos de vidro, em impedir o surgimento de biofilmes, com vistas ao seu emprego em superfícies de ambientes da área da saúde.

Em relação à pesquisa de Martins (2013), para este trabalho diferentes teores de mistura para os compósitos foram adotados, partindo do teor que apresentou melhor desempenho em Martins (2013) (10% de TiO₂ e 10% de pó de vidro).

No trabalho de Martins (2013), as iluminações utilizadas foram a luz natural e artificial, entretanto, desconsiderando a artificial Ultravioleta, que foi a única considerada para este trabalho.

Nesta pesquisa, foram consideradas bactérias multirresistentes, com capacidade de formar biofilmes. As condições do teste contavam com um ambiente de favorecimento ao crescimento dos biofilmes. Já Martins (2013) fez o estudo com bactérias em estado planctônico.

Esta pesquisa se reveste de um caráter de multidisciplinaridade, com o envolvimento de unidades acadêmicas em distintas áreas do conhecimento, com a expectativa de se produzir um avanço científico.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral da pesquisa foi estudar o desempenho de formulações de um compósito polimérico, contento dióxido de titânio (TiO₂) e um resíduo de vidro, com a finalidade de inibir a formação de biofilmes, por meio da fotodegradação.

1.1.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Objetivou-se verificar qualitativamente a atuação de compósitos de TiO₂ (de dois tamanhos diferentes de nanocristais, a 10% em massa) e resíduo de vidro, em teores em massa de 8%, 10% e 12 %, em impedir a formação de biofilmes de *Staphylococcus aureus*, em um ambiente de completo favorecimento à formação dos mesmos, por meio da fotocatálise, quando submetidos à exposição à luz ultravioleta (UV).

1.2 JUSTIFICATIVA

Uma das propriedades de algumas bactérias é a formação de biofilme, a qual funciona como uma estratégia de sobrevivência, para as mais diversas condições ambientais desfavoráveis. As bactérias em biofilmes apresentam características de crescimento e de genes diferentes de quando em meios com substâncias nutritivas.

De acordo com Cabarkapa, Levic e Djuragic (2013), mediante a essas diferenças, os biofilmes mostram um aumento na resistência a antibióticos e agentes desinfetantes, sendo quase impossível tratar as infecções causadas pelos biofilmes com bactericidas convencionais, não sendo possível o controle em hospitais e locais de produção de comidas, onde o uso de desinfetantes em concentrações elevadas não é recomendado.

Conforme se descreve em Boyce (2007), alguns organismos como *Staphylococcus aureus* Resistentes à Meticilina (MRSA) e o *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE) são capazes de sobreviver por dias, semanas ou até meses em superfícies de ambientes de saúde. Também se percebe que a superfícies desses ambientes tem uma influência na transmissão dos agentes patógenos, tendo em vista que, a limpeza e/ou desinfecção do ambiente pode reduzir a incidência de infecções associadas aos cuidados hospitalares.

Em McFee (2009) é dito que a falha na apropriada maneira de se higienizar as mãos, lidera uma das principais causas de infecções associadas aos cuidados da saúde e de disseminação dos organismos multirresistentes e contribuem para surtos de contaminação. Higiene precária das mãos, é responsável por 40% das infecções transmitidas em hospitais de acordo com Inwerekbu (2005), onde as pesquisas têm mostrado que melhorias nas conformidades com a limpeza das mãos, reduzem as infecções nosocomiais.

Tem-se que as mãos são apenas o meio de transporte das bactérias. De acordo com Boyce e Pittet (2002), a transmissão dos patógenos acontece via mão, por meio dos seguintes acontecimentos: organismos presentes na pele do paciente, ou que tenha sido transferido para objetos inanimados próximos ao paciente, são transferidos para as mãos dos trabalhadores do serviço de saúde; esses organismos tem a capacidade de sobreviver por pelo menos alguns minutos nas mãos da pessoa; na sequência, a limpeza das mãos do trabalhador vai ser inadequada ou ignorada por completo; e, finalmente, a mão contaminada do agente de saúde vai diretamente em contato com outro paciente, ou um objeto que terá contato direto com o outro paciente.

O risco de transmissão direta de infecção pelas superfícies é mínimo, mas as mesmas podem contribuir para a contaminação cruzada secundária, por meio do contato das mãos dos profissionais de saúde e de instrumentos ou produtos que poderão ser contaminados ao entrar em contato com essas superfícies e posteriormente, contaminar os pacientes ou outras superfícies (ANSI/AAMI, 2006).

Um estudo conduzido por Andrade, Angerami e Padovani (2000), avaliou a efetividade do procedimento de limpeza em função da alteração da carga microbiana. Os resultados obtidos, indicaram que a limpeza, da forma como tem sido conduzida, apenas provoca o deslocamento da carga microbiana para outros pontos ao invés de diminuí-la, resultando na manutenção da quantidade de micro-organismos que existia anteriormente à limpeza.

A saber, a mão entra em contato com as mais variadas superfícies existentes, desde o contato com os pacientes, ao contato com equipamentos e estrutura física dos ambientes

dos serviços de saúde. Por isso deve se ter o controle tanto da higienização das mãos, quanto ao resto das superfícies onde possivelmente haverá um contato, seja com o paciente, ou até mesmo com os prestadores de serviço dos hospitais.

No manual de limpeza e desinfecção de superfícies da Anvisa (BRASIL, 2010) é dito que a higienização das mãos dos profissionais de saúde e limpeza e a desinfecção de superfícies são fundamentais para a prevenção e redução das infecções relacionadas à assistência à saúde.

Desse modo, o desenvolvimento de novas técnicas para o revestimento de superfícies em ambientes de serviços de saúde, onde se propõe a diminuição ou até eliminação de locais propícios para a instalação de bactérias, se mostram necessários a fim de ser mais um meio de controle e prevenção do surgimento de bactérias.

Um levantamento feito por Carvalho (2005), nas enfermarias do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, constatou uma contaminação por *Staphylococcus aureus* em 50% das mesmas, nas grades das camas, mesas de cabeceira, maçanetas das portas e nos pisos. O piso apresentou, de modo quantitativo, cinco vezes mais contaminação em relação as outras superfícies.

A escolha do *Staphylococcus aureus* como a bactéria de teste, se dá por meio da certeza de que a mesma é formadora de biofilmes. E também, conforme McFee (2009), não existe discussão de infecções hospitalares, sem mencionar a *Staphylococcus aureus*, e especialmente a *staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), *enterococcus* resistente à vancomicina, e a *cloristidium difficile*.

Entre as infecções hospitalares mais frequentes mundialmente, encontram-se aquelas causadas por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA). Esses mesmos micro-organismos são responsáveis por mais da metade das estafilococcias hospitalares conforme é visto em Melo *et al.* (2009). De acordo com Sadoyama e Gontijo Filho (2000), as

infecções por MRSA são endêmicas, representando aproximadamente 50% das estafilococcias hospitalares no HC-UFG.

Como foi visto anteriormente, as superfícies também se caracterizam como um importante meio de proliferação de bactérias e, sendo de um modo indireto, responsável pela causa das infecções relacionadas aos cuidados à saúde. Por isso, para o presente trabalho, propõe-se a realização de experimentos que venham a representar uma superfície contaminada por uma bactéria.

Entretanto, como alvo da pesquisa, tem-se a avaliação do desempenho de um compósito polimérico, o qual é constituído de resina epóxi, dióxido de titânio e um resíduo de vidro, na capacidade de impedir a formação de micro-organismos multirresistentes, utilizado a cepa de *Staphylococcus aureus*.

Ao longo dos anos, a importância clínica dessa bactéria tem crescido devido ao aumento na ocorrência de infecções hospitalares graves causadas por cepas multirresistentes (Maclean *et al*, 2006). De acordo com Melo (2014), as infecções causadas por *S. aureus*, resistentes a antibiótico, atingiram proporções epidêmicas globais. A carga global da doença estafilocócica, especialmente doenças causadas por MRSA, está aumentando em muitos países.

A pesquisa de Martins (2013) indicou que o uso desse tipo de compósito pode ter desempenho favorável no combate a micro-organismos infecciosos e, desse modo, essa pesquisa visa aprofundar a investigação do desempenho do compósito variando os percentuais de mistura. Também será verificado como o compósito se comporta sob uma iluminação UV, em relação à formação de biofilmes.

Este trabalho é constituído de cinco capítulos, organizados da seguinte maneira:

- Capítulo 1 - Introdução: apresenta uma breve introdução sobre as infecções hospitalares, contextualizando o problema; os objetivos gerais e específicos; e, por fim, a justificativa da pesquisa.
- Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica: descreve todos os fenômenos e conceitos envolvidos na pesquisa, como a formação do biofilme, a fotocatálise, e como os materiais utilizados contribuem para melhorias do fenômeno da fotocatálise.
- Capítulo 3 – Materiais e Métodos: neste capítulo se descrevem os materiais utilizados e a metodologia de pesquisa.
- Capítulo 4 – Resultados e Análises: aqui são apresentados os resultados e discutidos, por meio de análises qualitativas.
- Capítulo 5 – Conclusão: como último capítulo, apresenta a conclusão da pesquisa.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Esse capítulo tem como intuito abordar os principais assuntos que influenciam no desenvolvimento da pesquisa, dando fundamentação à mesma. Desse modo, a revisão da literatura foi dividida em cinco tópicos: Biofilme, Fotocatálise, Dióxido de Titânio, Pó de vidro e a Resina Epóxi.

2.1 BIOFILME

Pesquisadores reconhecem que nos ambientes naturais, a bactéria não existe como uma célula isolada, mas crescem e sobrevivem em comunidades organizadas, conhecidas como biofilmes (JENKINSON & LAPPIN-SCOTT, 2001).

Com a produção e uso em massa da penicilina, nos anos 40, observou-se o surgimento de bactérias resistentes, pela produção de bacte-lactamases, bem evidenciada sobre os *Staphylococcus aureus* no decorrer dos anos 50. Na década de 1960, mediante o desenvolvimento de penicilinas semissintéticas, como a meticilina e a oxacilina, verificou-se por outros mecanismos de resistência, como a alteração no sítio ativo das PBP's (Proteínas Ligadoras de Penicilina, do inglês Penicillin Binding Proteins) nos *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA, do inglês methicillin-resistant *S. aureus*). Isso tudo potencializado, nas comunidades em biofilmes (MELO, 2014).

Os biofilmes desenvolvem-se quando os micro-organismos colonizam uma superfície e formam múltiplas camadas. Nos ambientes, o biofilme pode ser encontrado em quase todas as superfícies que oferecem condições ambientais: umidade, pH, atmosfera adequada à bactéria e nutrientes; necessárias para o desenvolvimento microbiano (KIM & FRANK, 1995).

Em Donlan e Costerton (2002) é dito que se deve considerar como uma definição de biofilme, não apenas prontamente as características observáveis, células aderidas irreversivelmente a superfícies ou interfaces, embebidas em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares nas quais essas células produziram e, incluindo os componentes abióticos, mas também outros atributos fisiológicos desses organismos, incluindo muitas características como taxa de crescimento alterada, metabolismo basal e o fato que, os micro-organismos em biofilmes transcrevem genes, que quando no estado planctônico não são necessários.

Basicamente, conforme se encontra em Pasternak (2009), as bactérias assumem dois estados na natureza: o planctônico e o biofilme. O planctônico ocorre quando as mesmas se encontram isoladamente. Já em biofilme, inicialmente se aderem a um substrato (próteses, paredes de vasos, cateteres, dentre outras mais variadas superfícies), onde, posteriormente, produzem uma matriz (denominada glicocálice), formando as microcolônias, podendo ser monobacteriano (homotípico) ou polibacteriano (heterotípico).

2.1.1 FORMAÇÃO DE BIOFILME

A formação dos biofilmes é um resultado de vários processos de natureza físico-química, biológica e ambiental. Segundo Jenkinson e Lappin-Scott (2001) o funcionamento de um biofilme funciona basicamente como um ciclo, assim como será retratado no presente trabalho, e que Mclandsborough *et al* (2006), descrevem em vários passos na formação do biofilme bacteriano, como: 1^a etapa - transporte e adesão inicial (reversível); 2^a etapa - adesão do substrato (irreversível); 3^a etapa - maturação e acumulação; 4^a etapa - a

formação da micro colônia (pela adesão célula-célula), levando a biofilmes maduros consistindo de células e envolvidas por uma matriz polimérica extracelular; e por fim, 5^a etapa - o processo de dispersão.

Os vários estágios do crescimento são determinados pelas variáveis físico-químicas, biológicas e fatores ambientais, como está indicado na parte superior da Figura 1. A adesão inicial a uma superfície é um evento aleatório influenciado pela energia de superfície livre e proximidade das células bacterianas.

Segundo Monds e O'toole (2009), inicialmente uma bactéria adere a uma superfície aleatória, chegando também nutrientes e condições ambientais para o desenvolvimento microbiano, formando um nicho na superfície, propício a receber mais micro-organismos, promovendo o crescimento do biofilme. Com a adesão inicial, a bactéria estabelece uma ligação estreita com a superfície e, conexões que permitem o crescimento e a maturação do biofilme. Essa fase da formação do biofilme, ainda pode ser impactada pela atividade de algumas substâncias antibacterianas (RENDUELES & GHIGO, 2012).

A partir desse momento, começa-se a segunda etapa da formação do biofilme, na qual, de acordo com Melo (2014), os micro-organismos se aderem irreversivelmente às superfícies, bem como começam a secretar as substâncias poliméricas extracelulares (EPS, do inglês *Extracellular Polymeric Substances*). O EPS representa a “a casa das células do biofilme” e determina as condições imediatas de vida das células do biofilme, embebido neste microambiente, que afeta a porosidade, densidade, teor de água, carga, propriedades de sorção, hidrofobicidade, e a estabilidade mecânica (FLEMMING, NEU & WOZNIAK, 2007).

Com as bactérias já aderidas à superfície, as mesmas passam pela divisão de suas células, aumentando em número e evidenciando a fase de colonização da superfície, produzindo assim o chamado “*linking film*” que fornece um aumento nas propriedades de aderência e acumulação das células, transformando em uma comunidade clímax (Sequência ilustrada na Figura 1).

Durante a terceira etapa, ocorre o processo de maturação, na qual se percebe um aumento da produção da matriz polimérica ao redor das micro colônias. A quantidade de material extracelular aumenta de acordo com o tempo de incubação, até que as comunidades bacterianas são completamente envolvidas no interior do material, devido a continuada secreção de EPS (TARASZKIEWICZ *et al.*, 2013).

No quarto estágio, as proporções entre células e EPS são alteradas por produzir mais polímeros, o que favorece o crescimento do biofilme, recebendo sempre em sua superfície novos micro-organismos e novas camadas de EPS, ocasionando o crescimento vertical e alterando o metabolismo nas primeiras micro colônias formadas por escassez de nutrientes e aeração.

Com o crescimento estrutural do biofilme, ele fica sujeito a esforços de cisalhamento, chegando ao ponto de observarmos no interior de um biofilme maduro, diferenças metabólicas em suas diversas camadas estratificadas, onde as células devem se adaptarem nestas constantes mudanças ambientais, garantindo a heterogeneidade do mesmo (MONDS & O'TOOLE, 2009).

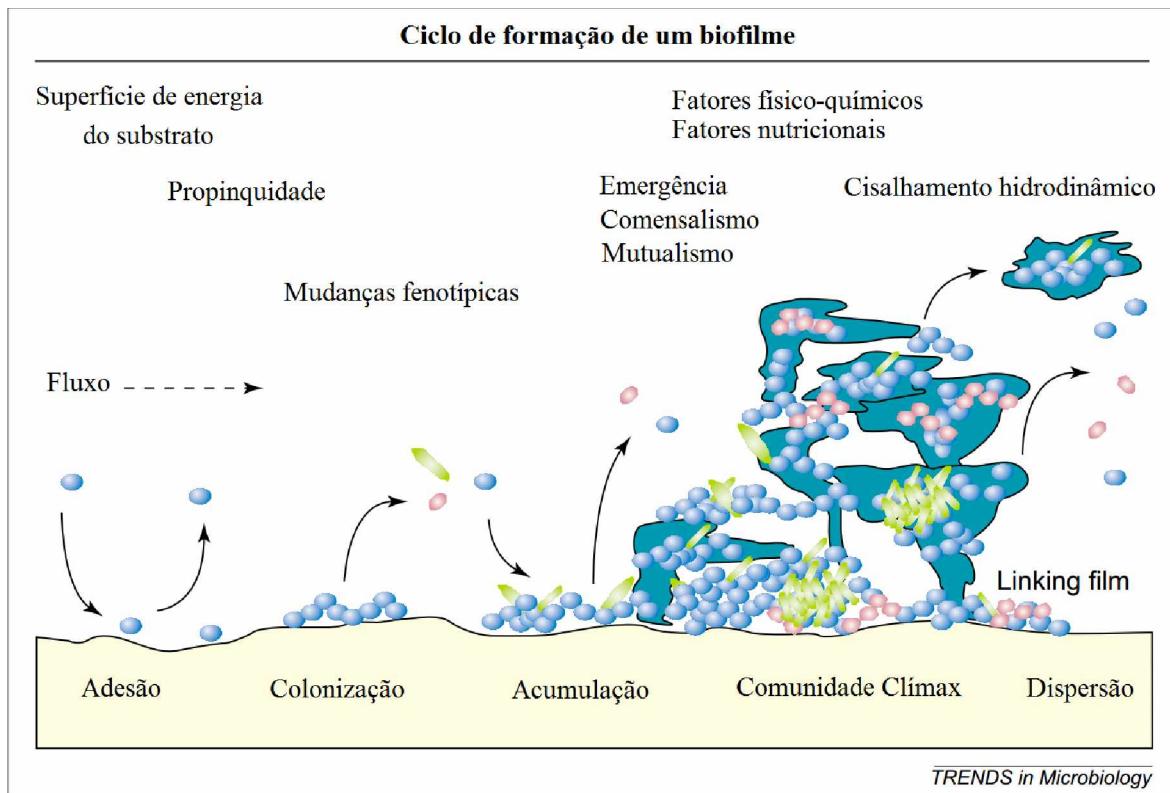
No biofilme maduro observa-se a ocorrência do processo de dispersão de fragmentos do mesmo, o que contribui para espalhamento e disseminação dos micro-organismos no ambiente, agora voltando a sua forma planctônica, sujeito à ação de antimicrobianos e às intempéries ambientais. Essa etapa, pode ser feita de duas maneiras: por fenômenos de erosão superficial ou por descolamento (“*sloughing off*”) (MELO, 2014).

Além da dispersão passiva, provocada por tensões de cisalhamento, as bactérias têm desenvolvido formas de perceber mudanças ambientais e avaliar se ele ainda é benéfico para residir dentro do biofilme, ou se é hora de retomar um estilo de vida planctônico. A dispersão do biofilme pode ser o resultado de vários estímulos, tais como alterações na

disponibilidade de nutrientes e oxigênio, aumento de produtos tóxicos, ou outras condições prejudiciais aos mesmos (KOSTAKIOTI, HADJIFRANGISKOU & HULTGREN, 2013).

O biofilme é uma entidade dinâmica na qual as células bacterianas entram ou deixam a comunidade continuamente, promovendo diversificação e dispersão, onde as forças de cisalhamento nos sistemas de fluxo levam a remodelação da estrutura do biofilme (JENKINSON & LAPPIN-SCOTT, 2001). A Figura 1 esquematiza o processo de formação.

Figura 1 - Formação do Biofilme



Fonte: Adaptado de Jenkinson e Lappin-Scott (2001)

Xavier *et al* (2003) enfatiza que o resultado dos processos sequenciais de formação, logo após a adesão inicial das células microbianas na superfície, é que definem tanto a estrutura como a atividade do biofilme. Esses processos incluem fatores físicos, químicos,

biológicos (crescimento, divisão celular e, produção e excreção de EPS) e ambientais, envolvidos no desenvolvimento dos biofilmes.

2.1.2 ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO DOS BIOFILMES

Os biofilmes constituem-se de micro-organismos, material polimérico extracelular e resíduos do ambiente colonizado, aderidos a uma superfície sólida, formando uma estrutura porosa e altamente hidratada, contendo pequenos canais abertos que agem como um sistema circulatório primitivo para a distribuição de nutrientes e a remoção de resíduos metabólicos por entre as micro colônias (*MENOITA et al 2012*).

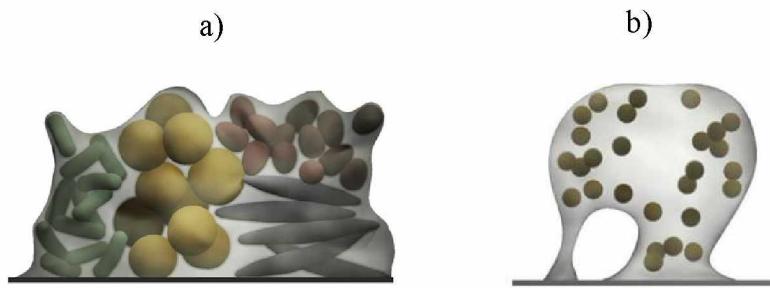
Na maioria dos biofilmes, a quantidade de micro-organismos representa menos de 10% da massa seca, enquanto que a matriz mais de 90%. A matriz é o material extracelular, principalmente produzida pelos próprios micro-organismos, em que as células dos biofilmes estão imersas. Consiste em um conglomerado de diferentes tipos de biopolímeros (EPS), que formam um suporte para a arquitetura do biofilme e é responsável pela adesão a superfícies e sua coesão (*FLEMMING & WINGENDER, 2010*).

Inicialmente acreditou-se muito que os biofilmes eram representados por uma simples estrutura plana, com espessura constante. Após investigações, foi possível observar que existem no mínimo três estruturas diferentes de biofilme.

A primeira delas é a plana. A segunda, denominada por “modelo de mosaico heterogêneo”, foi descoberta por meio da microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC). O terceiro tipo, é o modelo representado por um cogumelo ou tulipa, com estrutura porosa e canais capilares de água, onde ocorre a distribuição de nutrientes, água e dispersão de metabólitos (*MENOITA et al, 2012*).

As estruturas dos biofilmes citadas estão ilustradas na (Figura 2).

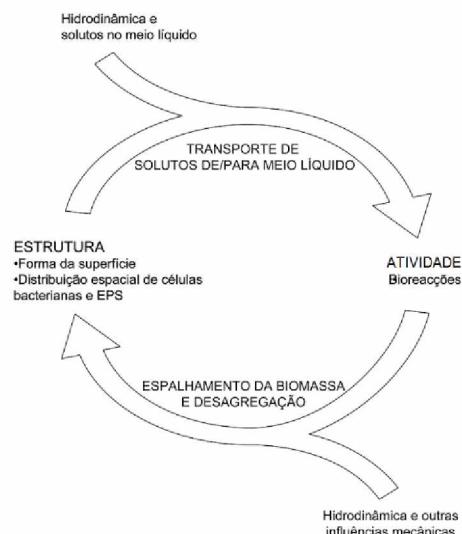
Figura 2 – Estruturas dos biofilmes: a) Modelo de Mosaico Heterogêneo; b) Modelo em forma de Cogumelo



Fonte: Menoita *et al* (2012)

A estrutura dos biofilmes tem um papel fundamental na atividade dos mesmos. Não somente as condições hidrodinâmicas e o fornecimento de nutrientes influenciam a transferência de massa de todos os produtos químicos envolvidos, o formato do biofilme também. Contudo, sua estrutura é definida em parte pela atividade vital do biofilme (Figura 3): o crescimento das células microbianas, produção e excreção de EPS, em conjunto com fatores externos como forças de atrito definidas pela hidrodinâmica e outras forças mecânicas envolvidas, que moldam a estrutura dos biofilmes (XAVIER *et al*, 2003).

Figura 3 - As influências envolvidas na relação estrutura/atividade em biofilmes



Fonte: Xavier *et al* (2003)

2.1.2.1 SUBSTÂNCIA EXTRACELULAR POLIMÉRICA (EPS)

As substâncias extracelulares poliméricas (EPS) são biopolímeros de origem microbiana, em que os micro-organismos do biofilme estão embebidos, no qual podem ser encontrados: arque bactérias, eubactérias e micro-organismos eucariotas produzindo os biopolímeros. Ao contrário do que se acreditava, as EPS são mais do que polissacarídeos, as quais compreendem uma grande variedade de proteínas, glicoproteínas, glicolipídeos, e em alguns casos, DNA extracelular (e-DNA) (FLEMMING, NEU & WOZNIAK, 2007).

As EPS imobilizam as células de biofilmes e os mantêm em uma estreita proximidade, a qual permite interações intensas, incluindo o “*quórum sensing*” (permitindo a comunicação entre as células, inclusive interespecífico). Ocorre a produção e liberação de enzimas extracelulares formando um versátil sistema digestivo externo, fornecendo à biota, substâncias particuladas dissolvidas na fase aquosa, permitindo que estas sejam utilizados como nutrientes e fonte de energia. A matriz protege os micro-organismos contra dessecação, biocidas, agentes oxidantes, antimicrobianos, cátions metálicos, radiação ultravioleta e as defesas dos hospedeiros (FLEMMING & WINGENDER, 2010).

É demonstrado que o biofilme é resistente a vários componentes do sistema imune por dificultar a acessibilidade aos mesmos, devido ao efeito do EPS protetor. O EPS age como um absorvente ou reagente, reduzindo a quantidade de antimicrobianos disponíveis para interagirem com o biofilme, assim como a estrutura física reduz a penetração de agentes antimicrobianos como uma barreira de acesso a regiões do biofilme (DAVIES, 2003).

2.1.3 PROPRIEDADES DO BIOFILME

Os micro-organismos em biofilme apresentam variadas modificações diferenciando em muito de quando em vida planctônica, acarretando consequências de diagnóstico e de

terapias significantes. Essas propriedades serão descritas de acordo com Hoiby *et. al* (2011):

- A) *As bactérias aparecem diferentes em infecções por biofilmes, desde a sua localização de proximidadeumas com as outras e cercadas pela matriz produzida por elas mesmo. Um biofilme pode ser reconhecido pela microscopia de luz, embora uma identificação mais precisa, de toda a bactéria dentro do biofilme, só pode ser percebida pelas técnicas de hibridização do DNA.*
- B) *Estudos transcriptônicos da Pseudomonas aeruginosa, indicaram adaptação da fisiologia e bioquímica do crescimento das bactérias em biofilme, comparada com o crescimento da bactéria na forma planctônica. Enquanto o padrão da expressão de genes durante o crescimento do biofilme é investigado, os resultados indicam que as células bacterianas principalmente se assemelham ao crescimento da bactéria planctônica na fase do crescimento estacionário em que cada bactéria exibe uma atividade metabólica baixa.*
- C) *A viabilidade da bactéria em biofilme, indica um aumento na tolerância contra os antimicrobianos, desinfetantes, e sua capacidade de se proteger dos mecanismos de imunidade do hospedeiro evidenciado no aumento da tolerância das bactérias frente vários agentes.*
- D) *Dessa forma, os biofilmes causam infecções crônicas, persistentes, factíveis de espalhamento em focos secundários e de difícil controle.*

2.1.3.1 QUORUM SENSING (QS)

“Quorum Sensing” é o mecanismo pelo qual os micro-organismos se comunicam por meio de pequenas moléculas sinalizadoras de várias informações, tais como: seu número, condições ambientais, nutritivas, de resistência e de capacidade de causar doenças. (BASSLER & LOSICK, 2006).

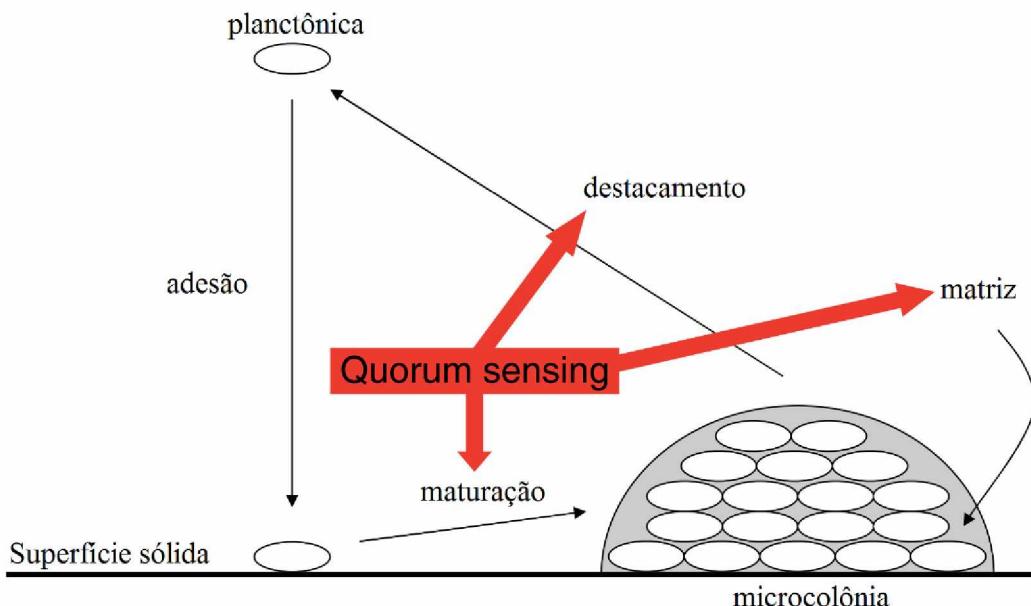
Para que as bactérias possam expressar sua capacidade de causar doenças, entra em jogo o QS, levando-as a reconhecerem o que as rodeiam em seu habitat (HOIBY *et al*, 2011).

Davies *et al.* (1998), sugere em suas descobertas que a inibição dos sinais células-a-células, causados pelo QS, pode ajudar na desorganização dos biofilmes.

Irie e Parsek (2008) consideram que o QS tem a função de controlar o tamanho da população no biofilme e, sinalizam para o reinício do ciclo de formação (Figura 4), promovendo a dispersão ou dissolução da subpopulação das células. O QS induz comportamentos nos biofilmes, os quais alteram o curso do desenvolvimento do mesmo, como a produção de fatores secretados, como os exopolissacarídeos ou outras adesinas. Alternativamente, o QS provoca ou reprime atividades de grupo, como a mobilidade de superfície, que por sua vez tem um profundo impacto na estrutura do biofilme.

Evidenciando que o QS está envolvido na regulação dos diferentes passos no desenvolvimento do biofilme, dependendo dos micro-organismos e das condições de crescimento.

Figura 4 - Desenvolvimento do biofilme. A atuação do *quorum-sensing*.



Fonte: Adaptado de Irie e Parsek (2008)

O QS, como um sistema de comunicação que coordena a expressão de genes no nível da comunidade, enquanto regula uma grande variedade de funções, controla propriedades ligadas a patogenicidade, e desempenha um importante papel na formação do biofilme, além de possibilitar o desenvolvimento populações mistas (RENDUELES & GHIGO, 2012).

2.1.4 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DO BIOFILME

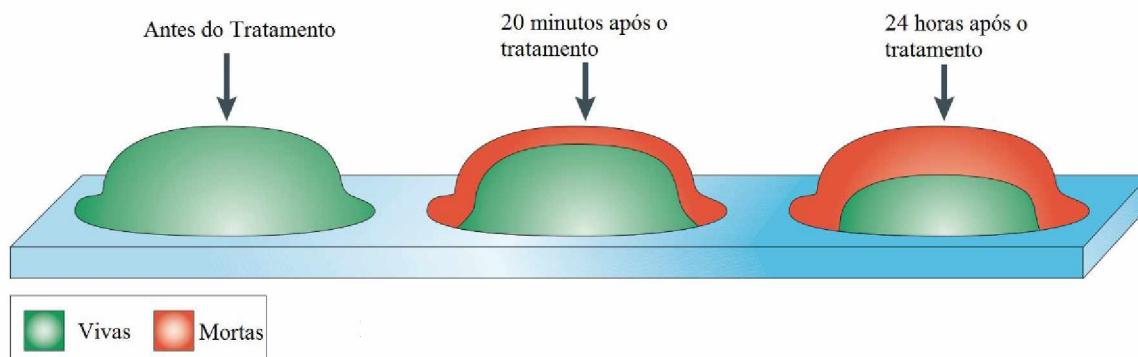
O controle de biofilme é dificultado pelo sistema de proteção estrutural nele existente, onde os micro-organismos se organizam em comunidades, nas quais evoluíram para apresentar fenótipos diferenciados, desempenhando funções complementares. O comportamento cooperativo associado das células bacterianas, são mediadas pela comunicação entre as células e outros fatores, que permitem um aumento da diversidade e da eficiência metabólica, assim como um aumento de resistência aos fatores ambientais, agentes antimicrobianos e as defesas de seus hospedeiros (EPSTEIN *et al*, 2011)

O crescimento bacteriano no biofilme se difere do planctônico em relação as propriedades genéticas e bioquímicas. Basicamente, a formação das células dos biofilmes que coexistem cada um formando grupos coordenados aderidos a uma superfície biótica ou não biótica, estão envolvidos por uma matriz de EPS, comunicando-se efetivamente pelos mecanismos de QS e em uma baixa atividade metabólica limitando a atividade dos antimicrobianos convencionais, diferentemente do que ocorre quando as células estão metabolicamente ativas (MELO & PERUSSI, 2013).

Muitos fatores têm sido sugeridos como responsáveis pela extraordinária resistência do biofilme em relação aos antimicrobianos: o metabolismo reduzido e as taxas de crescimento, mais especificamente sua parte mais interna. O EPS age como um absorvente ou reagente, reduzindo a quantidade de antimicrobianos disponíveis para interagirem com o biofilme, assim como a estrutura física reduz a penetração de agentes antimicrobianos como uma barreira de acesso a regiões do biofilme (DAVIES, 2003).

Como pode ser visto na Figura 5, o controle de biofilmes com antimicrobianos frequentemente resulta em uma incompleta eliminação, permitindo que as bactérias não atingidas atuem como um núcleo para a propagação dos patógenos, após a suspensão do uso dos antimicrobianos (DAVIES, 2003).

Figura 5 - Resistência do Biofilme ao antibiótico

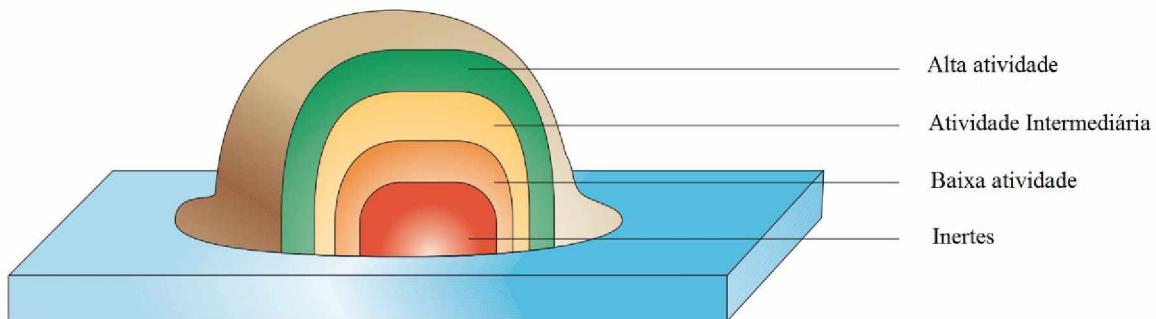


Fonte: Adaptado de Davies (2003)

A taxa de crescimento, a síntese proteica e a atividade metabólica são estratificadas nos biofilmes, mostrando um alto nível de atividade na superfície e um baixo nível, ou nenhum, de crescimento no centro. De acordo com Hoiby *et al* (2009), essa é considerada uma das explicações para uma baixa suscetibilidade dos biofilmes aos antimicrobianos.

Pesquisadores acreditam que o biofilme tem uma taxa de crescimento reduzida, a qual é um fator de contribuição para a incomum resistência dos mesmos, contra os tratamentos efetivos de antimicrobianos. Se tem percebido que as células nos centros das micro colônias, na verdade, tem taxas metabólicas reduzidas comparadas com as células próximas à superfície, como é ilustrado na Figura 6 (DAVIES, 2003).

Figura 6 - Atividade metabólica em uma micro colônia de biofilmes



Fonte: Adaptado de Davies (2003)

A atividade metabólica em uma micro colônia de biofilmes é em função da profundidade e é influenciada pelo transporte de nutrientes. De acordo com Melo (2014), no mesmo biofilme podem ser encontrados micro-organismos com diferentes atividades metabólicas e, essas diferenças são geradas pelo acesso das células aos nutrientes, oxigênio, água, dentre outros.

As células dos limites da micro colônia em contato com a interface líquida são os mais ativos. Já as células mais profundas na micro colônia podem potencialmente permanecerem inertes que reativam seu crescimento e metabolismo, após a suspensão do uso de antimicrobianos.

Os biofilmes são particularmente recalcitrantes a ação dos antimicrobianos, não só devido ao aumento de resistência inerentes as condições do meio interno da comunidade, mas também por meio das limitações de difusão impostas pela matriz extracelular, inativação antimicrobiana por uma maior concentração de íons metálicos e baixo pH, e a presença de células metabolicamente inativas, que mantém viáveis após a tentativa de tratamento e controle (KOSTAKIOTI, HADJIFRANGISKOU & HULTGREN, 2013).

Nesta seção 2.1, foram apresentados os principais conceitos relacionados aos biofilmes, como seu processo de formação, algumas propriedades e também seus mecanismos de resistência, os quais são uma das principais características dos mesmos.

2.2 FOTOCATÁLISE

Tem-se que a fotocatálise é um processo eletroquímico o qual acelera as reações de oxidação e redução de substâncias orgânicas por apenas existir uma incidência de luz ou energia radiante (MARANHÃO, 2009).

Esse processo é identificado por Nogueira e Jardim (1997), com aplicação a descontaminação ambiental. São chamados de “Processos Oxidativos Avançados” (POA) e tem atraído grande interesse por serem mais sustentáveis a longo prazo. Funcionam pela formação de radicais hidroxila (HO), um agente altamente oxidante. Mediante à sua alta reatividade ($E^\circ = 2,8 \text{ V}$), os radicais hidroxila podem reagir com vários compostos e promover sua total mineralização para compostos inócuos como CO_2 e água.

O fenômeno da fotocatálise indica uma aceleração de uma fotoreação devido a presença de um catalisador. Essa definição leva em conta a fotosensibilização, um processo químico no qual uma entidade molecular é fotoquimicamente alterada, seguida de absorção de radiação por outra entidade molecular chamada de fotosintetizador. No entanto, ao contrário do processo photocatalítico, a fotosintetização exclui a fotoaceleração de uma reação química, independente se ocorre em uma fase homogênea ou heterogênea (SPASIANO *et. al* 2015).

Ainda de acordo com Spasiano *et al* (2015), o processo da fotocatálise pode ocorrer de dois tipos, o primeiro é chamado de “fotocatálise homogênea”, e a segunda de “fotocatálise heterogênea”.

Em Texeira e Jardim (2004) encontra-se que a formação dos radicais hidroxila (processo de fotocatálise) podem ocorrer mediante a vários processos, os quais são classificados em sistemas homogêneos ou heterogêneos, devido à ausência ou a presença de catalisadores na forma sólida, além de poderem estar ou não sob irradiação. Como neste trabalho a fotocatálise será realizada com a presença de catalisador na forma sólida, define-se que o foco seja dado a fotocatálise heterogênea.

Conforme é visto em Martins (2013), esse processo também pode ser chamado de fotodegradação, o qual consiste na irradiação de um fotocatalisador, geralmente por meio de um semicondutor inorgânico como o TiO₂, o qual será excitado eletronicamente. Desse modo, um elétron é movido da banda de valência para a banda de condução, formando regiões oxidantes e redutoras, as quais são capazes de catalisar as reações químicas, transformando os compostos orgânicos em CO₂ e H₂O.

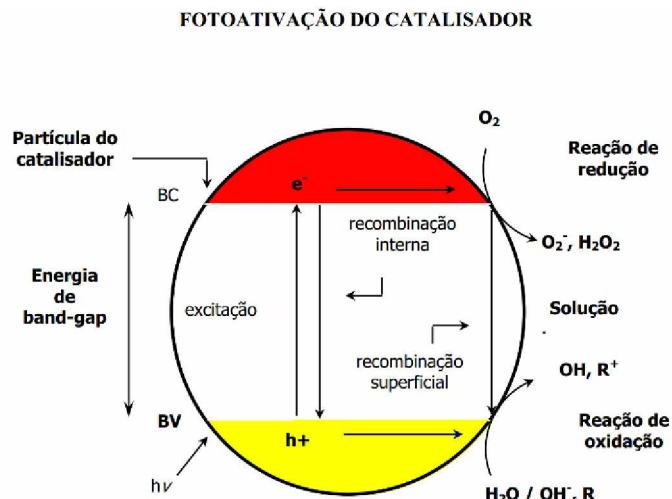
De acordo com Fujishima, Zhang e Tryk (2008), a fotocatálise é geralmente pensada como uma catálise de uma reação fotoquímica em uma superfície sólida, usualmente um semicondutor. É uma simples definição, enquanto correta e útil, entretanto, desconsidera o fato de que devem estar acontecendo no mínimo duas reações simultaneamente, a primeira envolvendo oxidação, lacunas fotogeradas, e a segunda envolvendo a redução, de elétrons fotogerados. Ambos os processos devem ser equilibrados precisamente para que não ocorra uma mudança no fotocatalisador, o que é, afinal, um dos requisitos básicos para um catalisador.

2.2.1 FOTOCATÁLISE HETEROGÊNEA

O princípio da reação de um semicondutor fotocatalítico é simples. Por meio de uma irradiação de uma luz com energia maior do que um “*band gap*” (E_g), que é a diferença de energia entre uma banda de valência (BV) preenchida e uma banda de condução (BC) vazia, resulta em um elétron excitado (e^-) que vai para a BC, deixando uma lacuna positiva (h^+) na BV. Esses e^- e h^+ , reduzem e oxidam, respectivamente, espécies químicas na

superfície de fotocatalise, a menos que eles se recombinem para não dar nenhuma reação química, mas calor (KANEKO & OKURA, 2002). O processo é ilustrado na Figura 7.

Figura 7 - Esquema de fotoativação do catalisador



Fonte: Teixeira e Jardim (2004)

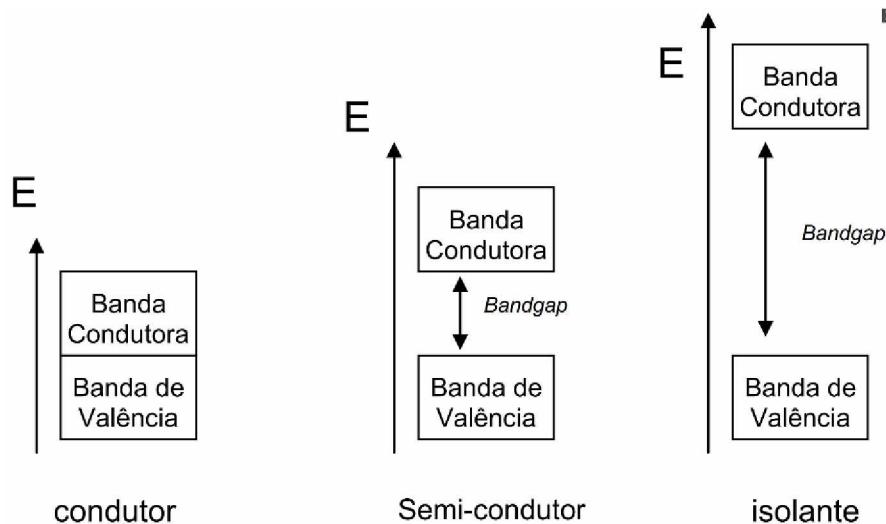
Em Ni *et. al* (2005) é dito que sem uma excitação, os elétrons e as lacunas permanecem na banda de valência. Quando os semicondutores são excitados por fótons com energia igual ou maior do que os seus níveis de energia de “*band gap*”, os elétrons recebem energia dos fótons e assim saltam da BV para a BC.

A estrutura original (ou composição química) dos materiais semicondutores permanece inalterada se números iguais e de elétrons excitados (e^-) e lacunas positivas (h^+) são consumidos pelas reações químicas e/ou recombinação, de onde vem o termo fotocatálise (KANEKO & OKURA, 2002).

O princípio básico da fotocatálise heterogênea se baseia no seu catalisador, que na forma sólida, é um semicondutor. Os semicondutores possuem uma banda de valência incompleta e uma banda condutora. As mesmas são separadas por uma lacuna, que se modifica conforme modificam-se os tipos de elementos, como pode ser visto na Figura 8. O tamanho da lacuna, influencia na energia necessária (“*bandgap*”) para que ocorra o

fenômeno da fotocatalise. De acordo com Maranhão (2009), nos condutores, essa lacuna é inexistente, enquanto que nos isolantes ela é grande o suficiente para impedir uma troca de elétrons. Tal fato é ilustrado na Figura 8.

Figura 8 - Diferenças entre os orbitais de compostos condutores, semicondutores e isolantes.

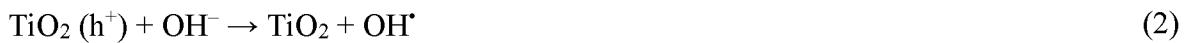


Fonte: Maranhão (2009)

O processo das reações químicas que ocorrem durante o fenômeno, será descrito conforme encontrado em Benabbou *et al* (2007). O primeiro passo que ocorre na reação de fotocatálise consiste na geração do par lacuna-elétron durante a irradiação das partículas de TiO₂ com uma energia fotônica igual, ou maior que a energia de “band gap” (3,2 eV). O elétron é então extraído da BV para a BC. Esse processo resulta em uma região de lacuna positiva na BV (h⁺) e em um elétron livre (e⁻) na BC (Equação (1)):



A lacuna, na superfície catalítica, reage com os íons hidroxilas (OH⁻) e absorve água para formar de radicais livres (OH[•]). (Equações 2 e 3):



O elétron na BC reduz o oxigênio a um íon superóxido: $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Equação 4). Essa reação previne a e^-/h^+ recombinação, na ausência de outros receptores de elétrons.



Uma redução adicional do $\text{O}_2^{\cdot-}$, produz H_2O_2 , como descrito na (Equação 5)



O íon superóxido e em sua forma de próton subsequentemente desencadeia a produção do peróxido de hidrogênio ou um ânion peróxido (Equações 6 - 8)

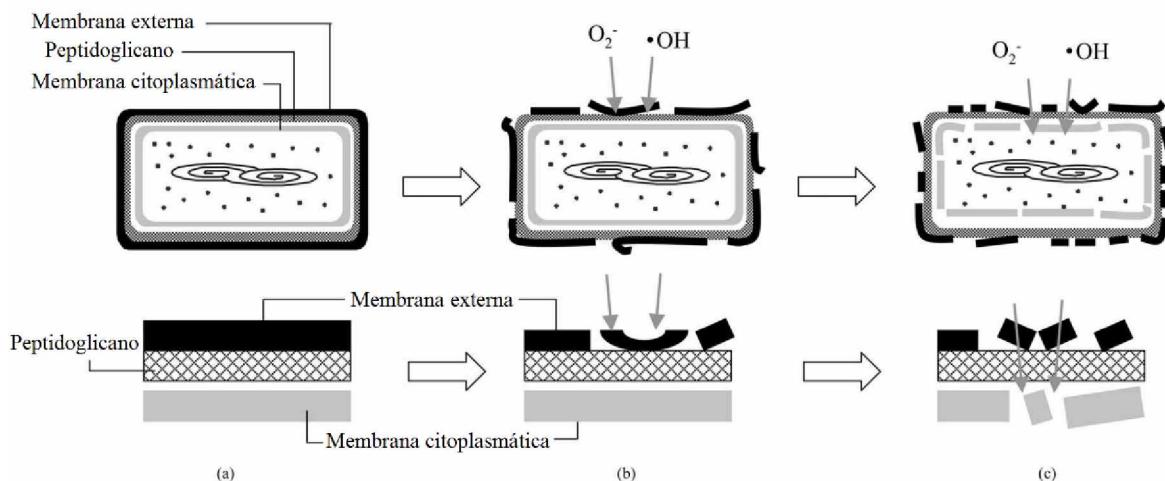


De acordo com todas as reações descritas, dentre os processos de fotocatálise, os radicais OH^\cdot são altamente ativos para a oxidação de substâncias orgânicas e para a inativação de vírus e bactérias (RINCON & PULGARIN, 2003).

Em Sunada, Watanabe e Hashimoto (2002) foi estudado um processo de fotocatálise da bactéria *E. coli*. No estudo, acredita-se que o processo pode ser dividido em 3 estágios: (1)

desordenando a membrana externa das células bacterianas pelas espécies reativas (OH^\cdot , H_2O_2 , O_2^\cdot); (2) desordenando a membrana interna (a membrana citoplasmática) e matando a célula; e (3) a decomposição da célula morta.

Figura 9 - Ilustração esquemática do processo de fotodegradação da *E. coli* em um filme de TiO_2 (de a-c).



Fonte: Adaptado de Sunada, Watanabe e Hashimoto (2002)

No primeiro estágio as membranas externas da bactéria, foram compostas parcialmente pelas espécies reativas produzidas pela fotocatálise do TiO_2 . A decomposição parcial da membrana externa, no entanto, modifica a permeabilidade a espécies reativas. Consequentemente, as espécies reativas podem alcançar e atacar a membrana interna, levando a peroxidação da membrana lipídica. As desordens estruturais e funcionais da membrana citoplasmática são devido a peroxidação do lipídio levar a uma perda de viabilidade das células e a morte das células (SUNADA, WATANABE & HASHIMOTO, 2002).

Em algumas pesquisas como no caso de Maness *et al* (1999) e Saito *et al* (1992) sustentam a ideia de que a desordem da membrana citoplasmática é a raiz para o efeito de degradação pela fotocatálise de TiO_2 . E assim, em Sunada, Watanabe e Hashimoto (2002), a parcial decomposição da membrana externa da célula bacteriana pelo início da reação

fotocatalítica do TiO₂, levou a morte da célula, mostrando a atividade fotodegradadora do filme de TiO₂.

2.2.2 FATORES QUE INFLUENCIAM NO DESEMPENHO DA FOTOCATÁLISE

De acordo com Kaneko e Okura (2002), a atividade fotocatalítica de um material semicondutor é controlada por três parâmetros básicos: (1) propriedade de absorção de luz, isto é, o espectro e o coeficiente de absorção da luz; (2) a taxa de redução e oxidação do substrato reativo por respectivamente e⁻ e h⁺; e (3) a taxa (ou a probabilidade) de recombinação do par e⁻-h⁺.

Em um nível mais específico, segundo Wade (2005), existem vários fatores que estão intimamente governando os três parâmetros citados por Kaneko e Okura (2002), incluindo o “*band gap*” da catálise, área de superfície, porosidade, estrutura cristalina, cristalinidade, pureza, densidade de superfície dos grupos hidroxilas, características de migração dos e⁻ e h⁺, acidez superficial, e a distribuição dos tamanhos. Cada uma dessas características pode ser melhorada usando técnicas de sintetização para criar os materiais fotocatalíticos.

Assim, os principais fatores que influenciam no desempenho dos processos fotocatalíticos, conforme encontrado em Maranhão (2009) são: a quantidade de partículas fotoativadas, a dimensão dessas partículas e a estrutura cristalina do semicondutor. Quanto mais partículas de dióxido de titânio em contato com a radiação ultravioleta, maior o desempenho fotocatalítico. As partículas devem ser nanométricas, sendo tanto mais efetivo quanto menor for a sua dimensão, entretanto alguns trabalhos têm indicado que as partículas com dimensões de 15 nm apresentam as mais intensas atividades fotocatalíticas.

Ainda de acordo com Maranhão (2009), o dióxido possui três formas cristalográficas: rutilo, anatase e bruquita. O rutilo tem sido bastante usado como opacificante e como pigmento na área de tintas e plásticos, enquanto que a anatase vem sendo pesquisada para a

fotocatálise, principalmente devido ao seu maior “*band gap*”. Já a bruquita não possui interesse, pois a mesma é instável.

2.2.3 APLICAÇÕES

O interesse pela fotocatálise tem se tornado cada dia maior, como se percebe em Maranhão (2009). Podem ser citados algumas formas nas quais o material já foi aplicado. Como a Igreja Dives in Misericórdia (Roma Itália) (Figura 10), a qual utilizou um cimento com propriedades fotocatalíticas, de modo a dar manutenção na cor do concreto.

Figura 10 - Igreja Dives in Misericordia



Fonte: Ital cementi Group (2009)

Tem-se outros exemplos como o caso dos pavimentos cimentícios (*pavers*) na cidade de Hong Kong (YU, 2003); em Bérgamo na Itália (MARTINS, 2013) e as placas de fibrocimento sem amianto (YURANOVA *et al*, 2007).

Em Spasiano *et al* (2015), podem ser vistos vários outros exemplos de uso do dióxido de titânio em fotocatálise. Os produtos foram utilizados em superfícies auto-limpantes, como no caso dos vidros de Pilkington, que anunciaram em 2001 o desenvolvimento da primeira

janela auto-limpante a *Pilkington Active*™, e posteriormente outras grandes companhias de vidro lançaram produtos similares, como os: *PPG's Sunclean*™, *Saint Gobain's Bioclean* e *Impact Safety Glass*.

Um produto desenvolvido no início da década de 90, desenvolvido pela empresa Japonesa Arc-Flash, usa uma tecnologia de fixação de um material que usa nanopartículas de TiO₂ como o principal ingrediente. De acordo com Spasiano *et al* (2015), o Arc-Flash® tem propriedades fotocatalíticas e antibacterianas que podem reduzir o número de infecções dos pacientes dos hospitais.

Superfícies antibacterianas usando o dióxido de titânio vem sendo testadas por pesquisadores. Etacheri *et al.* (2013) descobriu que o uso de um dióxido de titânio de estrutura atômica anatase-brookite apresentou uma alta taxa de inativação contra *Staphylococcus aureus*, quando comparado com o fotocatalisador da Evonik-Degussa P25, comercialmente disponível.

Em placas de plástico, foram testados por Mitoraj *et al.* (2007), dois tipos de TiO₂ com modificações diferentes, com cloreto de platina e outro com o dióxido dopado com carbono, ambos para atuarem como biocidas. Foi constatado o efeito biocida sobre *Escherichia coli*, na presença dos dois fotocatalisadores. O dióxido com o cloreto de platina exibiu um efeito maior de inativação.

A Arconic Architectural Products, uma empresa norte americana de inovação, produziu uma superfície de alumínio, chamada de Reunobond, na qual se aplica um revestimento de dióxido de titânio (chamada de EcoClean™), o que resultou em um painel arquitetônico de alumínio que é autolimpante e ajuda a limpar o ar ao seu redor.

2.3 DIÓXIDO DE TITÂNIO (TiO_2)

O dióxido de titânio é um material, semicondutor, que é amplamente empregado como photocatalisador, com a finalidade de degradar poluentes ambientais. Contudo, existem diversos outros tipos de aplicações tecnológicas para o mesmo (ULLA, 2014).

Muitos semicondutores como TiO_2 , CdS , ZnO , WO_3 , ZnS , Fe_2O_3 podem ser utilizados como sensibilizadores em processos de oxidação e redução. Entretanto, a combinação de fotoatividade e fotoestabilidade não é muitas das vezes, satisfeita. Assim, de acordo com Nogueira e Jardim (1997), principalmente devido à sua não toxicidade, fotoestabilidade e estabilidade química em uma ampla faixa de pH, o TiO_2 é o semicondutor mais amplamente estudado.

Para Nakata e Fujishima (2012), dos mais diferentes photocatalisadores, o TiO_2 tem sido o mais amplamente estudado e usado em várias aplicações devido a sua forte habilidade de oxidação para decomposição de poluentes orgânicos, super hidrofilicidade, estabilidade química, longa durabilidade, não toxicidade, baixo custo e transparência a luz visível.

Também tem se tornado um dos mais importantes photocatalisadores em biodescontaminação ambiental para uma grande variedade de orgânicos, bactérias, vírus, fungos e células cancerígenas, os quais podem ser totalmente degenerados e convertidos em CO_2 , H_2O e inofensivos ânions inorgânicos (BANERJEE *et al*, 2006).

Em Diebold (2002) são citadas as várias formas nas quais o TiO_2 é usado, como sendo: em células solares para a produção de hidrogênio e energia elétrica, como um sensor de gás, como um pigmento branco (em tintas e cosméticos), revestimento de proteção contra corrosão, protetor ótico, em cerâmicas e em dispositivos eletrônicos tais como resistores. É importante em ciências da Terra, e também desempenha um papel na biocompatibilidade de implantes ósseos, e outras mais.

Como já descrito anteriormente, o TiO₂ existe em três formas alotrópicas: anatase, rutilo e brookite. De acordo com Ullah (2014), as propriedades photocatalíticas do dióxido de titânio, também dependem da sua fase cristalina, sendo a anatase a mais fotoativa dentre elas e, em comparação com a rutilo, apresenta as principais causas:

- i. ao “*band gap*” indireto apresentado pela anatase, que diminui a taxa de recombinação do par e⁻ e h⁺;
- ii. a maior energia de “*band gap*” (diferença de 0,2 eV) que a rutilo;
- iii. a maior mobilidade dos elétrons na anatase do que na rutilo;
- iv. e, a habilidade única da anatase de promover a formação de espécies de peróxido em sua superfície.

De acordo com Nogueira e Jardim (1997), apesar de o TiO₂ ser considerado o semicondutor mais fotoativo, a recombinação do par e⁻ e h⁺ é um dos principais fatores que atrapalham o rendimento total do processo. Isso evidencia o motivo pelo qual já descrito em (i), a anatase é a forma mais utilizada e estudada do dióxido.

Uma das formas que podem melhorar a fotocatálise é quando se tem a redução do tamanho da partícula de TiO₂, sua área de superfície, aumenta levando a uma melhoria na fotoeficiência e, assim, na propriedade photocatalítica, pois a área de superfície elevada tornaria a superfície da partícula mais ativa em relação a absorção de luz e água (BANERJEE *et al*, 2006).

Por todos esses motivos, existe um grande interesse científico e na engenharia, na aplicação do semicondutor photocatalítico. O TiO₂ é um poderoso oxidante, devido ao seu alto potencial de oxidação das lacunas na banda de valência, formadas pela fotoexcitação (CARNEIRO *et al*, 2006).

2.4 PÓ DE VIDRO

Os vidros são compostos por silicatos não-cristalinos, que também podem conter outros óxidos que vão influenciar nas suas propriedades. Tem-se que as duas principais características desses materiais são a sua transparência ótica e a relativa facilidade de produção dos mesmos (CALLISTER, 2007). Como sendo um grupo familiar de materiais cerâmicos, os vidros, podem ter aplicações comuns, tais como: recipientes, janelas, lentes, portas, fachadas, fibras, entre outros.

Para a construção civil, basicamente podem ser os vidros do tipo: float (vidro comum); temperado (vidro com maior resistência a quebras e impactos); laminado (utiliza uma película de polivinil butiral para reter os cacos, em um dano); serigrafado (temperado com uma tinta aplicada a uma das faces); jateado (texturizado); insulado (separado por um perfil de alumínio, com duas chapas de vidro para melhor isolamento térmico e acústico); refletivo (camada metalizada para reter luz solar e calor); curvo (versátil geometria); e, fibra (utilização estrutural e isolante).

No processo de fabricação dos vidros são geradas algumas sucatas, como: os retalhos (pedaços que sobram), cacos (mediante a quebra durante a lapidação), peças indesejadas (baixa qualidade e fora das especificações) e o pó de vidro (resultante da lapidação, furação/recorte dos vidros ou no forno das têmperas). Retalhos, cacos e peças indesejadas também são gerados pela construção civil e por inutilidade de recipientes.

As sucatas (resíduos), podem retornar ao processo de produção do vidro, sendo reciclado, ao contrário do pó de vidro que não tem serventia. Além da reciclagem, pesquisas tem encontrado meios para a utilização desses resíduos, como a mistura dos mesmos em concretos e argamassas, tanto as sucatas quanto o pó de vidro.

Chen e Poon (2009) fizeram um experimento com resíduos de vidro de garrafas de bebidas, no qual utilizaram o vidro como um agregado na composição do concreto.

Identificaram que as camadas de superfície do concreto aumentaram a atividade photocatalítica quando o mesmo possuía o resíduo. Os fragmentos de vidro incorporados permitiram que o TiO₂ no interior da camada de superfície desempenhasse um papel ativo na reação photocatalítica. A propriedade de transmitância dos resíduos de vidro é o fator chave para um aprimoramento eficiente da fotocatálise.

De modo a verificar a aplicabilidade do pó de vidro, Ribeiro (2015) estudou a taxas de substituição de cimento pelos resíduos em argamassas de cimento Portland, de modo a verificar o efeito no estado fresco e endurecido de suas propriedades. Os resultados mecânicos mostraram que para baixas idades a resistência à compressão foi inferior às de referência, entretanto, para idades mais altas, com maior percentual de resíduo, mostraram aumento significativo de suas resistências. Para o autor, o uso parcial do resíduo se mostrou viável.

Em um estudo, Aly *et al* (2012) também estudaram a substituição parcial de cimento por pó de vidro (em 20% e 40%), produzido por esmerilhamento, além de adição de uma nano silica coloidal. Os resultados encontrados pelos autores mostraram uma melhora na resistência à compressão e flexão, além de um aumento na resistência ao impacto e energia de fratura.

Com a mesma intenção de Chen e Poon (2009), de aprimoramento da fotocatálise, Martins (2013) fez o uso do resíduo de vidro encapsulado com o TiO₂ em uma resina epóxi, para a verificação de inativação de patógenos. Na execução dessa pesquisa, foram utilizadas amostras sem a presença do resíduo e com variação de teores de vidro. Observou-se que houve uma melhor performance da fotocatálise quando utilizados teores de 10% de mistura de pó de vidro, indicando que, provavelmente, a concentração ideal desse resíduo esteja próximo de 10%.

De acordo com a Associação Brasileira de Distribuidores e Processadores de Vidros Planos, o pó de vidro, gerado no processo de furação ou lapidação dos vidros não possui serventia para a indústria vidreira, nem para o processo de reciclagem. Por isso, neste

trabalho, destaca-se a importância da utilização do pó de vidro, dando uma destinação final e nobre, para um material que seria descartado.

2.5 RESINA EPÓXI

Uma das primeiras sínteses da resina epóxi foi creditada ao Dr. S. O. Greenlee, um pesquisador americano, o qual estudou a síntese da resina para utilização em revestimentos, no ano de 1936.

Segundo Harper (2004) as resinas epóxi são grupos de polímeros de ligação cruzada e, por vezes, conhecido como o grupo oxirano, o qual é reativo para uma ampla gama de agentes de cura. As reações de cura convertem as resinas de baixo peso molecular, em estruturas tridimensionais termorrígidas que exibem propriedades valiosas.

O termo resina epóxi pode se referir às formas curadas e não-curadas das resinas. Podem ser encontradas nos estados líquidos, semissólidos ou até sólido, dependendo da sua composição química (grau de polimerização), que pode alterar sua viscosidade. As resinas epóxi são convertidas em polímeros termorrígidos por meio de um processo de cura pela ação de endurecedores, aditivos ou catalisadores (agentes de cura) (SILVEIRA, 2009).

Kersting (2004) destaca como as propriedades da resina epóxi como sendo: boa adesão a diversos substratos, tenacidade relativamente alta, boa resistência as intempéries, alta resistência elétrica, baixa contração volumétrica, entre outras propriedades.

Além disso, as resinas têm um coeficiente térmico maior que o do concreto, um comportamento frágil, excelente aderência, alta resistência à tração e à compressão. Também é altamente resistente ao ataque químico e ao desgaste. Em contrapartida, algumas delas não podem ser usadas em ambientes úmidos, tem um odor forte antes da polimerização e é fortemente alergênico.

Mourão (2010) diz que as resinas epóxi apresentam propriedades mecânicas superiores à qualquer resina, sendo a resistência à compressão de 80 a 100 MPa e resistência à tração entre 40 a 60 MPa.

De acordo com Silveira (2009) as resinas epóxi têm merecido uma atenção especial em relação as outras resinas termorrígidas. Tal fato se dá por elas apresentarem excelentes características como matrizes hospedeiras, na qual podem criar uma demanda por novas aplicações na área da opto-eletrônica.

Devido a todas essas propriedades, na Engenharia Civil, as resinas epóxi tem sido utilizadas em conjunto com fibras, para fabricação de compósitos. Esses compósitos têm sido amplamente estudados como materiais de reforços estruturais. Em Carneiro (2009) podem ser encontrados alguns exemplos de aplicações de materiais compósitos de resina e fibras para reparo e reforço de elementos estruturais.

Segundo Lima (2012), na construção civil, as resinas apresentam resultados satisfatórios em juntas flexíveis, união entre concreto velho e novo, revestimentos de depósitos destinados a produtos agressivos, membranas impermeabilizantes e pinturas anticorrosivas. Mas vem sendo utilizadas essencialmente em pisos industriais, principalmente por sua característica de alta aderência e resistência.

As propriedades as quais os produtos à base de resina epóxi oferecem, na maior parte das vezes, são superiores as apresentadas por quaisquer outras resinas. O conjunto das propriedades físicas, mecânicas e elétricas concentradas em um único produto favorecem diversas aplicações como polímeros de engenharia (KERSTING, 2004).

Na Tabela 1, são apresentadas características gerais, de forma resumida, as aplicações comuns em construção civil, de acordo com Tonet (2009).

Tabela 1 – Propriedades gerais e aplicações comuns da resina epóxi.

AGLOMERANTE	Características gerais	Aplicações comuns
Epóxi	<ul style="list-style-type: none">• Alta resistência química;• Ótima aderência a outros materiais;• Baixo índice de retração;• Baixa absorção de água e alta resistência mecânica;• Custo alto.	Utilizado em situações especiais, como pisos para indústria e rodovias, para restauração de estruturas deterioradas e como recobrimento para paredes internas.

Fonte: Adaptado de Tonet (2009)

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção são apresentados os materiais que foram utilizados e o procedimento experimental adotado.

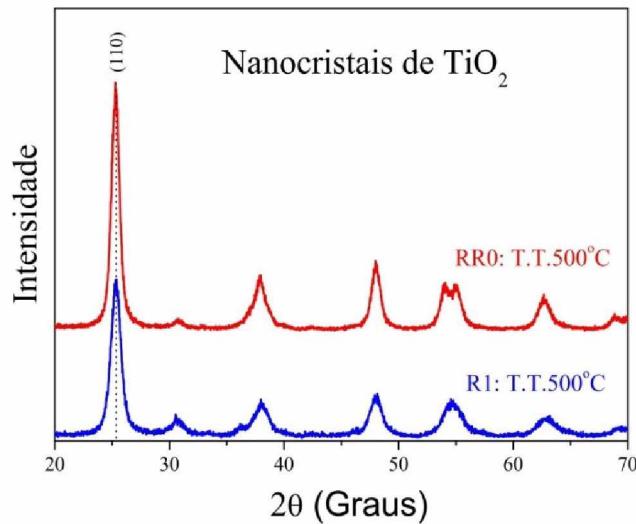
3.1 MATERIAIS

O trabalho foi desenvolvido experimentalmente, utilizando os seguintes materiais: dióxido de titânio, resina epóxi, pó de vidro, meios de cultura e cepas dos micro-organismos. A partir desses materiais prepararam-se os compósitos (corpos de prova), realizaram-se dos ensaios microbiológicos e verificou-se a formação de biofilmes. A seguir são descritos os materiais utilizados.

3.1.1 DIÓXIDO DE TITÂNIO (TiO_2)

Por meio da parceria firmada com Laboratório de Novos Materiais Isolantes e Semicondutores (LNMIS) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) se obteve o dióxido de titânio (TiO_2).

O LNMIS disponibilizou as amostras sintetizadas e devidamente caracterizadas para serem testadas. Por meio de difratogramas de Raios-X (Figura 11), foram calculados os tamanhos médios dos cristais.

Figura 11 – Difratograma de Raios-X dos nanocristais de TiO₂

Fonte: Autor (2016)

De acordo com o LNMIS, os picos de difração de Bragg estão em excelente acordo com o padrão de difração característico de nano cristais de TiO₂ os nanocristais na fase anatase e, a ausência de picos adicionais confirma a alta pureza das amostras. Por meio da equação de Debye-Scherrer, os tamanhos médios dos nano cristais foram obtidos, sendo de 22 nm e 18 nm para as amostras RR0 e R1, respectivamente. O Quadro 1 apresenta esses valores.

Quadro 1 - Tamanho médio dos diâmetros dos TiO₂

Tamanho médio dos nanocristais de TiO₂	
RR0	R1
22 nm	18 nm

Fonte: Autor (2016)

3.1.2 RESINA EPÓXI

A resina que foi utilizada da linha de produção da empresa Silaex® Química Ltda e envasada pela empresa Avipol Comercial Ltda. O kit adquirido possui a resina epóxi SQ

2119 e seu endurecedor epóxi SQ 3131, ou seja, é do tipo bi componente. O Quadro 2, apresenta as características da mistura da resina com seu endurecedor.

Quadro 2 – Características da mistura

Características da mistura de SQ 2119 com endurecedor SQ 3131	
Proporção de mistura a cada 100g de SQ 2119	12 g de endurecedor SQ 3131
Temperatura de manipulação (°C)	18 a 25
Tempo de uso da mistura a 20 °C, 100g	15 minutos
Endurecimento da mistura (100g, 20°C)	40 minutos
Cura total (100 ml, 20 °C, 65% U.R.)	24 horas
Peso específico da mistura, g/cm ³	1,5 +/- 0,05
Viscosidade da mistura, 20 °C	10.000 +- 2.000

Fonte: Silaex (2013)

De acordo com o catálogo do fabricante Silaex® Química Ltda, a resina possui as seguintes características:

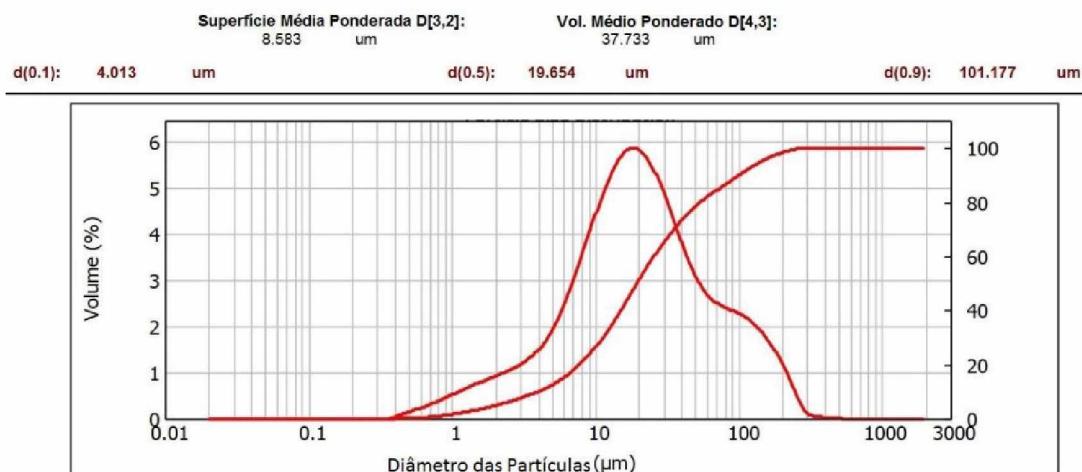
- facilidade de processamento; baixa exotermia;
- contração ínfima; não libera subprodutos;
- excelentes propriedades dielétricas com alta isolação;
- resistência química elevada, especialmente ao intemperismo e umidade;
- estabilidade aos ciclos térmicos;
- excelente adesão, alta dureza, resistente a impactos, abrasão e ações mecânicas;
- e é um polímero termofixo.

3.1.3 PÓ DE VIDRO

A amostra de resíduo de vidro (denominado neste trabalho pó de vidro) é remanescente do trabalho de Ribeiro (2015). A amostra coletada foi caracterizada fisicamente por esse mesmo autor, resultando nas características descritas a seguir.

O resíduo é um material pulverulento e, tem uma distribuição granulométrica com 90% das partículas com dimensão inferior a aproximadamente 101,2 μm , diâmetro médio das partículas de 19,6 μm e 10% das partículas com dimensão inferior a 4,0 μm (Figura 12). Sua superfície específica é de 282 m^2/kg e a massa específica para o resíduo seco é de 2480 kg/m^3 .

Figura 12 – Curva granulométrica do Resíduo de vidro



Fonte: Ribeiro (2015)

3.1.4 MEIOS DE CULTURA

Para o cultivo e crescimento das bactérias fez-se o uso do caldo *trypticase soy broth* (TSB) com adição de 2% de sacarose e placas de cultivo celular em *trypticase soy agar* (TSA)

3.1.5 CEPAS DE MICRO-ORGANISMOS

As cepas foram fornecidas pelo Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) da UFU. Foram utilizadas cepas padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923 icaD+) e uma amostra clínica fornecida gentilmente por Batistão (2014) de *Staphylococcus aureus*, chamada de N 321, para fins de controle positivo e negativo, respectivamente. Mantidas em freezer a -20 °C, em ágar estoque, com adição e 15% de glicerol, no Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

As cepas de *Staphylococcus aureus* 25923 icaD+ são formadoras de biofilme, finalidade para qual foram escolhidas para este trabalho. Já as *Staphylococcus aureus* N 321, conforme constatado em Batistão (2014), são fracamente formadoras, por isso aqui serão usadas como controle negativo.

3.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

No procedimento experimental foi definida a sequência de atividades conforme a descrição nos tópicos 3.2.1, 3.2.2 e 3.2.3. Iniciava-se com a fabricação do compósito polimérico (definição da composição do compósito e moldagem dos exemplares na forma de pastilhas), em seguida eram realizados os ensaios microbiológicos (formação de biofilme *in vitro*), finalizando-se com a visualização dos biofilmes formados nas superfícies dos exemplares/pastilhas (através da aquisição de imagens por microscopia).

De um modo geral, o programa experimental resultou em quatro etapas sequenciais (Etapa 1, 2, 3 e 4), conforme descrição a seguir.

A etapa 1 foi um experimento piloto, desenvolvido para a verificação do procedimento experimental e as técnicas aplicadas. Foram produzidos os exemplares (pastilhas) do

compósito (formados por resina epóxi, endurecedor e 10% de TiO₂), seguidos pela experimentação microbiológica, propiciando a formação ou não de biofilmes e, sendo finalizada com a visualização da superfície, por meio da microscopia de força atômica.

Como o resultado da microscopia de força atômica não foi satisfatório (conforme discriminado em 4.1), para a etapa 2 houve a troca do tipo de microscopia a ser utilizada, e assim, foi desenvolvido um segundo teste piloto. Foram produzidos mais exemplares do compósito (mesma composição que da etapa 1), levando-os ao ensaio microbiológico e examinando a superfície, através da microscopia eletrônica de varredura.

Em seguida, de posse de dois tipos de TiO₂ (RR0 e R1), a etapa 3 foi realizada para decidir qual dos dióxidos teria o melhor desempenho. Dessa forma, produziram-se exemplares com os dois tipos de dióxido, levando-os aos experimentos microbiológicos e, posteriormente, ao microscópio eletrônico de varredura.

Após a realização da etapa 3, adotou-se o TiO₂ com melhor desempenho (R1). Na etapa 4, fabricaram-se os compósitos com a adição do pó de vidro. Nesta etapa, os testes foram realizados para a verificação de qual compósito com pó de vidro apresentava o melhor desempenho. Consequentemente, produziram-se os exemplares, depois foram realizados os experimentos microbiológicos e em seguida a aquisição de imagens das superfícies dos exemplares por microscopia eletrônica de varredura.

No Quadro 3 são discriminadas as etapas descritas anteriormente, dividindo-se por atividades realizadas na sequência do procedimento experimental (Fabricação dos compósitos, ensaio microbiológico e a visualização dos biofilmes formados), bem quanto os objetivos especificados para cada uma das etapas.

Quadro 3 - Etapas do procedimento experimental

ATIVIDADE	Etapa 1	Etapa 2	Etapa 3	Etapa 4
Fabricação do compósito polimérico		Resina epóxi + 10 % de TiO ₂ (Amostra RR0 e R1)		Resina epóxi + 10 % de TiO ₂ + Pó de vidro (com os teores de 8%, 10% e 12%)
Ensaio microbiológico			Formação de biofilmes <i>in vitro</i>	
Visualização dos biofilmes formados	Aquisição de imagens pela Microscopia de Força Atômica		Aquisição de imagens das superfícies dos exemplares (pastilhas) pela Microscopia Eletrônica de Varredura	
Objetivo das etapas	Testes piloto do procedimento experimental		Definir o TiO ₂ com melhor desempenho	Analizar qual das composições apresenta a melhor atividade fotocatalítica

Fonte: Autor (2016)

3.2.1 FABRICAÇÃO DOS EXEMPLARES (PASTILHAS)

Para a produção dos exemplares, em forma de pastilhas, de resina epóxi, procedeu-se de modo semelhante ao utilizado por Martins (2013), com algumas modificações. Os compósitos formados têm como composição: resina epóxi, TiO₂ e pó de vidro.

A fabricação se deu em quatro passos. No passo 1, foram determinadas as quantidades de exemplares a serem produzidos. No passo 2 tratou-se da confecção dos moldes, onde os exemplares seriam formados. No passo 3, definiram-se os teores dos materiais do compósito. E, no passo 4, foram feitas as moldagens dos exemplares.

3.2.1.1 DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE EXEMPLARES

A quantidade total de exemplares foi determinada de acordo com a quantidade de amostras e experimentos.

Para as etapas 1,2 e 3, a quantidade de amostras foram três, pois dois TiO₂ foram utilizados e uma amostra de REFERÊNCIA, sem TiO₂. As nomenclaturas utilizadas para as amostras, foi de acordo com a sua composição (Quadro 4).

Quadro 4 - Nomenclatura utilizada para as amostras das etapas 1,2 e 3

Amostras	Composição
RR0	Resina epóxi + 10% de TiO ₂ (do tipo RR0)
R1	Resina epóxi + 10% de TiO ₂ (do tipo R1)
REFERÊNCIA	Resina epóxi

Fonte: Autor (2016)

Já o experimento, variou de acordo com a exposição à iluminação (Iluminação UV e escuro) e a cepa utilizada na contaminação dos exemplares (*Staphylococcus aureus* 259323 icaD+ e *Staphylococcus aureus* N 321), resultando assim em quatro. Os mesmos podem ser vistos no Quadro 5

Quadro 5 – Experimentos do ensaio microbiológico

Experimento	1	2	3	4
Contaminação	<i>Staphylococcus</i> 25923 icaD +	<i>Staphylococcus</i> N 321	<i>Staphylococcus</i> 25923 icaD +	<i>Staphylococcus</i> N 321
Exposição	Iluminação UV		Escuro	

Fonte: Autor (2016)

Para cada amostra foram confeccionados três exemplares. Assim, o número total de exemplares produzidos para o ensaio microbiológico das etapas 1 e 2 resultou da relação de que para cada experimento (total de quatro) foram utilizadas três amostras e, se para cada amostra foram três exemplares, 36 exemplares foi a quantidade determinada para estas etapas. Como o ensaio microbiológico da etapa 3 foi realizado em duplicata, mas com o mesmo número de experimentos e amostras, a quantidade de exemplares para essa dobrou, passando para 72.

Como a composição dos compósitos para a etapa 4 foi modificado, a nomenclatura das amostras e sua quantidade também. O número de amostras passou a ser quatro (Quadro 6).

Quadro 6 - Nomenclatura utilizada para as amostras da etapa 4

Amostras	Composição
8	Resina epóxi + 10% de TiO ₂ (R1) + 8% de pó de vidro
10	Resina epóxi + 10% de TiO ₂ (R1) + 10% de pó de vidro
12	Resina epóxi + 10% de TiO ₂ (R1) + 12% de pó de vidro
REFERÊNCIA	Resina epóxi

Fonte: Autor (2016)

Para o ensaio microbiológico da etapa 4 foi considerado apenas o experimento 1, que pode ser visto no Quadro 5. Da mesma forma que nas etapas anteriores, a quantidade de exemplares produzidos foi de três por amostra. Com quatro amostras e um experimento, na etapa 4, o número de exemplares produzidos foi 12. Contudo, nesta etapa, o ensaio microbiológico foi realizado em triplicata, passando o número de exemplares para o total de 36.

3.2.1.2 CONFECÇÃO DO MOLDE DOS EXEMPLARES

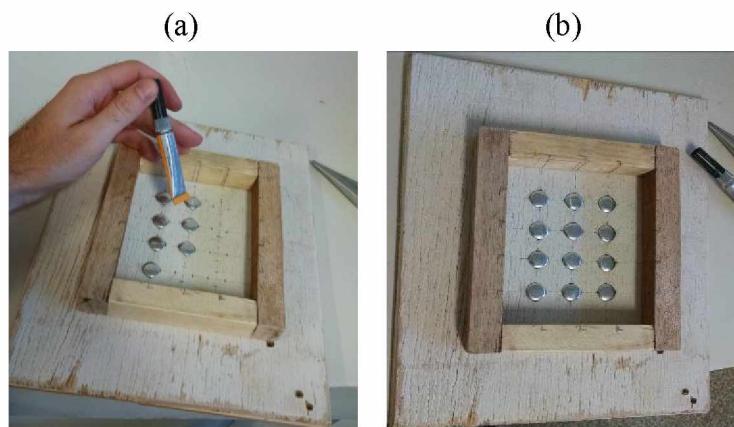
Para a confecção dos moldes para a moldagem dos exemplares, fez-se necessário definir o diâmetro e o formato dos mesmos. A limitação à dimensão e o formato geométrico dos exemplares, foram impostos pela dimensão dos poços da microplaca (também chamada de microplaca de titulação, a microplaca é uma placa plana que possui poços que são usados para cultura celular).

As microplacas adotadas para os ensaios microbiológicos, são de 24 poços, estéreis, com tampa e fundo chato. Essas, possuem poços com diâmetros de $\phi 15,6$ mm. Os poços das microplacas, durante o ensaio microbiológico, são preenchidos com meio de cultura contaminado com as cepas e os exemplares dos compósitos.

Desse modo, para que fosse possível manipular os exemplares dentro dos poços, os diâmetros adotados para os mesmos, foram de 13 mm (menor que o diâmetro dos poços das microplacas). Com isso definido, prosseguiu-se para a construção da forma para a confecção do molde dos exemplares (pastilhas).

Construiu-se uma forma em madeira, no formato retangular ($12,0\text{ cm} \times 10,0\text{ cm}$), no qual foram colados, com uma cola epóxi, botões artesanais de plástico, com dimensões médias de diâmetro de 13 mm e espessura de 1,5 mm, para formarem as cavidades que seriam preenchidas com os compósitos para moldagem dos exemplares. Na Figura 13 ilustram-se com duas imagens (a e b) a configuração da fôrma.

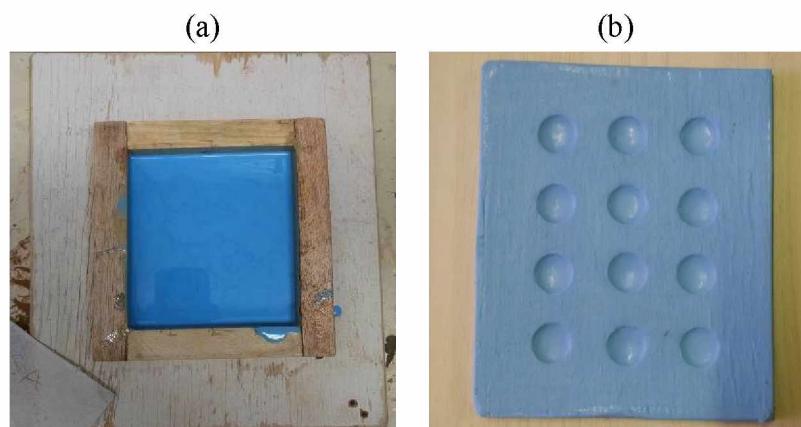
Figura 13 - Fabricação da fôrma do molde



Fonte: Autor (2016)

Com o “silicone azul”, fabricou-se o molde para os exemplares. O silicone azul é do tipo bi componente que, após a mistura com um catalisador, adquire a consistência necessária para sua utilização; após o período de 24 horas de cura, obtém-se o molde. Foram fabricados cinco moldes. Na Figura 14 (a) pode-se visualizar o silicone azul dentro do molde, e na Figura 14 (b) o molde pronto para moldar os doze exemplares.

Figura 14 – Preparação dos moldes dos exemplares



Fonte: Autor (2016)

3.2.1.3 DEFINIÇÃO DA COMPOSIÇÃO DOS COMPÓSITOS

Neste trabalho, os constituintes dos compósitos foram utilizados para moldar exemplares que constituíram o substrato no qual foram realizados os ensaios microbiológicos e as microscopias.

Nas etapas 1, 2 e 3, os compósitos foram preparados pela mistura entre a resina epóxi e os dióxidos de titânio (RR0 e R1). O teor de dióxido de TiO₂ foi definido tendo como REFERÊNCIA o trabalho de Martins (2013), no qual o autor verificou que o teor que melhor respondeu à atividade photocatalítica foi o que continha 10% de TiO₂ referido à massa do compósito.

Já na etapa 4, adotou-se a composição considerada de melhor desempenho por Martins (2013), constituída por resina epóxi, 10%, em massa de TiO₂ e 10%, em massa de pó de vidro. A diferença entre esta composição e as outras das etapas 1, 2 e 3, é a introdução do pó de vidro nas porcentagens de 8%, 10% e 12%.

Alguns cuidados foram tomados na preparação das misturas, atendendo as recomendações do fabricante (mistura do bi componente), como a dosagem dos materiais (resina + endurecedor) e o controle do tempo de manipulação. Após a mistura dos componentes, o compósito era aplicado no molde de silicone (molde dos exemplares), permanecendo até a sua cura completa (de acordo com o fabricante 24 h). Posteriormente a esse período os exemplares foram removidos dos moldes.

Foram moldados também, para todas as etapas, exemplares de REFERÊNCIA, feitos apenas de resina, sem adição de TiO₂ ou pó de vidro, isto é, os exemplares foram formados por resina e seu catalisador somente.

3.2.1.4 MOLDAGEM DOS EXEMPLARES

A moldagem dos exemplares foi feita no Laboratório de Materiais e Técnicas de Construção Civil da Faculdade de Engenharia Civil da UFU.

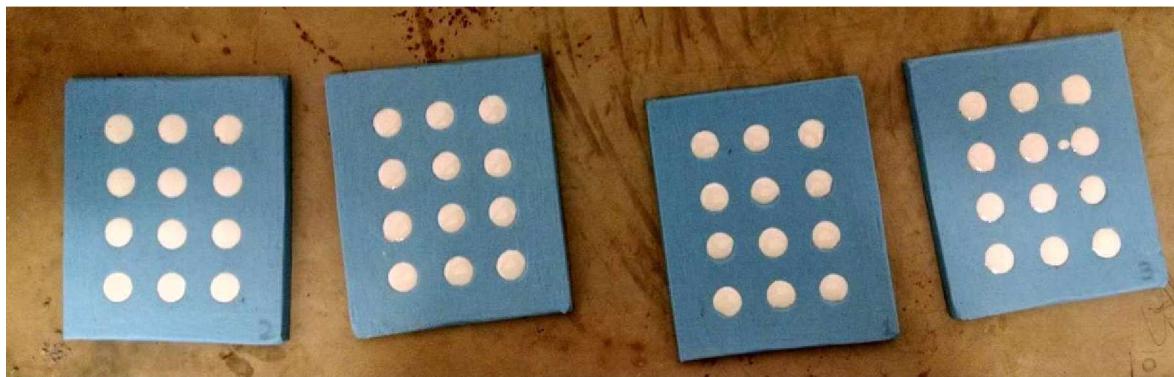
Com todos os produtos e equipamentos necessários e, os teores decididos, iniciou-se a fabricação dos exemplares. Por meio de um recipiente, pesou-se separadamente, em balança eletrônica de precisão, a resina epóxi, o endurecedor, o TiO₂ e o pó de vidro.

Como recomendação do fabricante da resina, a cada 100 mL de resina, misturam-se 12 mL de endurecedor. O endurecedor é utilizado como um catalisador, aumentando a velocidade da cura do material.

A sequência de mistura procedeu-se da seguinte maneira: primeiro pesava-se a resina em um recipiente separado e, em seguida, pesava-se o TiO₂ e o mesmo já era adicionado ao recipiente que continha a resina. Com isso, ganhava-se tempo para a homogeneização, sem se preocupar com o tempo de cura. Quando se percebia que a mistura já se encontrava visualmente homogênea, pesava-se e adicionava-se o endurecedor à mistura.

Nesse momento é que se tinha uma preocupação quanto ao tempo de manipulação e o endurecimento da mistura (Figura 15). Misturava-se então, por 1 a 2 minutos e, já aplicava o material nos moldes de silicone. Cada teor de mistura foi moldado de modo independente e, os moldes foram marcados (no canto inferior direito) para a identificação e diferenciação de cada um dos exemplares.

Figura 15 - Exemplares dispostos em seus moldes no tempo de cura



Fonte: Autor (2016)

Especificamente para a etapa 4, o pó de vidro era pesado e misturado após a adição e mistura de TiO₂ e antes do endurecedor, o que também fazia com que se ganhasse um tempo maior de manipulação para homogeneização das misturas.

Com os exemplares prontos, seguia-se para o ensaio microbiológico.

3.2.2 ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS

Os ensaios microbiológicos foram realizados após a confecção dos exemplares. Utilizou-se a estrutura do Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da UFU para proceder a formação de biofilmes.

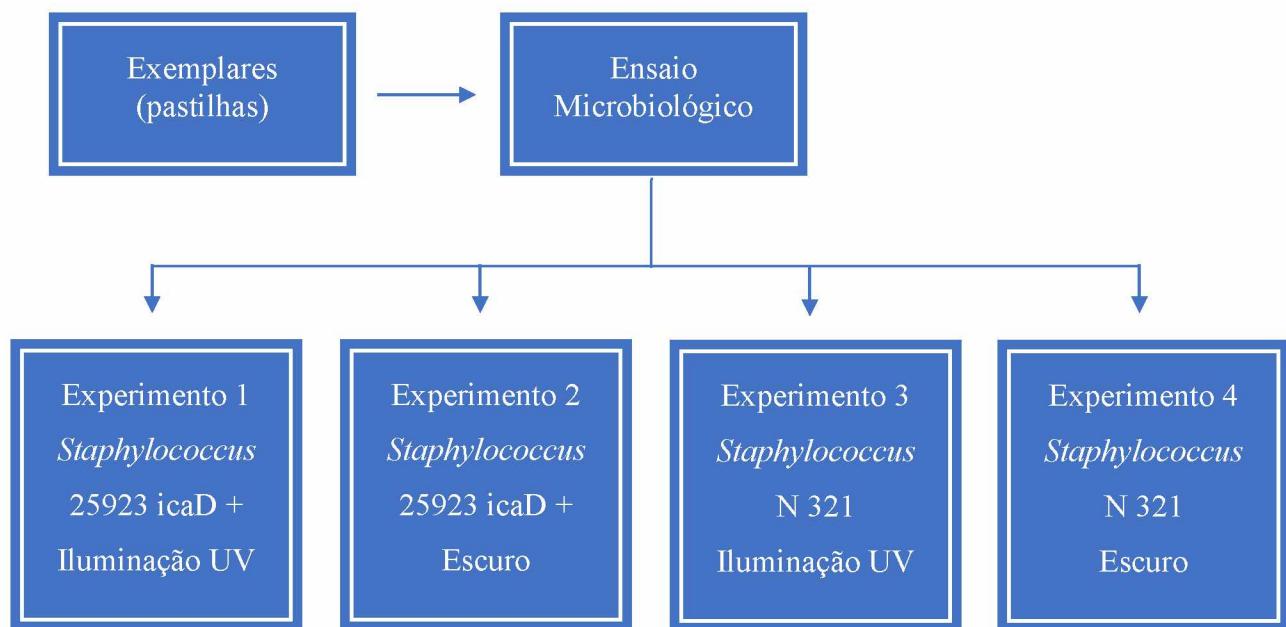
3.2.2.1 ESTERILIZAÇÃO

Para um ensaio microbiológico, os materiais a serem utilizados devem ser estéreis, de modo que não exista contaminação de outros micro-organismos. Todos os materiais foram lavados, enxugados e empacotados para esterilização em autoclave. O procedimento de esterilização foi o de rotina utilizado no laboratório de microbiologia.

3.2.2.2 EXPERIMENTOS REALIZADOS NO ENSAIO MICROBIOLÓGICO

Para as etapas 1, 2 e 3, o ensaio microbiológico resultou em quatro experimentos, dois devido aos tipos de contaminações bacteriológicas diferentes (*Staphylococcus aureus* 25923 icaD+ e *Staphylococcus aureus* N 321) e, outros dois quanto às exposições (iluminação UV e no escuro). A Figura 16 ilustra a divisão desses experimentos. O ensaio, nessas etapas, foi realizado em duplicata.

Figura 16 - Divisão dos experimentos do ensaio microbiológico



Fonte: Autor (2016)

Na etapa 4, o ensaio microbiológico foi realizado em triplicata e o experimento realizado foi apenas o Experimento 1. O experimento foi feito apenas com a contaminação dos exemplares utilizando a *Staphylococcus aureus* 25923 icaD+ e exposição à iluminação UV.

Para cada experimento realizado no ensaio microbiológico, foram formados biofilmes conforme se especifica em 3.2.2.3.

3.2.2.3 FORMAÇÃO DOS BIOFILMES

O protocolo utilizado para o teste de formação de biofilmes *in vitro* foi semelhante ao utilizado em Cerca *et al* (2005), com algumas modificações.

O teste de formação de biofilmes *in vitro* foi feito a partir da ativação das cepas dos micro-organismos, crescimento das bactérias e finalmente a sua formação, conforme é descrito a seguir.

Para a ativação dos micro-organismos, das cepas de controle positivo e negativo de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923 icaD+ e N 321, respectivamente), utilizou o caldo *Trypticase Soy Broth* (TSB) e placa de *Tryptic Soy Agar* (TSA), conforme as instruções do fabricante.

As cepas em estoque, congeladas, foram retiradas dos freezers e mantidas à temperatura ambiente, para descongelamento. Utilizando-se de uma alça bacteriológica, transferiu-se as amostras para dois tubos, contendo 3 mL de caldo estéril de TSB e 2% de sacarose. Os tubos foram incubados em uma estufa, por um período de 24 h a temperatura de 37 °C. Na Figura 17 apresenta-se a imagem dos tubos de ensaio, com o caldo e as bactérias, após serem retirados da estufa.

Figura 17 - Tubos contendo caldo de TSB e 2% de sacarose



Fonte: Autor (2016)

Após esse período, com o auxílio de uma alça bacteriana, transferiu-se as amostras das bactérias cultivadas no caldo, para uma placa de TSA, para que houvesse um novo crescimento das bactérias e a formação das colônias isoladas. As placas de TSA, devidamente identificadas, foram colocadas em uma estufa a 37 °C, por um período de 24 h. Posteriormente, com a retirada das placas da estufa, identificou-se visualmente a formação das colônias das bactérias na superfície da placa de TSA, conforme ilustrado na Figura 18.

Figura 18 - Placas de TSA com colônias formadas



Fonte: Autor (2016)

Na sequência, com a utilização de uma alça bacteriológica, foram tomadas colônias bacterianas para suspender-las em uma solução salina, até se obter uma turbidez compatível com a escala 0,5 de McFarland.

Em seguida, para a formação dos biofilmes, foram transferidos 2,0 mL de TSB para os poços das placas de cultivo, suplementado com 2% de sacarose. Também foi adicionado 0,1 mL de suspensão das amostras de *Staphylococcus aureus* contendo $\approx 1 \times 10^8$ UFC (suspenção bacteriana em solução salina, compatível com a escala 0,5 de McFarland). Em seguida, os exemplares (pastilhas) do teste, foram adicionadas aos poços das placas. Já para o crescimento do biofilme, as placas de cultivo foram levadas a uma estufa bacteriológica (Figura 19) a 37 °C, por um período de 48 h.

Figura 19 - Microplacas posicionadas na estufa



Fonte: Autor (2016)

Durante o período em que as microplacas com os exemplares ficaram na estufa, para as etapas 1, 2 e 3, foram utilizadas duas estufas, onde uma microplaca ficou exposta a uma iluminação de uma lâmpada Ultravioleta (conforme pode ser vista na parte superior da Figura 19), com o comprimento de onda de 350 nm, com a intenção de provocar a fotocatálise nos compósitos; e, uma outra microplaca ficou em uma estufa sem iluminação, de forma a ser o controle em relação à iluminação. Ambas, sob as mesmas condições de temperatura e período de cultivo.

Já para a etapa 4, a exposição ocorreu para três microplacas (ensaio em triplicata), apenas expostas à iluminação UV.

Em relação as etapas 1, 2 e 3, utilizou-se a cepa de *Staphylococcus aureus* N 321 como controle negativo, ou seja, para cada amostra de controle positivo tinha-se uma de controle negativo. Para a etapa 4, utilizou-se apenas as cepas de controle positivo de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 icaD+.

Após esse período, as amostras foram levadas para avaliação da formação de biofilmes, por meio da microscopia eletrônica de varredura.

3.2.3 AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILMES

Para a avaliação da formação dos biofilmes, se fazia necessário o preparo dos exemplares (pastilhas), para sua visualização no microscópio. Ainda no laboratório de microbiologia, os exemplares, quando retirados dos poços das microplacas de cultura, eram lavados com solução salina.

Antes de as amostras serem levadas para o microscópio eletrônico de varredura (MEV), seguia-se o protocolo de processamento de amostras para MEV, indicado pelo Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP), com algumas modificações.

Fixou-se exemplares em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M com pH 7,3 por 2 horas. As amostras foram lavadas em água destilada e levadas à desidratação em série crescente de álcool etílico em 30; 50; 70; 80; 90 e 100%, por um período de 15 minutos em cada, repetindo apenas uma vez, com o teor de 100%.

Após a desidratação, as amostras foram levadas ao laboratório de microscopia eletrônica de varredura e metalizadas com ouro (Figura 20). Com as amostras metalizadas, fez-se a microscopia.

Figura 20 – Exemplares metalizados com ouro



Fonte: Autor (2016)

Para a avaliação da formação de biofilmes nos compósitos estudados, quatro laboratórios foram utilizados. O primeiro (utilizado para a etapa 1), do instituto de física da UFU, foi utilizado para a realização da microscopia de força atômica. As imagens aqui obtidas não foram conclusivas. Acredita-se que devia ser aplicada uma técnica de preparo das amostras.

O segundo laboratório foi o Laboratório Multusuário de Microscopia (LMM) do Instituto de Engenharia Química da UFU. As etapas 2 e parte da 3, utilizaram o microscópio eletrônico de varredura deste laboratório. Entretanto, após a realização da duplicata do ensaio microbiológico da etapa 3, o equipamento do laboratório encontrou-se indisponível, pois o mesmo encontrava-se danificado.

Assim, a aquisição de imagens por microscopia eletrônica de varredura para finalizar a etapa 3, foi feita no Laboratório Ensino Pesquisa e Usinagem (LEPU) da Faculdade de Engenharia Mecânica da UFU.

Para a etapa 4, a aquisição de imagens foi feita no Laboratório de Pesquisa Multusuário do Instituto de Química da UFU, pois o microscópio eletrônico de varredura do LEPU, encontrava-se em manutenção, indisponível aos usuários.

Ressalta-se que dificuldades foram encontradas para a utilização desses equipamentos. Tanto por conciliação de agendamentos entre laboratórios e a disponibilidade do equipamento.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E ANÁLISES

Nesse capítulo são apresentados os resultados obtidos com o procedimento experimental. Para facilitar a compreensão e a descrição dos resultados, serão divididos em 4 etapas (as mesmas discutidas em 3.2 e ilustradas no Quadro 3).

Os resultados obtidos pelo procedimento experimental foram avaliados de modo qualitativo, tendo em vista que através das imagens obtidas não foi possível fazer uma avaliação quantitativa.

As imagens mostradas aqui, são de alguns exemplares escolhidos para a análise. Todas as imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura estão no Apêndice A.

As nomenclaturas utilizadas para as amostras testadas, foram dadas de acordo com a sua composição, conforme em 3.2.1.1.

4.1 ETAPA 1

Na etapa 1, foram produzidos um total de 36 exemplares, conforme é apresentado Quadro 7.

Quadro 7 – Etapa 1: composição das amostras e quantidade de exemplares

Amostra	Composição	Nº de Exemplares por Experimento			
		1	2	3	4
RR0	Resina epóxi + 10% de TiO ₂ (do tipo RR0)	3	3	3	3
R1	Resina epóxi + 10% de TiO ₂ (do tipo R1)	3	3	3	3
REFERÊNCIA	Resina epóxi	3	3	3	3

Fonte: Autor (2016)

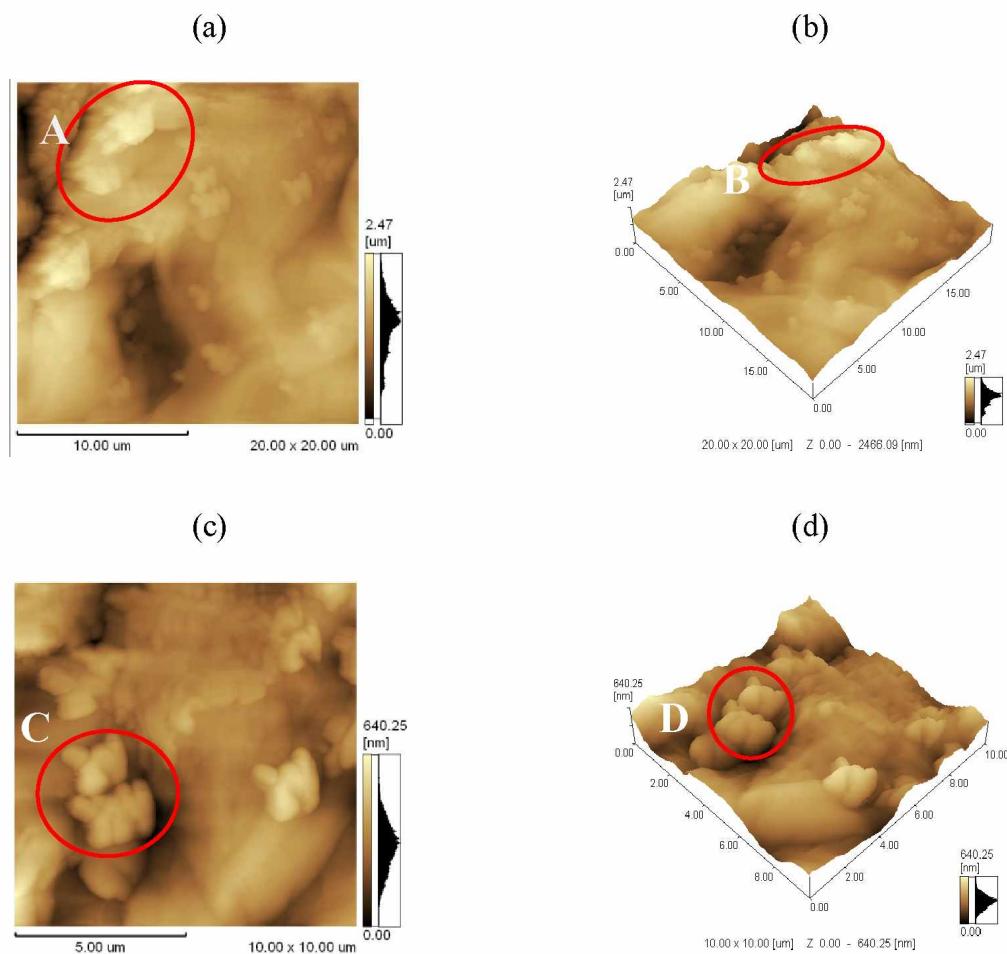
Não se utilizou nenhuma identificação na superfície dos exemplares. Os mesmos, após a sua produção, foram guardados em recipientes separados e identificados. Os exemplares foram levados ao Laboratório de Novos Materiais Isolantes e Semicondutores (LNMIS) do Instituto de Física da UFU, para a obtenção de imagens por meio da microscopia de força atômica.

Segundo indicação do laboratório LNMIS, as amostras não precisavam de preparo para a aquisição de imagens pelo microscópio de força atômica.

Durante a microscopia, constatou-se que a superfície se modificava de campo para campo microscópico. Na maioria dos casos, as bactérias até se apresentavam deformadas, por causa movimento do microscópio na superfície dos exemplares. Desse modo, viu-se que o mesmo não estava sendo satisfatório. A aquisição imagens por meio da microscopia de força atômica, como a Figura 21, ocorria com grandes dificuldades, pois ao caminhar com a ponta do equipamento sobre a superfície, a ponta afetava os micro-organismos modificando as imagens e impossibilitando sua leitura correta.

Como as imagens não foram satisfatórias, foram escolhidas imagens da amostra REFERÊNCIA para exemplificação. As imagens apresentadas na Figura 21, são da superfície de um exemplar da amostra REFERÊNCIA, após esta ter sido submetido aos ensaios microbiológicos (iluminada pela luz UV). As regiões circuladas, são locais destacados para evidenciar a presença de micro-organismos na superfície do exemplar.

Figura 21 – Imagens da superfície do exemplar da amostra REFERÊNCIA obtidas no Microscópio de Força Atômica



Fonte: Autor (2016)

Na Figura 21(a), na região marcada como A, nota-se um acúmulo de micro-organismos, entretanto, a técnica não favoreceu uma identificação de forma clara. Já na Figura 21(c), na região C, identificam-se elevações na superfície, que se assemelham à tipologia de

bactérias, entretanto, os formatos indicam que não são *Staphylococcus aureus*. As imagens (b) e (d), são as mesmas que (a) e (c), entretanto mostrando as elevações da superfície. As regiões B e D, são as mesmas que A e C, respectivamente.

Devido as dificuldades de obtenção das imagens por microscopia de força atômica e a alteração da superfície dos exemplares, optou-se por utilizar os testes seguintes na microscopia eletrônica de varredura para a etapa 2.

4.2 ETAPA 2

Nesta etapa, a aquisição de imagens foi feita por microscopia eletrônica de varredura. Conforme observado nos resultados da etapa 1, as imagens fornecidas não foram satisfatórias para a pesquisa.

Do mesmo modo que na etapa 1, na etapa 2 foram produzidos trinta e seis exemplares, conforme ilustrado no Quadro 7.

Os exemplares produzidos e preparados, conforme descrito em 3.2, foram levados ao Laboratório Multusuário de Microscopia (LMM) da Faculdade de Engenharia Química da UFU, para a obtenção das imagens pela microscopia eletrônica de varredura. As imagens são apresentadas na Figura 22.

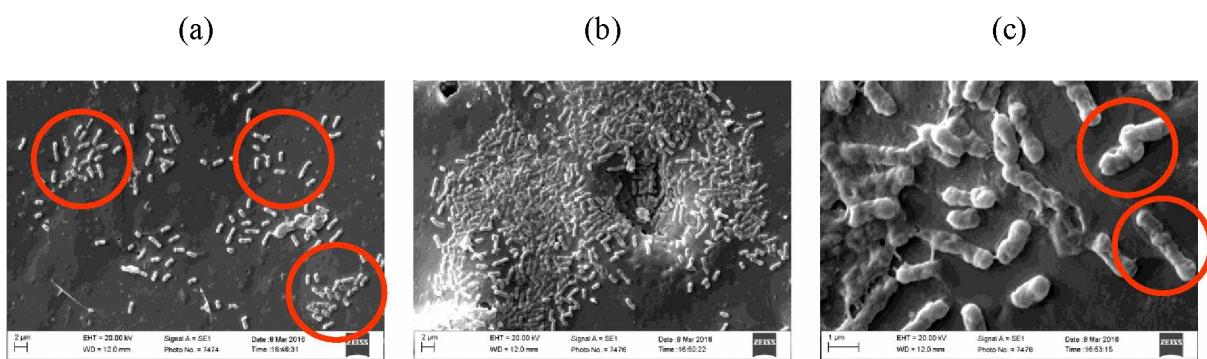
Diferentemente das imagens obtidas pela microscopia de força atômica, representada na Figura 21, os micro-organismos puderam ser facilmente vistos na superfície do exemplar, como se observa na Figura 22.

Como era um teste piloto para verificar se o preparo adotado para as amostras foi satisfatório, foi escolhido apenas um exemplar da amostra REFERÊNCIA para a

microscopia eletrônica de varredura. Se o resultado fosse satisfatório, prosseguir-se-ia com o restante dos exemplares das amostras, no preparo e análises.

Sendo assim, na Figura 22, apresentam-se imagens da superfície de um exemplar da amostra REFERÊNCIA (etapa 2).

Figura 22 - Microscopia eletrônica de varredura do exemplar 3 da amostra de REFERÊNCIA da etapa 2



Fonte: Autor (2016)

Os pontos e traços mais claros, dentro dos círculos da Figura 22 (a), são micro-organismos. Na Figura 22 (b) vê-se uma grande aglomeração dos mesmos. Como se percebe na Figura 22 (c), com magnificação ampliada, os micro-organismos formados na superfície do exemplar não possuem formas esféricas, sendo mais assemelhadas a bastões ou bacilos, diferentemente do que é dito Santos *et al* (2007), que a *Staphylococcus aureus* é uma bactéria esférica e pode apresentar-se de formas diferentes, que vão desde isolados, aos pares, em cadeias curtas, ou agrupados irregularmente (se assemelhando a um cacho de uvas).

Esse fato permitiu concluir que os micro-organismos nas imagens não são *Staphylococcus aureus*, objeto dessa pesquisa, pois a característica geométrica seria esférica e não as encontradas. Desse modo, acreditou-se que as cepas utilizadas poderiam estar contaminadas. Mediante a realização de ensaios no laboratório de microbiologia,

comprovou-se que as cepas utilizadas estavam contaminadas, no entanto não foi objeto de investigação o tipo de contaminação.

Apesar de ter sido identificada uma contaminação nas cepas utilizadas, as imagens formadas na microscopia eletrônica foram satisfatórias e mostraram que o procedimento de preparo das amostras foi adequado. Com isso, decidiu-se que a microscopia a ser utilizada seria a microscopia eletrônica de varredura. Assim, foram isoladas novas cepas de *Staphylococcus aureus* para prosseguir para a etapa 3.

4.3 ETAPA 3

Nesta etapa, os exemplares (pastilhas) foram definitivamente testados, com o objetivo de determinar qual dos TiO₂ (RR0 e R1) teria melhor desempenho photocatalítico.

Na etapa 3, o ensaio microbiológico foi realizado em duplicata. Assim, foram produzidos 36 exemplares/pastilhas para o 1^a ensaio e 36 para a duplicata, totalizando, então, 72 exemplares. No Quadro 8, estão discriminadas as amostras, a composição e quantidade de exemplares por ensaio microbiológico.

Quadro 8 – Etapa 3: composição das amostras e quantidade de exemplares

Amostra	Composição	Nº de Exemplares por Experimento			
		1	2	3	4
RR0	Resina epóxi + endurecedor + 10% de TiO ₂ (do tipo RR0)	3	3	3	3
R1	Resina epóxi + endurecedor + 10% de TiO ₂ (do tipo R1)	3	3	3	3
REFERÊNCIA	Resina epóxi + endurecedor	3	3	3	3

Fonte: Autor (2016)

Com o término dos ensaios microbiológicos, foram realizadas as microscopias. Para a realização das microscopias, os exemplares foram levados ao LMM. Devido a problemas de manutenção do equipamento do LMM, para a duplicata, os exemplares foram levados ao Laboratório Ensino Pesquisa e Usinagem (LEPU) da UFU, pois o microscópio eletrônico de varredura do LMM ficou indisponível. Por isso, perceber-se-á a diferença nas imagens das microscopias geradas (Quadro 9 ao Quadro 16).

4.3.1 EXPERIMENTO 1 - CONTAMINAÇÃO POR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* 25923 iCAD+ - EXPOSIÇÃO À ILUMINAÇÃO UV

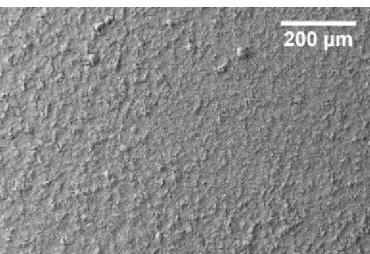
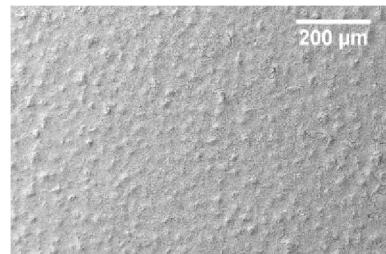
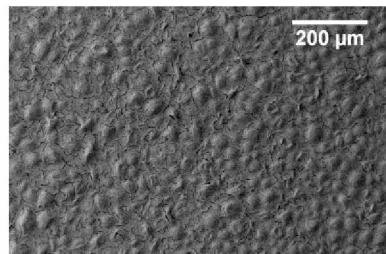
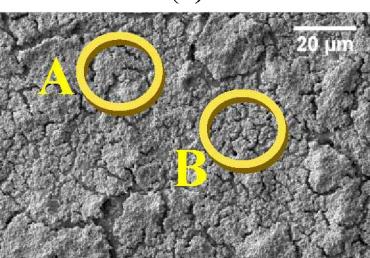
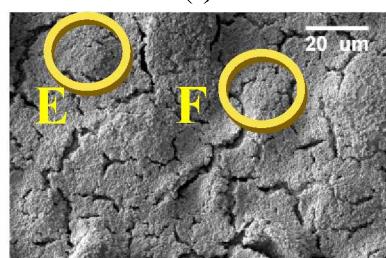
No Quadro 9 apresentam-se imagens dos exemplares das amostras após o ensaio microbiológico com a *Staphylococcus aureus* 25923 iCaD+, quando expostos a uma iluminação UV. Os mesmos estão divididos por amostras (RR0, R1 e REFERÊNCIA).

As imagens (a), (b) e (c) do Quadro 9, foram obtidas por microscopia eletrônica de varredura, com uma magnificação de 300 vezes. Já as imagens (d), (e) e (f), obtidas da mesma forma, são apresentadas em magnificação de 2500 vezes.

Como se percebe, nas imagens (a) e (b) do Quadro 9, as superfícies apresentam características bem semelhantes, diferentemente da imagem (c), a qual apresenta uma topografia com elevações maiores e mais arredondadas do que as imagens (a) e (b). Isso indica que na imagem (c) tem-se uma maior formação de biofilme, do que em (a) e (b). O mesmo pode ser visto nas imagens de magnificação maior ((d), (e) e (f), do Quadro 9).

Pelas imagens (d), (e) e (f), do Quadro 9, percebe-se que em (d) e (e) existem regiões mais independentes, vê-se espaços entre as aglomerações das bactérias. Isso pode ser visto nas regiões marcadas por “A”, “B”, “C” e “D”, dentro dos círculos. Já em (f), a superfície parece mais homogênea, conforme as regiões circulares “E” e “F”.

Quadro 9 – Imagens da microscopia eletrônica de varredura do exemplar 3 contaminado com *Staphylococcus aureus* 25923 icaD+ (1º Ensaio)

Iluminação UV - Exemplar 3		
RR0	R1	REFERÊNCIA
(a) 	(b) 	(c) 
(d) 	(e) 	(f) 
<i>Staphylococcus aureus</i> 25923 icaD+		

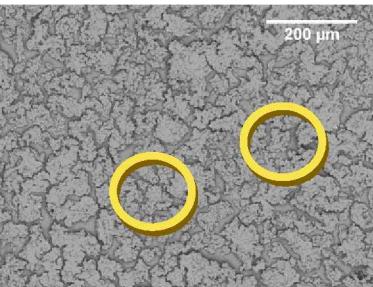
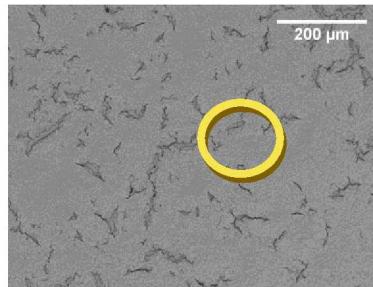
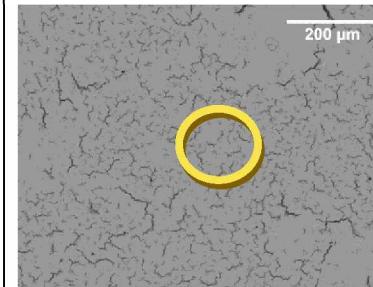
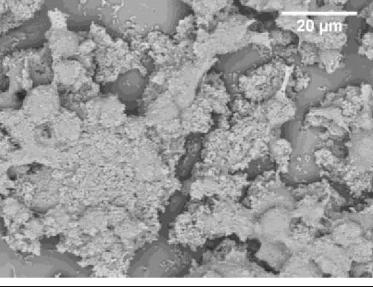
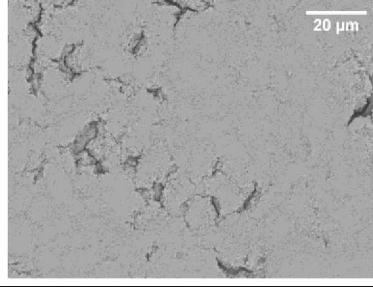
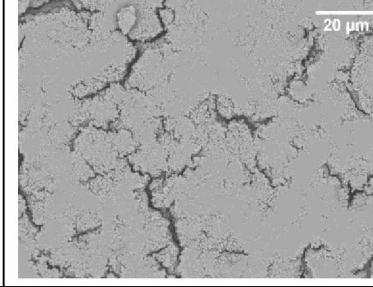
Fonte: Autor (2016)

Dentre todas as imagens apresentadas no Quadro 9, a amostra RR0, foi a que apresentou menor variação de elevação em sua superfície. Acredita-se assim, que os biofilmes formados nesse exemplar, sejam menos espessos devido as descontinuidades apresentadas na superfície.

Tal fato pode ser confirmado, quando o ensaio foi repetido, conforme pode ser visto na imagem (a) do Quadro 10, dentro dos círculos, onde essas regiões são destacadas, apresentando uma maior descontinuidade e menor quantidade de biofilmes formados.

Comparando as imagens (b) e (c), do Quadro 10, nota-se que o exemplar da amostra R1 teve um desempenho inferior ao da amostra de REFERÊNCIA, se tratando da continuidade do biofilme. Entretanto, acredita-se que sua espessura seja menor.

Quadro 10 – Imagens da microscopia eletrônica de varredura do exemplar 1 contaminado com *Staphylococcus aureus* 25923 icaD+ (Duplicata)

Iluminação UV - Exemplar 1		
RR0	R1	REFERÊNCIA
(a) 	(b) 	(c) 
(d) 	(e) 	(f) 
<i>Staphylococcus aureus</i> 25923 icaD+		

Fonte: Autor (2016)

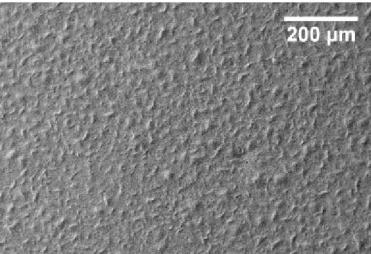
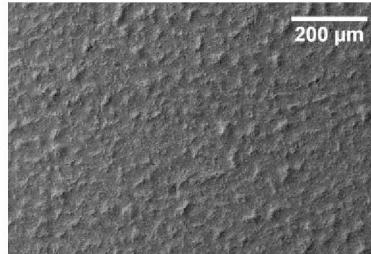
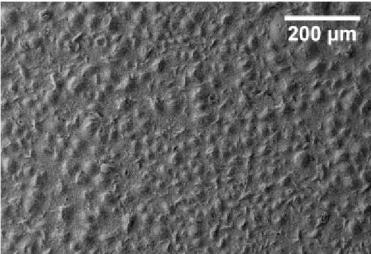
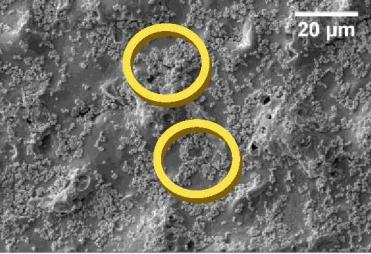
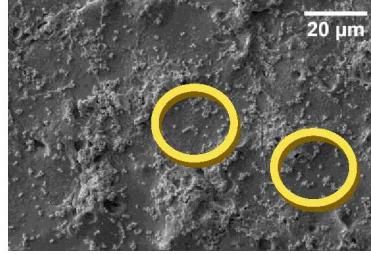
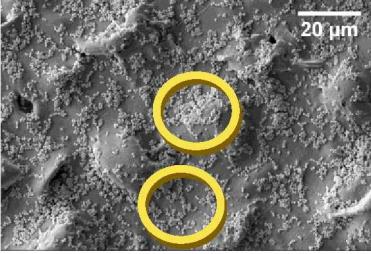
As imagens (a), (b) e (c) do Quadro 10, são imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura, com uma magnificação de 300 vezes. Já as imagens (e) e (f), também obtidas por microscopia, são apresentadas em magnificação de 2 000 vezes, com exceção da (d), a qual é de magnificação de 2 500 vezes.

Neste experimento nota-se então, uma leve vantagem no uso do dióxido, onde no primeiro e no segundo ensaio, as amostras RR0 obtiveram melhor desempenho. E, em relação aos diferentes tipos de dióxidos usados, o RR0 se saiu melhor que o R1, em ambos os ensaios.

4.3.2 EXPERIMENTO 2 - CONTAMINAÇÃO POR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* N 321 - EXPOSIÇÃO À ILUMINAÇÃO UV

O Quadro 11 apresenta imagens dos exemplares das amostras após o ensaio microbiológico com a *Staphylococcus aureus* N 321, quando expostos a uma iluminação UV. Os mesmos estão divididos por amostras (RR0, R1 e REFERÊNCIA).

Quadro 11 – Imagens da microscopia eletrônica de varredura do exemplar 3 contaminado com *Staphylococcus aureus* N 321 (1º Ensaio)

Iluminação UV - Exemplar 3		
RR0	R1	REFERÊNCIA
(a) 	(b) 	(c) 
(d) 	(e) 	(f) 
<i>Staphylococcus aureus</i> N 321		

Fonte: Autor (2016)

As imagens (a), (b) e (c) do Quadro 11, são imagens obtidas por microscopia, com uma magnificação de 300 vezes. Já as imagens (d), (e) e (f), também obtidas por microscopia, são apresentadas em magnificação de 2 500 vezes.

Conforme observa-se no Quadro 11, as imagens (a), (b) e (c), não apresentam muitas diferenças quanto a formação de biofilmes. Também nas imagens (d), (e) e (f), nota-se um menor espalhamento das bactérias sobre a superfície dos exemplares, diferentemente do observado pelas imagens (d), (e) e (f) do Quadro 9, onde houve a formação dos biofilmes.

Os exemplares do Quadro 11, foram contaminados com a *Staphylococcus aureus* N 321. Essa bactéria, de acordo com Batistão (2014), é não formadora ou fracamente formadora de biofilme. Por isso, foram diferentes das apresentadas no Quadro 9.

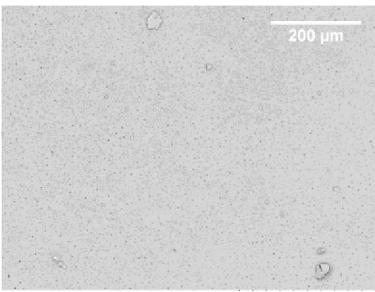
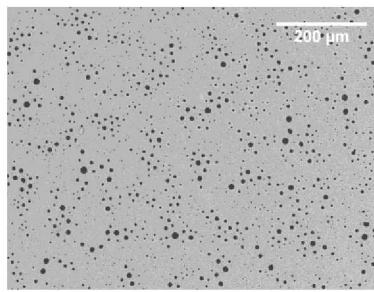
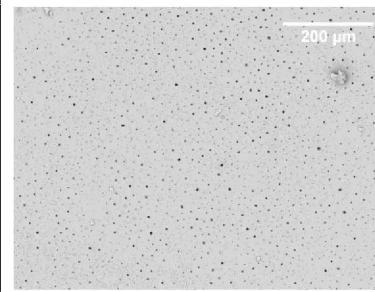
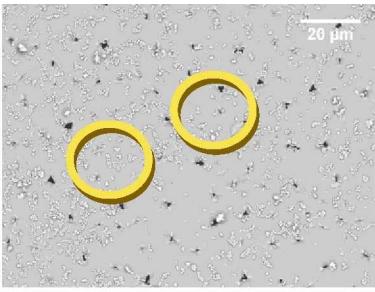
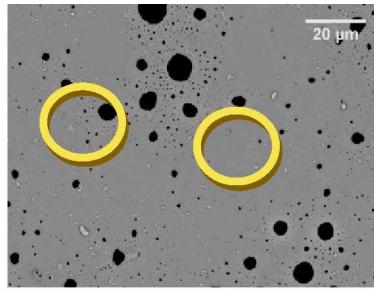
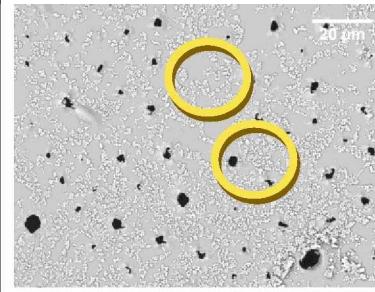
A imagem (e), do Quadro 11, apresenta a imagem da microscopia do exemplar da amostra R1. Identifica-se, através desta, que houve uma menor ocupação de sua superfície pelas bactérias, em relação aos exemplares das amostras RR0 e REFERÊNCIA que, de acordo com as imagens (d) e (f), mostraram-se com um desempenho próximo.

Tal fato é evidenciado pelas regiões marcadas em cada uma das imagens ((d), (e) e (f) do Quadro 11) pelos círculos. Dentro dos círculos, consegue-se visualizar que em (e), tem-se menos micro-organismos que em (d) e (f).

O mesmo pode ser visto, quando o ensaio foi repetido. Os exemplares das amostras R1, tiveram melhor desempenho e as bactérias proliferaram raramente em sua superfície. As imagens são vistas no Quadro 12.

Nas imagens (a), (b) e (c) do Quadro 12, quase não se percebe a presença de bactérias na superfície dos exemplares. Entretanto, ao se observar as regiões em destaque, nas imagens (d), (e) e (f), verifica-se que os exemplares apresentam as mesmas características que as regiões em destaque mostradas nas imagens do Quadro 11.

Quadro 12 – Imagens da microscopia eletrônica de varredura do exemplar 1 contaminado com *Staphylococcus aureus* N 321 (Duplicata)

Iluminação UV - Exemplar 1		
RR0	R1	REFERÊNCIA
(a) 	(b) 	(c) 
(d) 	(e) 	(f) 
<i>Staphylococcus aureus</i> N 321		

Fonte: Autor (2016)

Nota-se que, principalmente nas imagens (b) e (e), do Quadro 12, tiveram algumas manchas escuras. Não se descobriu o motivo do surgimento das mesmas, mas acredita-se que são orifícios da superfície do exemplar.

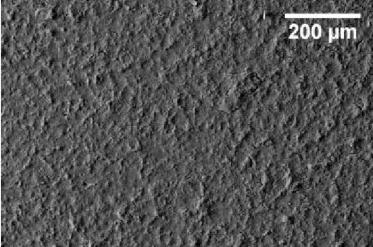
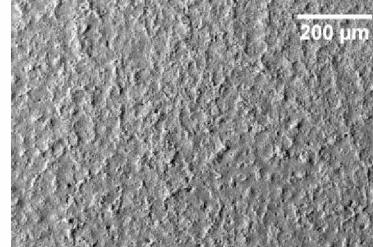
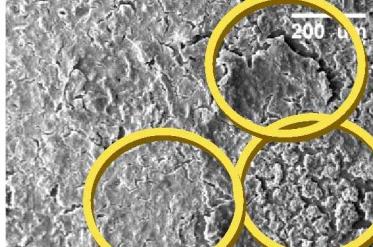
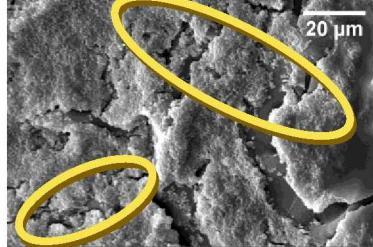
Devido as imagens geradas pelas microscopias, pôde-se observar a eficácia do dióxido no caso desses ensaios. As amostras R1, obtiveram desempenho satisfatório em ambos os ensaios e, as amostras que continham o dióxido, mostraram-se mais eficazes do que a amostra de REFERÊNCIA.

4.3.3 EXPERIMENTO 3 - CONTAMINAÇÃO POR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* 25923 iCAD+ - EXPOSIÇÃO AO ESCURO

O Quadro 13 apresenta imagens dos exemplares das amostras após o ensaio microbiológico com a *Staphylococcus aureus* 25923 iCaD+, quando expostos ao escuro. Os mesmos estão divididos por amostra (RR0, R1 e REFERÊNCIA).

As imagens (a), (b) e (c) do Quadro 13, são imagens obtidas por microscopia, com uma magnificação de 300 vezes. Já as imagens (d), (e) e (f), também obtidas por microscopia, são apresentadas em magnificação de 2 500 vezes.

Quadro 13 – Imagens da microscopia eletrônica de varredura do exemplar 1 contaminado com *Staphylococcus aureus* 25923 iCaD+ (1º Ensaio)

Escuro - Exemplar 1		
RR0	R1	REFERÊNCIA
(a) 	(b) 	(c) 
(d) 	(e) 	(f) 
<i>Staphylococcus aureus</i> 25923 iCaD+		

Fonte: Autor (2016)

Diferentemente quando expostas na iluminação UV, aqui, as imagens (a) e (b) do Quadro 13, mostram que as superfícies apresentam características diferentes da imagem (c).

Conforme se vê, nas imagens (a) e (b) do Quadro 13, os exemplares tiveram um desempenho semelhante. Já na imagem (c), nas regiões destacadas pelos círculos, percebe-se uma ruptura de uma camada na superfície, o que pode ser melhor evidenciado pelas elipses na imagem (f). Essa camada, ao que tudo indica, se assemelha com a formação de uma substância polimérica extracelular, substância na qual é produzida por biofilmes.

Com as regiões destacadas em (d) e (e) (Quadro 13), nota-se que a amostra R1 teve um desempenho melhor que a RR0, pois em (e) se tem regiões com ausência de bactérias, diferentemente do que em (d).

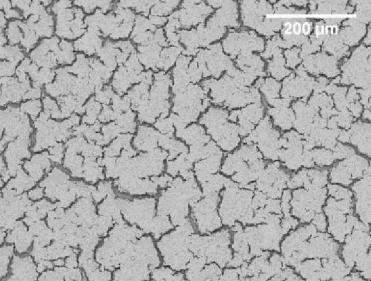
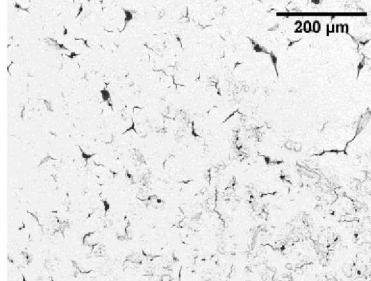
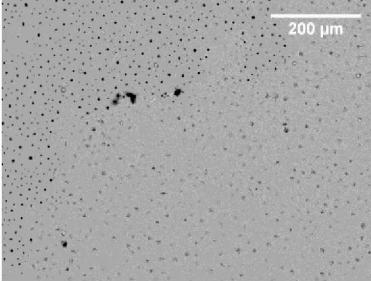
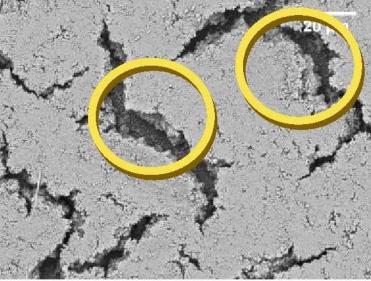
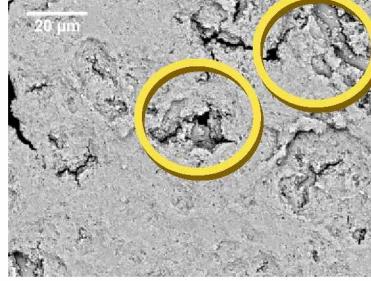
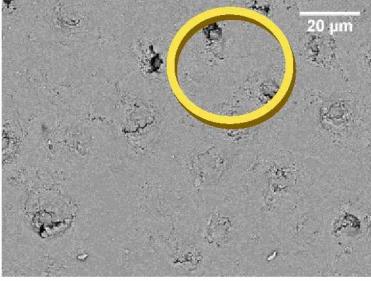
Essa mesma percepção não pode ser facilmente observada, quando o ensaio foi repetido. No Quadro 14 são apresentadas as imagens referentes ao segundo ensaio dessa mesma exposição.

As imagens (a), (b) e (c) do Quadro 14 apresentam-se com distinção. A imagem (a) com descontinuidade na topografia. A imagem (b) com descontinuidades, mas menos que em (a). Já a imagem (c), apresenta uma superfície mais homogênea. Por essas observações, indicam que a amostra que teve um melhor desempenho no segundo ensaio, foi a RR0.

Entretanto, ao se observar as imagens (d), (e) e (f) do Quadro 14, percebe-se que apesar de a superfície da amostra RR0 (a), apresentar mais descontinuidades nos biofilmes do que na amostra R1 (b), em (d) se percebe que a camada de biofilme formada na superfície em (a) é mais espessa que a formada em (b).

Isso se evidencia, ao observar a imagem (e) do Quadro 14, onde, nas regiões marcadas, identificam-se trechos da superfície do exemplar à mostra, diferente do que se vê nas regiões destacadas das imagens (d) e (f). Na imagem (d) ainda se consegue ver a superfície, mas devido ao sombreamento gerado, acredita-se que essa seja mais espessa que em (e). Já em (f) se observa apenas algumas pequenas descontinuidades na superfície.

Quadro 14 – Imagens da microscopia eletrônica de varredura do exemplar 3 contaminado com *Staphylococcus aureus* 25923 icaD+ (Duplicata)

Escuro - Exemplar 3		
RR0	R1	REFERÊNCIA
(a) 	(b) 	(c) 
(d) 	(e) 	(f) 
<i>Staphylococcus aureus</i> 25923 icaD+		

Fonte: Autor (2016)

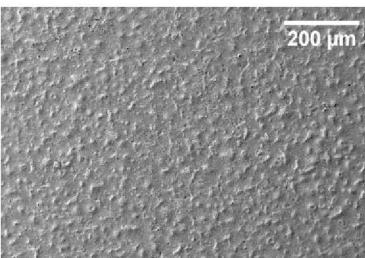
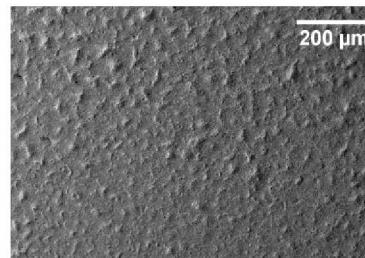
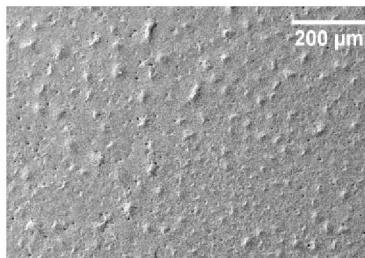
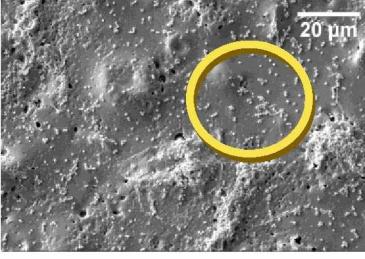
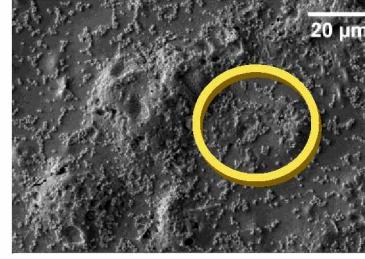
Isso evidencia que, para esse experimento a amostra R1 teve o melhor desempenho em relação a espessura da formação dos biofilmes, entretanto, quanto às descontinuidades, a amostra RR0 foi melhor.

4.3.4 EXPERIMENTO 4 - CONTAMINAÇÃO POR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* N 321 - EXPOSIÇÃO AO ESCURO

O Quadro 15 apresenta imagens dos exemplares das amostras após o ensaio microbiológico com a *Staphylococcus aureus* N 321, quando expostos ao escuro. Os mesmos estão divididos por amostras (RR0, R1 e REFERÊNCIA).

As imagens (a), (b) e (c) do Quadro 15, são imagens obtidas por microscopia, com uma magnificação de 300 vezes. Já as imagens (d), (e) e (f), também obtidas por microscopia, são apresentadas em magnificação de 2 500 vezes.

Quadro 15 – Imagens da microscopia eletrônica de varredura do exemplar 3 contaminado com *Staphylococcus aureus* N 321 (1º Ensaio)

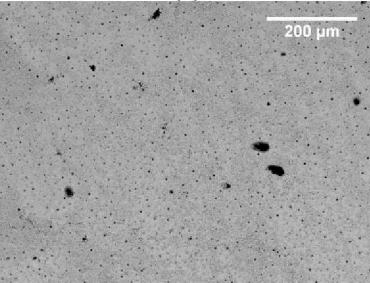
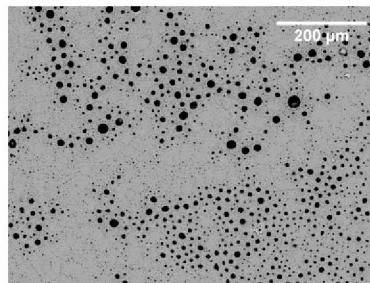
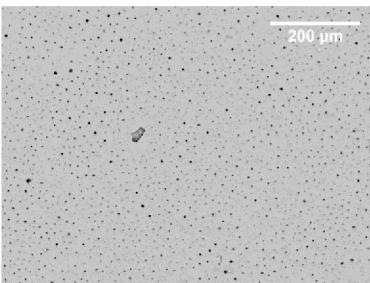
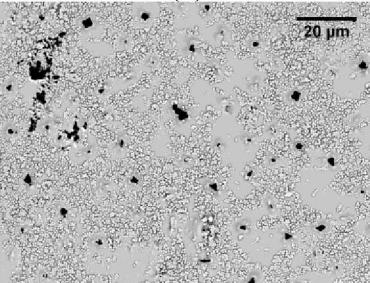
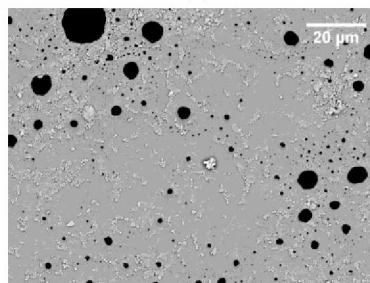
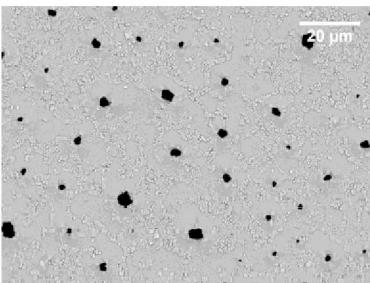
Escuro - Exemplar 3		
RR0	R1	REFERÊNCIA
(a) 	(b) 	(c) 
(d) 	(e) 	(f) 
<i>Staphylococcus aureus</i> N 321		

Fonte: Autor (2016)

Como pode ser observado pelas imagens (a), (b) e (c) do Quadro 15, os exemplares tiveram um desempenho próximo. A diferença só pode ser observada na imagem (f), por meio da amostra REFERÊNCIA que apresentou mais bactérias do que as amostras RR0 e R1. Também se percebe, nas regiões em destaque das imagens (d), (e) e (f) do Quadro 15, que a amostra RR0 apresentou melhor desempenho por apresentar menor densidade bacteriana.

Quando repetido o ensaio, foi constatado de modo diferente. Conforme se observa no Quadro 16, pelas imagens (d), (e) e (f), nota-se que o desempenho das amostras R1 foram melhores do que as RR0.

Quadro 16 – Imagens da microscopia eletrônica de varredura do exemplar 1 contaminado com *Staphylococcus aureus* N 321 (Duplicata)

Escuro - Exemplar 1		
RR0	R1	REFERÊNCIA
(a) 	(b) 	(c) 
(d) 	(e) 	(f) 
<i>Staphylococcus aureus</i> N 321		

Fonte: Autor (2016)

Para esta fase do ensaio, acredita-se que a amostra R1 tenha tido um desempenho superior, devido à proximidade com a RR0 no primeiro experimento e, quando repetido, tendo sido encontrado um desempenho melhor que a RR0.

Esse melhor desempenho da amostra R1, pode ser explicado por Maranhão (2009), o qual cita que as partículas devem ser nanométricas e que, a efetividade da fotocatálise está ligada com a dimensão do dióxido. Alguns trabalhos têm indicado que as partículas com dimensões de 15 nm apresentam as mais intensas atividades fotocatalíticas. De acordo com a caracterização do TiO₂ para este trabalho, a amostra R1 tem o dióxido com a dimensão mais próxima dos 15 nm, sendo de 18 nm.

O mesmo pode ser verificado em Banerjee *et al* (2006). Esse autor diz que uma das formas que podem melhorar a fotocatálise é quando se tem a redução do tamanho da partícula de TiO₂, sua área de superfície, aumenta levando a uma melhoria na fotoeficiência e, assim, na propriedade fotocatalítica, pois a área de superfície elevada tornaria a superfície da partícula mais ativa em relação a absorção de luz e água.

Portanto, conforme em dois dos quatro tipos de ensaios realizados na Etapa 3, as amostras RR0 e R1 apresentaram desempenhos semelhantes. Porém, adotou-se como sendo o TiO₂ o utilizado na amostra R1, para a Etapa 4.

4.4 ETAPA 4

Após a decisão do tipo de TiO₂ a ser usado, prosseguiu-se para a realização dos ensaios com os compósitos que continham o pó de vidro.

A quantidade de exemplares produzidas para esta etapa foi diferente. As mesmas estão descritas no Quadro 17. O ensaio foi realizado em triplicata, ou seja, após o 1º ensaio, foram feitos outros dois com as mesmas condições.

Quadro 17 – Etapa 4: composição das amostras e quantidade de exemplares

Amostra	Composição	Nº de Exemplares		
		1º Ensaio	Duplicata	Triplicata
8	Resina epóxi + 10% de TiO ₂ (R1) + 8% de pó de vidro	3	3	3
10	Resina epóxi + 10% de TiO ₂ (R1) + 10% de pó de vidro	3	3	3
12	Resina epóxi + 10% de TiO ₂ (R1) + 12% de pó de vidro	3	3	3
REFERÊNCIA	Resina epóxi	3	3	3

Fonte: Autor (2016)

Alguns problemas ocorreram durante o desenvolvimento desta etapa. Por um período de dois meses o procedimento experimental ficou parado, pois os equipamentos para a realização da microscopia eletrônica de varredura estavam indisponíveis para a aquisição de imagens dos exemplares.

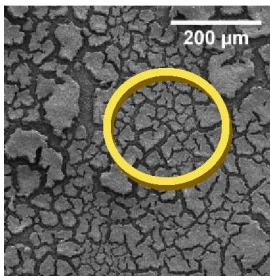
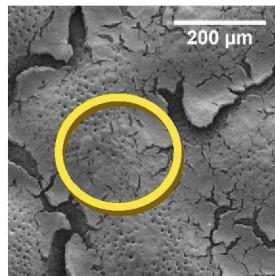
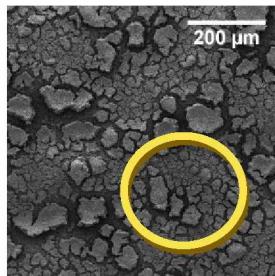
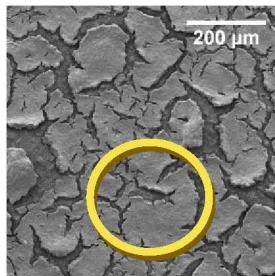
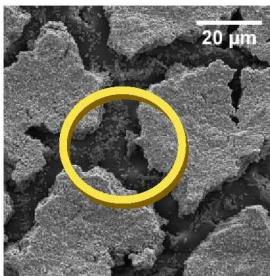
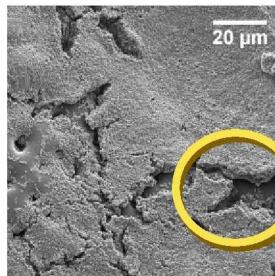
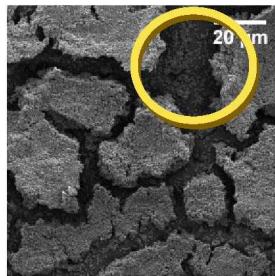
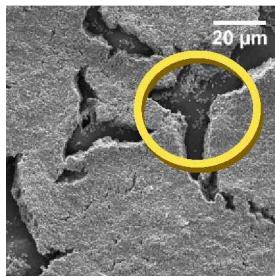
No preparo dos exemplares, como descrito na seção de materiais e métodos, deve-se esperar um período de 24 h para a cura dos mesmos, entretanto, isto não foi possível, pois quando um laboratório de microscopia se tornou disponível, teve-se de se realizar todo o procedimento experimental em 4 dias.

Desse modo, alguns exemplares permaneceram sem terminarem o seu processo de cura. Isso fez com que, no processo de esterilização, as superfícies dos exemplares das amostras 10 e 12 se tornassem mais rugosas. Como o cronograma já estava em atraso e existia a possibilidade de não conseguir agendar uma outra microscopia, decidiu-se prosseguir com o procedimento experimental. Assim, após o ensaio microbiológico, gerou-se as imagens aqui apresentadas.

As imagens do Quadro 18, são imagens obtidas por microscopia. As imagens (a) e (b), foram capturadas com magnificação de 350 vezes, e as imagens (c) e (d), com magnificação de 300 vezes. Essa diferença ocorreu devido a estas, serem as primeiras feitas e, assim, a magnificação ainda estava em testes, pois o equipamento é diferente do utilizado nas outras etapas. Já as imagens (e), (f), (g) e (h) são apresentadas em magnificação de 2 500 vezes.

Como se observa, as imagens (a) e (c) do Quadro 18 são parecidas. Temos regiões com formações de unidades de biofilmes descontínuas, se assemelhando a um “couro de jacaré”, como se observa nos círculos as destacando.

Quadro 18 – Imagens da microscopia eletrônica de varredura dos exemplares 3 contaminados com *Staphylococcus aureus* 25923 icaD+ (1º Ensaio)

AMOSTRAS (Exemplar 3)			
8	10	12	REFERÊNCIA
(a) 	(b) 	(c) 	(d) 
(e) 	(f) 	(g) 	(h) 

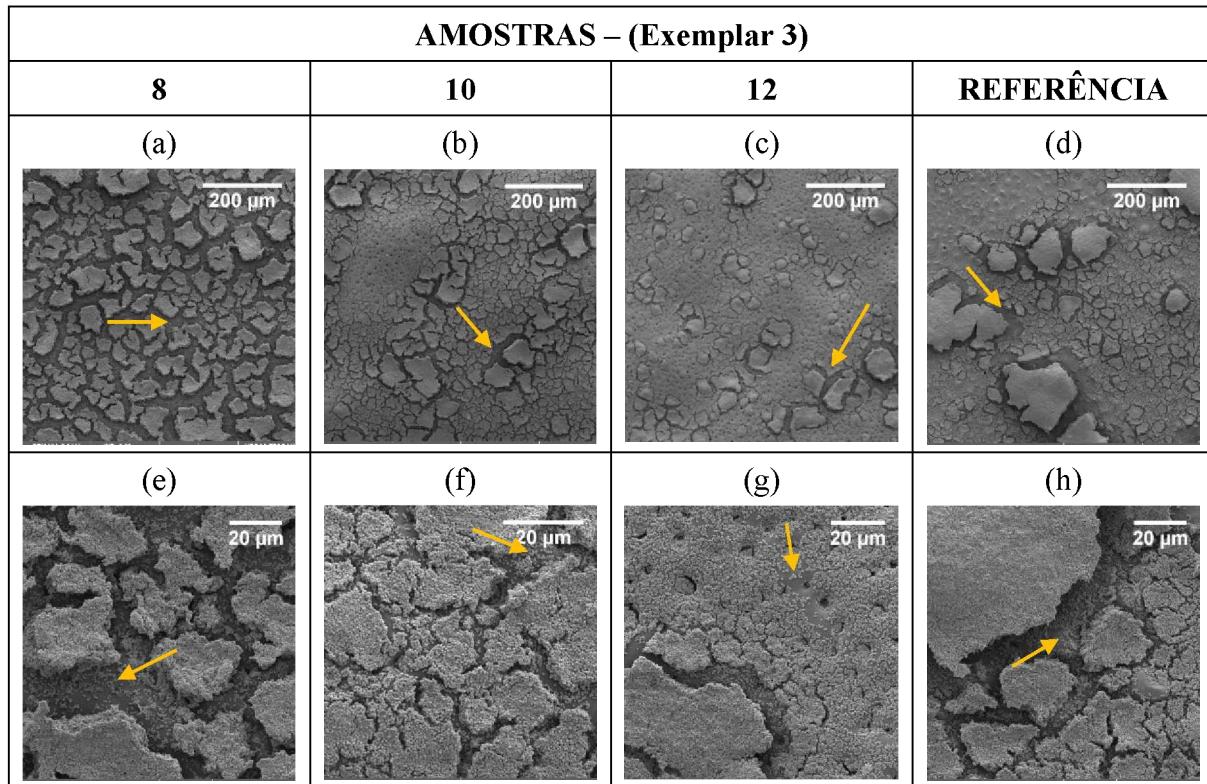
Fonte: Autor (2016)

Pode ser visto nas imagens (b) e (d) do Quadro 18, que os biofilmes formaram uma massa homogênea maior que em (a) e (c). Dentro de seus círculos é visto mais biofilmes, do que regiões de descontinuidade. Da mesma forma se percebe quando a magnificação é aumentada. Nas imagens (e) e (g) (Quadro 18), dentro dos círculos, tem-se regiões mais descontínuas do que nas imagens (f) e (h).

Quando o ensaio foi repetido, o padrão se alterou um pouco. Isso pode ser observado no Quadro 19.

As imagens (a) e (c) do Quadro 19 se mostram como as que tiveram o melhor desempenho. As imagens (b) e (d) apresentaram uma melhora no desempenho em relação ao 1º ensaio, a partir da observação da formação de regiões mais descontínuas de biofilmes e com menor espessura. Em todas as imagens vê-se a superfície do exemplar, como as setas indicam.

Quadro 19 – Imagens da microscopia eletrônica de varredura após ensaio microbiológico do exemplar 3 contaminado com *Staphylococcus aureus* 25923 iCaD+ (Duplicata)

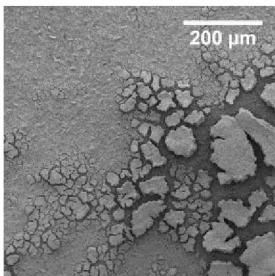
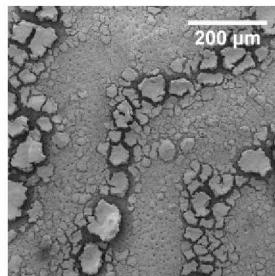
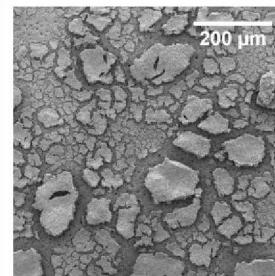
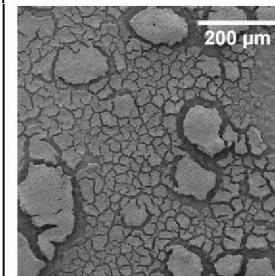
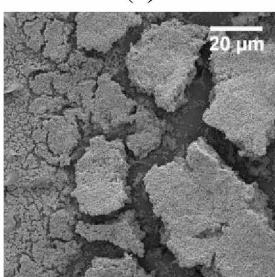
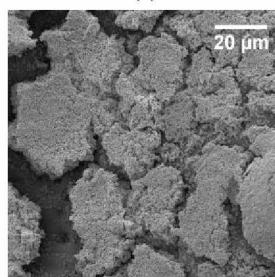
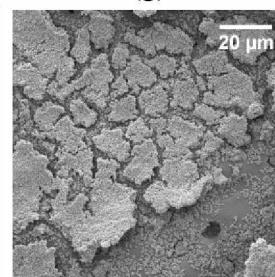
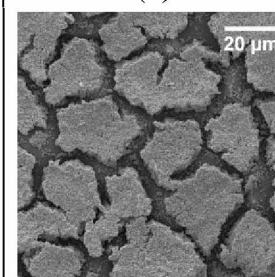


Fonte: Autor (2016)

Mesmo que a imagem (a) do Quadro 19 apresenta maiores descontinuidades entre os micro-organismos, os biofilmes da imagem (c) se mostram menos espessos, quando são comparadas as imagens (e) e (g). O mesmo pode ser visto para as mesmas imagens do Quadro 20.

O Quadro 20 apresenta imagens da microscopia do ensaio realizado em triplicata. Nota-se pelas imagens (c) e (g) que a amostra 12 gerou descontinuidades acentuadas nos biofilmes e espessuras menores. Diferentemente das amostras 8, 10 e de REFERÊNCIA, as quais geraram biofilmes mais espessos.

Quadro 20 – Imagens da microscopia eletrônica de varredura após ensaio microbiológico do exemplar 3 contaminado com *Staphylococcus aureus* 25923 icaD+ (Triplicata)

AMOSTRAS – (Exemplar 3)			
8	10	12	REFERÊNCIA
(a) 	(b) 	(c) 	(d) 
(e) 	(f) 	(g) 	(h) 

Fonte: Autor (2016)

Com essas últimas amostras, finalizou-se a realização dos ensaios microbiológicos e a obtenção de imagens por microscopia eletrônica de varredura para a pesquisa.

Mediante as análises de todas as imagens para a etapa 4, nota-se que as amostras 8 e 12 foram a que obtiveram o melhor desempenho. Ainda assim, a amostra 12 mostrou-se mais eficaz contra o surgimento dos biofilmes, pois, pelas imagens, observa-se que os biofilmes tiveram descontinuidades e possuem menor espessura.

4.5 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os compósitos foram expostos a contaminações de duas bactérias diferentes, *Staphylococcus aureus* 25923 icaD + (formadora de biofilme-controle positivo) e

Staphylococcus aureus N 321 (não formadora ou fracamente formadora de biofilme-controle negativo), esta última amostra clínica de Batistão (2014). Após as contaminações as amostras foram expostas à iluminação UV e no escuro (sem luz) e, em seguida, foram realizados os estudos de avaliação qualitativa das superfícies dos exemplares (pastilhas), através de imagem por microscopia eletrônica de varredura.

Depois de escolhido o TiO₂ (R1), foram definidas mais três composições formadas por resina epóxi, TiO₂ e pó de vidro. O teor de TiO₂ permaneceu fixo em 10% em massa e os teores de pó de vidro foram variados em 8%, 10% e 12% em massa. Todos os exemplares foram expostos à contaminação por *Staphylococcus aureus* 25923 icaD + e à iluminação UV. Da mesma forma, após a exposição foram realizados os estudos de imagem.

No estudo de imagens, verificou-se que os compósitos não impediram totalmente a formação de biofilmes, porém os biofilmes foram descontínuos e menos densos para as amostras R1 (resina epóxi + 10% de TiO₂ R1) e RR0 (resina epóxi + 10% de TiO₂ RR0), quando comparadas à de REFERÊNCIA (resina epóxi). Encontrou-se também, uma diferença entre os dois tipos de dióxidos testados (RR0 e R1), sendo que o R1 teve um desempenho mais uniforme em todas as amostras testadas, resultando em redução mais acentuada na formação de biofilme.

Em relação à exposição ao escuro, os exemplares contendo os dióxidos (RR0 e R1) apresentaram um desempenho superior aos exemplares que não os continham (de REFERÊNCIA), evidenciando eficiência mesmo na ausência de luz, não dependendo, portanto, da energia de “bandgap”. Mas, o desempenho em presença da iluminação UV foi superior comparado à exposição ao escuro.

Com a adição de pó de vidro - nas composições poliméricas formadas por resina epóxi e 10% de TiO₂ - constatou-se uma melhora no desempenho em desorganizar a formação dos biofilmes, tanto na continuidade quanto na espessura dos mesmos. Ao serem comparados com os compósitos que possuem apenas o TiO₂ (RR0 e R1) notou-se um aumento na inibição à formação dos biofilmes.

Os compósitos com 8% de pó de vidro, apresentaram resultados satisfatórios e com boa uniformidade. Em todas os exemplares testados, observou-se que os biofilmes foram descontínuos e menos espessos.

Já os compósitos com 10% de pó de vidro não mostraram esse desempenho favorável, pois apresentaram biofilmes com maior continuidade e espessura (equivalente ao compósito de REFERÊNCIA). Estima-se que esse comportamento tenha sofrido influência da maior rugosidade da superfície da pastilha (provavelmente devido à variação na viscosidade do compósito e/ou ao tempo insuficiente para a cura). Dessa forma, para confirmar esse comportamento seria necessário realizar outros experimentos com a mesma composição.

Com 12% de pó de vidro observou-se que as irregularidades na superfície das pastilhas foram menos acentuadas do que no compósito com 10% e o comportamento foi melhor do que do compósito com 10%. No entanto o comportamento foi equivalente ao com 8% com a vantagem de formação de biofilmes menos espessos do que neste percentual de 8%.

Com a variação no percentual, buscou-se conhecer se ocorreria uma saturação na adição de pó de vidro, mas os resultados obtidos não ofereceram condições para uma conclusão. Parece que a variável rugosidade (avaliada visualmente) atua favorecendo a formação de biofilmes e a taxa de pó de vidro atua em sentido contrário, mas somente com os resultados disponíveis não foi possível confirmar.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÃO

O objetivo geral desta pesquisa foi verificar a capacidade de inibir a formação de biofilmes, por meio da fotodegradação, utilizando formulações de um compósito polimérico, contendo dióxido de titânio (TiO_2) e um resíduo de vidro.

Para isso definiram-se inicialmente duas composições poliméricas formadas por resina epóxi e 10% de TiO_2 , onde foram variados os diâmetros das nanopartículas de TiO_2 (aqui nomeados de RR0 e R1), a fim de verificar qual dos dois dióxidos teria uma melhor resposta em impedir a formação do biofilme em sua superfície.

Com a metodologia adotada e os experimentos realizados neste trabalho, conclui-se que o compósito que apresentou o melhor desempenho, em relação a inibição da formação dos biofilmes em sua superfície, foi o com 10% do TiO_2 (R1), em massa e 12% de pó de vidro, em massa.

Em virtude dos problemas encontrados na fase experimental, o tempo disponível para a conclusão da pesquisa se esgotou, impossibilitando a realização de mais experimentos.

Conclui-se finalmente que a pesquisa atingiu os objetivos propostos, indicando o tipo de TiO_2 e a taxa de adição de po de vidro com melhor desempenho. A utilização do resíduo de vidro também pode ser vista como um diferencial positivo do ponto de vista da

sustentabilidade, ao indicar um possível caminho para o aproveitamento do material descartado na indústria.

Estudos posteriores são sugeridos no desenvolvimento de uma Tese de Doutorado, pois com uma dissertação não se consegue avaliar todas as variáveis envolvidas, devido à complexidade e o tempo necessário para se fazer todas essas avaliações e considerações. Desse modo, indica-se:

- Levar em conta as variáveis que influenciam na obtenção de superfícies lisas ou rugosas, como por exemplo, a precisão na constituição dos compósitos (massas precisas), tempo de mistura, temperatura e umidade relativa ambiente, umidade relativa, forma de preenchimento dos moldes e cura.
- Verificar o espalhamento do dióxido e do pó de vidro na superfície, é de suma importância;
- Avaliar quantitativamente a espessura dos biofilmes;
- Avaliar a exposição dos exemplares/pastilhas sem que as mesmas estejam imbebidas em meios de cultura, se assemelhando mais a situações reais;
- Variar o teor de dióxido acima de 10% e o de pó de vidro acima de 12%.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARCONIC ARCHITECTURAL PRODUCTS – Reynobond® with Ecoclean™. Disponível em: < https://www.arconic.com/bcs/aap_eastman/ecoclean/en/home.asp/>, acesso em 17 de Out. de 2016.

ALY, M.; HASHMI, M. S. J.; OLABI, A.G.; MESSEIRY, M.; ABADIR, E. F.; HUSSAIN, A. I. Effect of colloidal nano-silica on the mechanical and physical behaviour of waste-glass cement mortar. **Materials and Design**, 33 (2012), pp. 127–135

AMERICAN NATIONAL STANDARD ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF MEDICAL INSTRUMENTATION – ANSI/AAMI. ST 79: 2006.

ANDRADE, D.; ANGERAMI, E. L. S.; PADOVANI, C. R. Condição microbiológica dos leitos hospitalares antes e depois de sua limpeza. **Revista de Saúde Pública**. v. 34, n 2, p. 163-169, Abr., 2000.

ARCE, J. M. S.; AUAD, F. Y. A.; CABEZAS A. H.; Biofilms: a biological antimicrobial resistance system. **Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education**. Editado por A. MÉNDEZ-VILAS. v. 1, p. 61-67, 2013.

BANERJEE, S.; GOPAL, J.; MURALEEDHARAN, P.; TYAGI, A. K.; RAJ, B. Physics and chemistry of photocatalytic titanium dioxide: Visualization of bactericidal activity using atomic force microscopy. **Current Science**. v. 90, n 10, p. 1378-1383, mai., 2006.

BARROS, V. F. de A.; MENEZES, J. E. de; Análise estatística do risco de morte por infecção hospitalar em Goiânia. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental** (e-ISSN: 2236-1170). v. 8, nº 8, p. 1581-1590, Set.-Dez., 2012.

BASSLER, B. L.; LOSICK, R. Bacterially Speaking. **Cell**. v. 125, 2^a ed., p. 237-246, abr., 2006.

BATISTÃO, D. W. da F. Marcadores genéticos de risco para forte produção de biofilme em cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina e sua associação com o perfil clonal. 2014. 87p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.

BENABBOU, A. K.; DERRICHE, Z.; FELIX, C.; LEJEUNE, P.; GUILLARD, C. Photocatalytic inactivation of *Escherichia coli* Effect of concentration of TiO₂ and microorganism, nature, and intensity of UV irradiation. **Applied Catalysis B: Environmental**. v. 76, p. 257-263, mai., 2007.

BOYCE, J. M. Environmental contamination makes na importante contribution to hospital infection. **Journal of Hospital Infection**. v. 65, p. 50-54, 2007.

BOYCE, J. M.; PITTEL, D. Guideline for Hand Hygiene in Health-Care Settings. **Morbidity and Mortality Weekly Report**. v. 51, n RR16, out., 2002.

BRASIL. Segurança do paciente em serviços de saúde: limpeza e desinfecção de superfícies. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. 116 p. Brasília: Anvisa, 2010.

BRASIL. Panorama do Controle da Infecção Hospitalar no Brasil: o resultado de 20 anos de ações no país. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Apresentação de Slides, Formato PDF, 200-?.

BRASIL. Decreto-lei nº 9 431, de 6 de Janeiro de 1997. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 6 de jan. 1997.

BREATHNACH, A. S.; Nosocomial infections and infection control. **Medicine**. v. 41, 11^a ed., p. 649-653, Nov., 2013.

BREITBACH, A. de M.; GLEIZE, P. J. P. **Incorporação de TiO₂ em tinta para obtenção de propriedades auto-limpante e despoluidora**. 2011.

CABARKAPA, J.; LEVIC, J.; DJURAGIC, O. Biofilm. **Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education**. Editado por A. MÉNDEZ-VILAS. v. 1, p. 42-51, 2013.

CALLISTER, W. D. **Materials science and engineering: an introduction**. John Wiley & Sons, Inc., 7^a ed., 974 p., 2007.

CARNEIRO, J. O.; TEIXEIRA, V.; PORTINHA, A.; MAGALHÃES, A.; COUTINHO, P.; TAVARES, C. J.; NEWTON, R. Iron-doped photocatalytic TiO₂ sputtered coatings on plastics for self-cleaning applications. **Materials Science and Engineering B**. v. 138, n 2, p. 144-150, mar., 2007.

CARNEIRO, L. A. V.; TEIXEIRA, A. M. A. J.. Aplicações de Materiais Compósitos de Resina e Fibras na Engenharia de Construção. **Revista Militar de Ciência e Tecnologia**, v. XXVI, p. 45-60, 2009.

CARVALHO, K. S. **Contaminação de superfícies em enfermarias de pacientes com infecções por *Staphylococcus aureus* no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia**. 2005. 48 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em

Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005.

CERCA, N.; MARTINS, S.; SILLANKORVA, S.; JEFFERSON, K. K.; PIER, G. B.; OLIVEIRA, R.; AZEREDO, J. Effects of Growth in the Presence of Subinhibitory Concentrations of Dicloxacillin on *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* Biofilms. **American Society for Microbiology**. v. 71, n 12, p. 8677-8682, set., 2005.

CHEN, J.; POON, C.-S. Photocatalytic activity of titanium dioxide modified concrete materials – Influence of utilizing recycled glass cullets as aggregates. **Journal of Environmental Management**. v. 90, n 11, p. 3436-3442, ago., 2009.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nature Reviews Drug Discovery**. v. 2, n 2, p. 114-122, fev., 2003.

DAVIES, D. G.; PARSEK, M. R.; PEARSON, J. P.; IGLEWSKI, B. H.; COSTERTON, J. W.; GREENBERG, E. P. The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm. **American Association for the Advancement of Science**. v. 280, n 5361, p. 295-298, abr., 1998.

DIEBOLD, U. The surface science of titanium dioxide. **Surface Science Reports**. v. 48, n 5-8, p. 53-229, jan., 2003.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W.; Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 15, n 2, p. 167-193, Apr., 2002.

ENVIRONMENTAL & PUBLIC HEALTH CONSULTANTS – (EHA). Nosocomial Infections & Hospital Acquired Illnesses – Overview. Disponível em: <<http://www.ehagroup.com/epidemiology/nosocomial-infections/>>, acesso em 14 de Jun. de 2015.

EPSTEIN, A. L.; HOCHBAUM, A. I.; KIM, P.; AIZENBERG, J.; Control of bacterial biofilm growth on surfaces by nanostructural mechanics and geometry. **Nanotechnology**. v. 22, n 49, 8 p., dez., 2011.

ETACHERI, V.; SEERY, M.; HINDER, S.; MICHLITS, G.; PILLAI, S. A highly efficient TiO₂-XCx nano-heterojunction photocatalyst for visible-light induced antibacterial applications. **ACS Applied Materials & Interfaces** 5 (2013) 1663–1672.

FIGUEIREDO, D. A. **Fatores de risco associados à infecção hospitalar em uma Unidade de Terapia Intensiva**. 2012. 101 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Modelos de Decisão de Saúde da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012.

FLEMMING, H.-C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**. v. 8, n9, p. 623-633, set., 2010.

FLEMMING, H.-C.; NEU, T. R.; WOZNIAK, D. J. The EPS Matrix: The “House of Biofilm Cells”. **Journal of Bacteriology**. v. 189, n 22, p. 7945-7947, nov., 2007.

FUJISHIMA, A.; ZHANG, X.; TRYK, D. A. TiO₂ photocatalysis and related surface phenomena. **Surface Science Reports**. v. 63, 12^a ed., p. 515-582, dez., 2008.

HARPER, C. A. **Handbook of Plastics, Elastomers and Composites**. Ed. McGraw-Hill Inc., 4^a ed., Nova York, USA, 2004.

HOIBY, N.; CIOFU, O.; JOHANSEN, H. K.; SONG, Z.-J.; MOSER, C.; JENSEN, P. O.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M.; TOLKER-NIELSEN, T.; BJARNSHOLT, T. The clinical impact of bacterial biofilms. **International Journal of Oral Science.** v. 3, n 2, p. 55-65, abr., 2011.

HOIBY, N.; BJARNSHOLT, T.; GIVSKOV, M.; MOLIN, S.; CIOFU, O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents.** v. 35, n 4, p. 322-332, dez., 2009.

HORAN, T. C.; WHITE, J. W.; JARVIS, W. R.; EMORI, G.; CULVER, D. H.; MUNN, V. P.; THORNSBERRY, C.; OLSON, D. R.; HUGHES, J. M. Nosocomial Infection Surveillance. **Surveillance Summaries.** v. 35, p. 17-29, Dec., 1986.

IRIE, Y.; PARSEK, M. R.; Quorum Sensing and Microbial Biofilms. **Current Topics in Microbiology and Immunology.** v. 322, p. 67-84, 2008.

IRIE, H.; HASHIMOTO, K. Photocatalytic Active Surfaces and Photo-Induced High Hydrophilicity/High Hydrophobicity. **Environmental Photochemistry.** v. 2M, p. 425-450, set., 2005.

JENKINSON, H. F.; LAPPIN-SCOTT, H. M. Biofilms adhere to stay. **TRENDS in Microbiology.** v. 9, n 1, p. 9-10, jan., 2001.

KANEKO, M.; OKURA, I. Photocatalysis: science and technology. **Springer Berlin Heidelberg.** Science, 360 p., nov., 2002.

KERSTING, D. de F. Avaliação de Resinas Epóxi para Fabricação de Materiais Compósitos pelo processo de Pultrusão. 2004. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-

Graduação em Engenharia de Minas, Metallúrgica e de Materiais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

KHAN, H. A.; AHMAD, A.; MEHBOOB, R. Nosocomial infections and their control strategies. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. v. 5, 7^a ed., p. 509-514, jul., 2015.

KIM, K. Y.; FRANK, J. F. Effect of Nutrients on Biofilm Formation by *Listeria monocytogenes* on Stainless Steel. **Journal of Food Protection**. v. 58, n 1, p. 24-28, fev., 1994.

KLEVENS, R. M.; EDWARDS, J. R.; RICHARDS, C. L. Jr.; HORAN, T. C.; GAYNES, R. P.; POLLOCK, D. A.; CARDO, D. M. Estimating Health Care-Associated Infections and Deaths in U.S. Hospitals. **Public Health Reports**. v. 122, p. 160-163, Mar.-Abr., 2007.

KOSTAKIOTI, M.; HADJIFRANGISKOU, M.; HULTGREN, S. J. Bacterial Biofilms: Development, Dispersal, and Therapeutic Strategies in the Dawn of the Postantibiotic Era. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**. v. 3, n 4, 23 p., abr., 2013.

LEVY, C. E. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde**. Editora Agência Nacional de Vigilância Sanitária – 1^a ed., Brasília, 2004.

LIMA, A. C. A. C. de; ROCHA, G. S. da; KONAGANO, N. Y. H. A utilização de plásticos na construção civil. XL Congresso Brasileiro de Educação em Engenharia COBENGE, Belém, 2012.

MACLEAN, M.; MACGREGOR, S. J.; ANDERSON, J. G.; WOOSLEY, G. A. The role of oxygen in the visible-light inactivation of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 92, p. 180-184, jun., 2008.

MANESS, P.-C.; SMOLINSKI, S.; BLAKE, D. M.; HUANG, Z.; WOLFRUM, E. J.; JACOBY, W. A. Bactericidal Activity of Photocatalytic TiO₂ Reaction: toward an Understanding of Its Killing Mechanism. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 65, n 9, p. 4094-4098, set., 1999.

MARANHÃO, F. L. **Método para redução de mancha nas vedações externas de edifícios**. 2009. 107 p. Tese (Doutorado) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, Departamento de Engenharia de Construção Civil. São Paulo, 2009.

MARTINS, J. A. L. G. **Estudo da capacidade fotodegradante de um compósito à base de TiO₂ frente à bactéria Staphylococcus aureus**. 2013. 80 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.

MCFEE, R. B. Nosocomial or Hospital-acquired Infections: An Overview. **Disease-a-Month**. v. 55, 7^a ed., p. 422-438, jul., 2009.

MCLANDSBOROUGH, L.; RODRIGUES, A.; PÉREZ-CONEZA, D.; WEISS, J. Biofilms: At the Interface between Biophysics and Microbiology. **Food Biophysics**. v. 1, 2^a ed., p. 94-114, jun., 2006.

MELO, W. de C. M. A. de. Fotoinativação Seletiva dos Micro-organismos: *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. 2014. 135 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia da Escola de Engenharia de São Carlos, São Carlos, 2014.

MELO, W. C. M. A.; PERUSSI, J. R. Strategies to overcome biofilm resistance. **Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education.** Editado por A. MÉNDEZ-VILAS. v. 1, p. 179-187, 2013.

MELO, G. B.; MELO, M. C.; CARVALHO, K. S.; GONTIJO FILHO, P. P. *Staphylococcus aureus* e estafilococos coagulase negativos resistentes à vancomicina em um Hospital Universitário Brasileiro. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada.** v. 30, p. 55-61, jun., 2009.

MENOITA, E.; SANTOS, V.; TESTAS, C.; GOMES, C.; SANTOS, A. S. Biofilmes: Conhecer a verdade. **Journal Of Aging And Innovation.** v. 1, n 3, jul., 2012.

MITORAJ, D.; JANCZYK, A.; STRUS, M.; KISCH, H.; STOCHEL, G.; HECZKO, P. B.; MACYK, W. Visible light inactivation of bacteria and fungi by modified titanium dioxide. **Photochemical & Photobiological Sciences** (2007) 6(6) – 642 – 8

MONDS, R. D.; O'TOOLE, G. A. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. **TRENDS in Microbiology.** v. 17, n 2, p. 73-87, fev., 2009.

MOTA, V. de S.; TURRINI, R. N. T.; PROVEDA, V. de B. Atividade antimicrobiana do óleo de *Eucalyptus globulus*, xilitol e papaína: estudo piloto. **Revista da Escola de Enfermagem da USP.** v. 49, p. 216-220, Dez., 2015.

MOURÃO, D. K. Injeção de resinas em estruturas de concreto armado. 2010. 43 f. Monografia (Especialização) – Especialização em Construção Civil - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

NAKATA, K.; FUJISHIMA, A. TiO₂ photocatalysis: Design and applications. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**. v. 13, n 3, p. 169-189, set., 2012.

NI, M.; LEUNG, M. K. H.; LEUNG, D. Y. C., SUMATHY, K. A review and recent developments in photocatalytic water-splitting using TiO₂ for hydrogen production. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**. v. 11, 3^a ed., p. 401-425, jan., 2005.

NOGUEIRA, R. F. P.; JARDIM, W. F. A fotocatálise heterogênea e sua aplicação ambiental. **Química Nova**. v. 21, n 1, p. 69-72, jul., 1997.

PASTERNAK, J. Biofilmes: um inimigo (in)visível. **Revista da Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação**. 39^a ed., p. 36-38, mar.-abr., 2009.

REIS, L. M. dos; RABELLO, B. R.; ROSS, C.; SANTOS, L. M. R. dos. Avaliação da atividade antimicrobiana de antissépticos e desinfetantes utilizados em um serviço público de saúde. **Revista Brasileira de Enfermagem**. v. 64, p. 870-875, Set.-Out., 2011.

RENDUELES, O.; GHIGO, J.-M. Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors. **Federation of European Microbiological Societies**. v. 36, n 5, p. 972-989, 2012.

RIBEIRO, A. O.; PERUZZI, A. P.; DIAS, J. F. Caracterização do resíduo de lapidação de vidro para incorporação em compósitos de cimento Portland. In: 56 CBC – Congresso Brasileiro do Concreto, 2014. Caderno de Resumos - 56 CBC. São Paulo: IBRACON, 2014, p. 169-169.

RIBEIRO, A. O. **Estudo de resíduo da lapidação de vidro para incorporação em argamassas de cimento Portland**. 2015. 86 f.: il. Dissertação (Mestrado) – Programa de

Pós-Graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015.

RINCON, A. G.; PULGARIN, C. Photocatalytical inactivation of *E. coli*: effect of (continuous-intermittent) light intensity and of (suspended-fixed) TiO₂ concentration. **Applied Catalysis B: Environmental**. v. 44, n 3, p. 263-284, fev., 2003.

SADOYAMA, G.; GONTIJO FILHO, P. P. Risk Factors for Methicillin Resistant and Sensitive *S. aureus* Infection in a Brazilian University Hospital. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 4, p. 135-143, 2000.

SAITO, T.; IWASE, T.; HORIE, J.; MORIOKA, T. Mode of photocatalytic bactericidal action of powdered semiconductor TiO₂ on mutans streptococci. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 14, n 4, p. 369-379, jul., 1992.

SANTOS, A. L. dos; SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C. de; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 43, n 6, p. 413-423, dez., 2007.

SILVEIRA, J. B. da. Preparação e caracterização de resina epóxi transparente dopada com nanoestruturas semicondutoras de CdS. 2009. 115 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira da Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2009.

SIMONSEN, M. E.; LI, Z.; SOGAARD, E. G. Influence of the OH Groups on the Photocatalytic Activity and Photoinduced Hydrophilicity of Microwave Assisted Sol-gel TiO₂ Film. **Applied Surface Science**. v. 255, 18^a ed., p. 8054-8062, jun., 2009.

SPASIANO, D.; MAROTTA, R.; MALATO, S.; FERNANDEZ-IBAÑES, P.; SOMMA, I. Di. Solar photocatalysis: Materials, reactors, some commercial, and pre-industrialized applications. A comprehensive approach. **Applied Catalysis B: Environmental**. vs. 170-171, p. 90-123, jul., 2015.

SUNADA, K.; WATANABE, T.; HASHIMOTO, K. Studies on photokilling of bacteria on TiO₂ thin film. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**. v. 156, p. 227-233, dez., 2002.

TARASZKIEWICZ, A.; FILA, G.; GRINHOLC, M.; NAKONIECZNA, J. Innovative Strategies to Overcome Biofilm Resistance. **BioMed Research International**. v. 2013, article ID 150653, 13 p., 2013.

TEIXEIRA, C. P. A. B.; JARDIM, W. F. Caderno Temático: **Processos Oxidativos Avançados – Conceitos teóricos**. Campinas: UNICAMP, 2004. v. 3, 83 p., ago., 2004.

TONET, K. G. Concreto polímero com resina reciclada de PET: influência na combustibilidade frente à adição de resíduos industriais. 2009. 153 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da Universidade do Vale do Rio dos Sinos – UNISINOS, São Leopoldo, RS, 2009.

ULLAH, S. Materiais nanoestruturados e filmes finos baseados em TiO₂ para aplicação em fotocatálise. 2014. 138 f. Tese (Doutorado) Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Carlos, São Carlos, 2014.

WADE, J. An investigation of TiO₂-ZnFe₂O₄ nanocomposites for visible light photocatalysis. 2005. 124 f. Graduate Theses and Dissertations (Master of Science) Department of Electrical Engineering – College of Engineering of University of South Florida, 2005.

XAVIER, J. B.; PICIOREANU, C.; ALMEIDA, J. S.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. **Boletim de Biotecnologia**. v. 76, p. 2-13, 2003.

YU, J. C. Deactivation and Regeneration of Environmentally Exposed Titanium Dioxide (TiO_2) Based Products. **Chemistry**. 21 p., 2003.

YURANOVA, T.; SARRIA, V.; JARDIM, W.; RENGIFO, J.; PULGARIN, C.; TRABESINGER, G.; KIWI, J. Photocatalytic discoloration of Organic Compounds on Outdoor Building Cement Panels Modified by Photoactive Coatings. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**. v. 188, 2^a e 3^a ed., p. 334-341, mai., 2007.

ZIOLLI, R. L.; JARDIM, W. F. P. Mecanismo de fotodegradação de compostos orgânicos catalisada por TiO_2 . **Química Nova na Escola**. v. 21, n. 3, jul., 1998.

APÊNDICE A

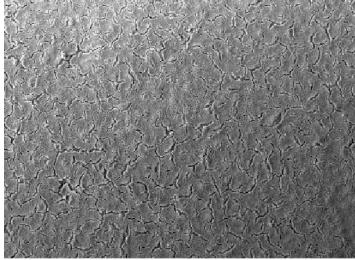
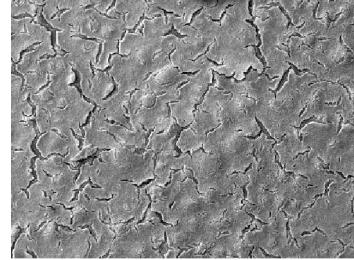
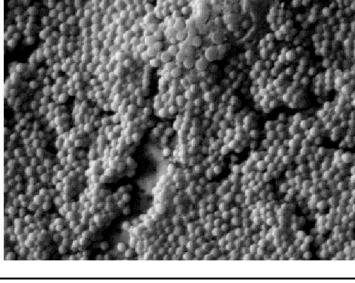
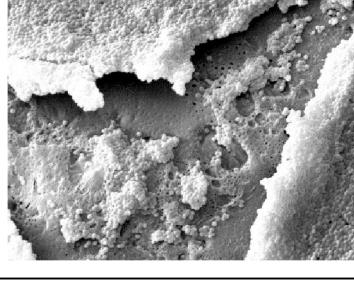
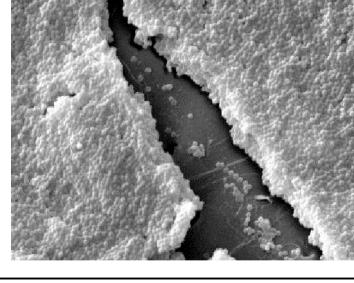
Neste apêndice, são apresentadas todas às imagens obtidas na realização de microscopias eletrônicas de varredura, para as etapas 3 e 4 do trabalho. Sendo assim, em A1, estão as imagens da etapa 3 e, em A2, as da etapa 4.

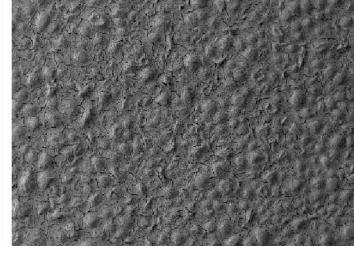
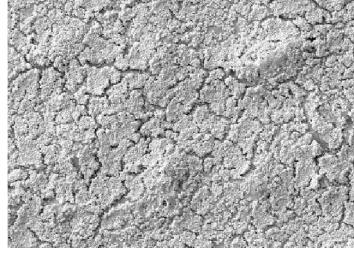
A.1 ETAPA 3

Os quadros estão dispostos de acordo com a exposição e contaminação, além de 1º Ensaio e Duplicata. Cada quadro apresenta um exemplar de cada amostra. Algumas magnificações estão diferentes.

A.1.1 1º ENSAIO - EXPOSIÇÃO À ILUMINAÇÃO UV

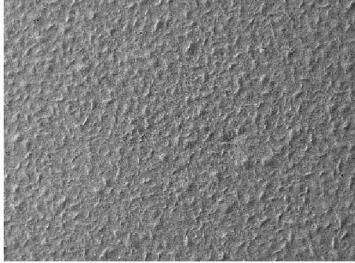
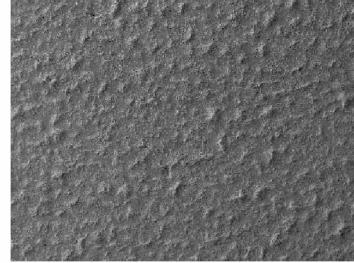
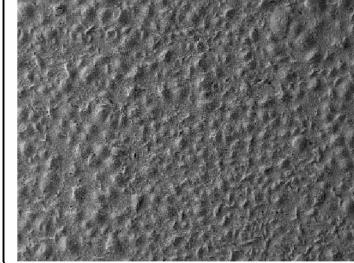
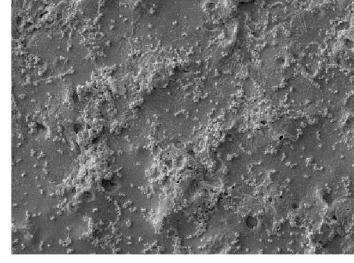
Iluminação UV - EXEMPLARES 1		
RR0	R1	REFERÊNCIA
<i>Staphylococcus aureus</i> 25923 icaD+		

Iluminação UV - EXEMPLARES 2		
RR0	R1	REFERÊNCIA
		
		
<i>Staphylococcus aureus</i> 25923 icaD+		

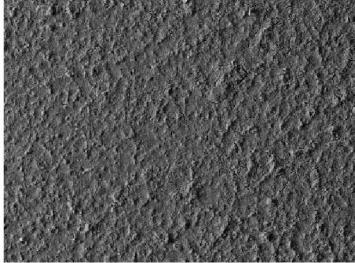
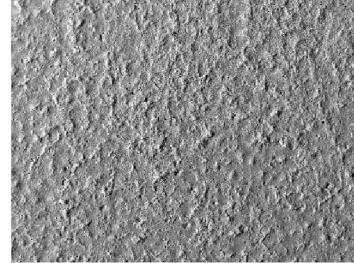
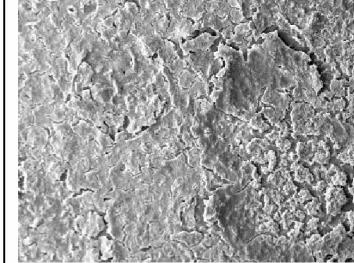
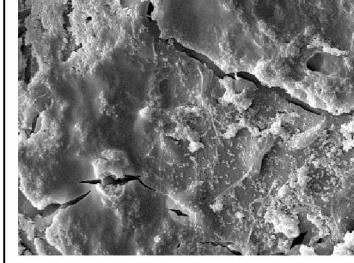
Iluminação UV - EXEMPLARES 3		
RR0	R1	REFERÊNCIA
		
		
<i>Staphylococcus aureus</i> 25923 icaD+		

Iluminação UV - EXEMPLARES 1		
RR0	R1	REFERÊNCIA
<i>Staphylococcus aureus</i> N 321		

Iluminação UV - EXEMPLARES 2		
RR0	R1	REFERÊNCIA
<i>Staphylococcus aureus</i> N 321		

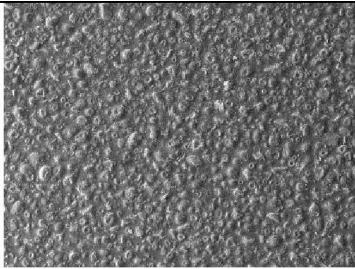
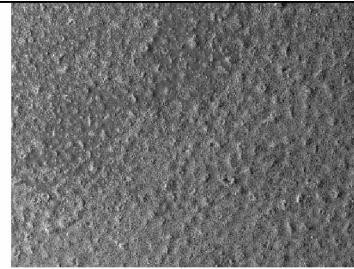
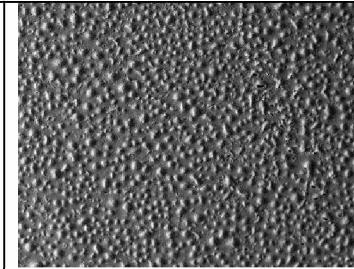
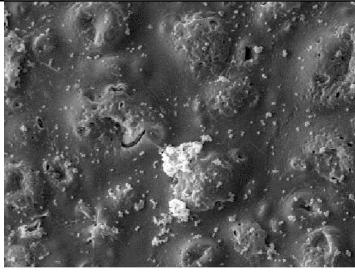
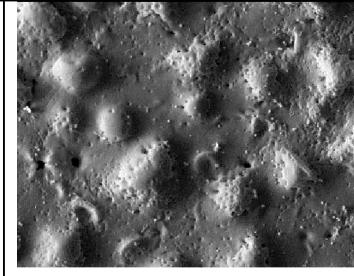
Iluminação UV - EXEMPLARES 3		
RR0	R1	REFERÊNCIA
		
		
<i>Staphylococcus aureus</i> N 321		

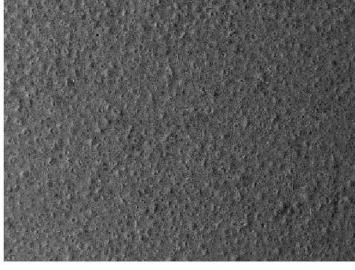
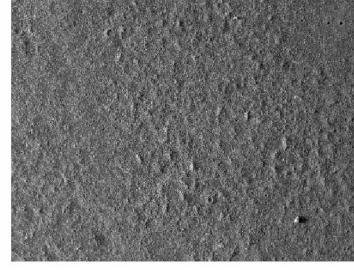
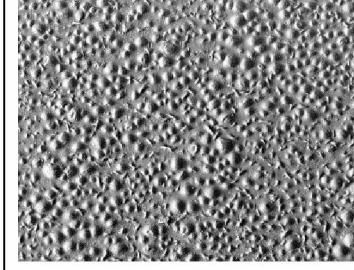
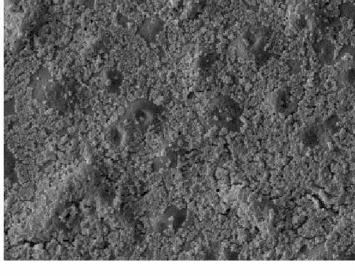
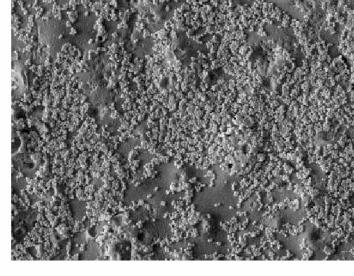
A.1.2 1º ENSAIO – EXPOSIÇÃO AO ESCURO

Escuro - EXEMPLARES 1		
RR0	R1	REFERÊNCIA
		
		
<i>Staphylococcus aureus</i> 25923 icaD+		

Escuro - EXEMPLARES 2		
RR0	R1	REFERÊNCIA
<i>Staphylococcus aureus</i> 25923 icaD+		

Escuro - EXEMPLARES 3		
RR0	R1	REFERÊNCIA
<i>Staphylococcus aureus</i> 25923 icaD+		

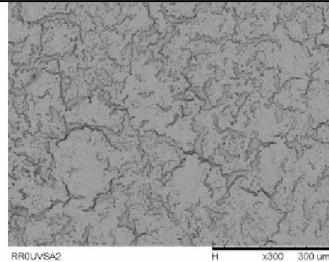
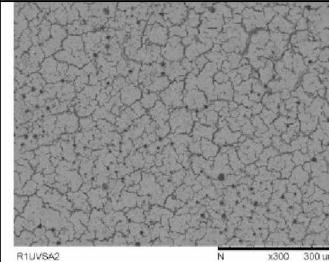
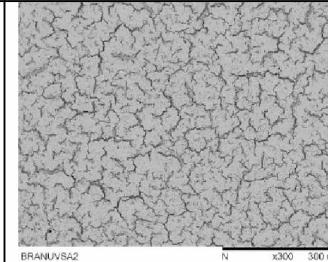
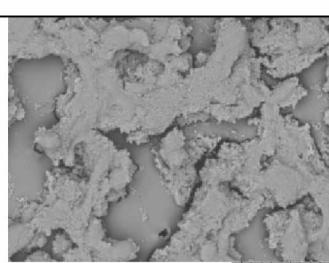
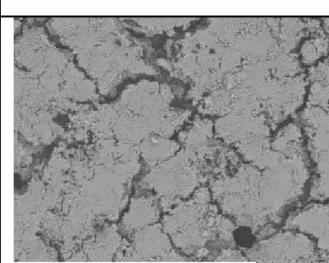
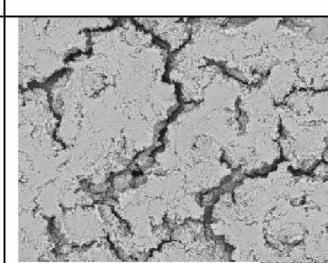
Escuro - EXEMPLARES 1		
RR0	R1	REFERÊNCIA
		
		
<i>Staphylococcus aureus</i> N 321		

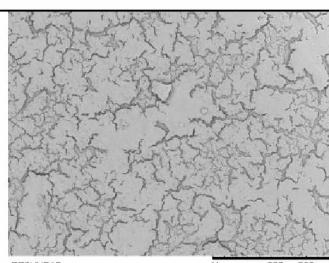
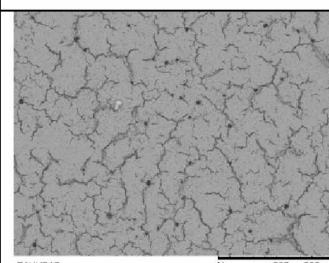
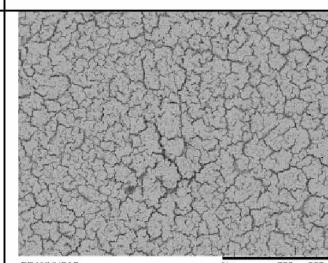
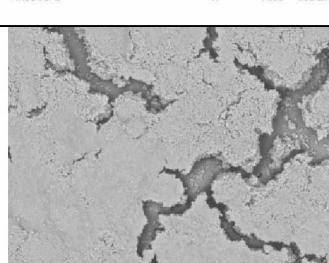
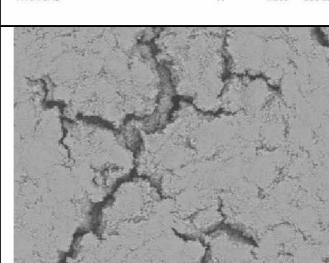
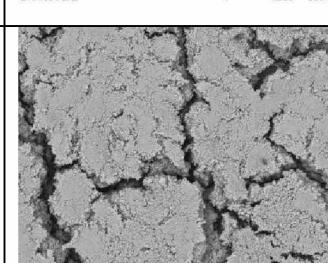
Escuro - EXEMPLARES 2		
RR0	R1	REFERÊNCIA
		
		
<i>Staphylococcus aureus</i> N 321		

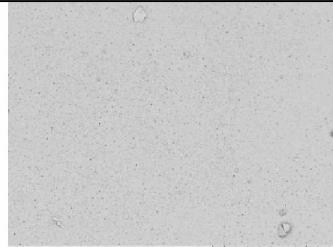
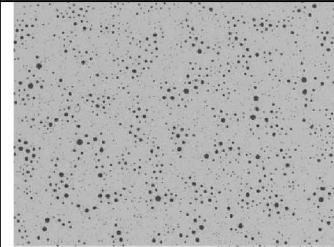
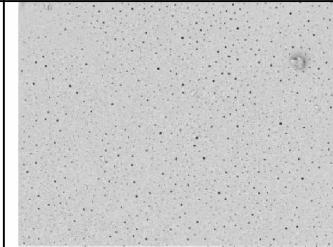
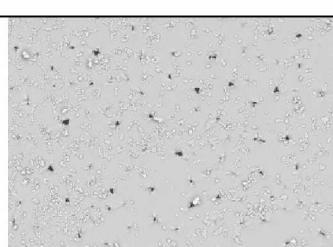
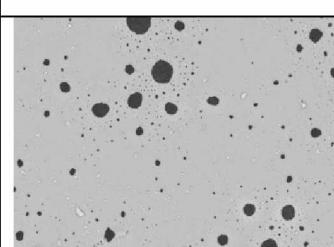
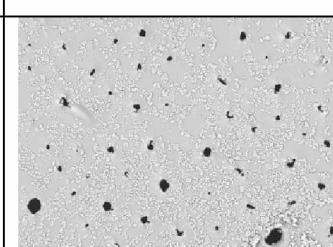
Escuro - EXEMPLARES 3		
RR0	R1	REFERÊNCIA
<i>Staphylococcus aureus</i> N 321		

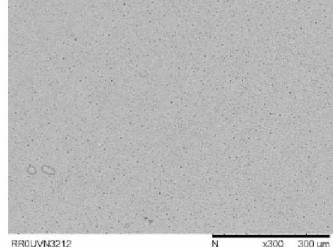
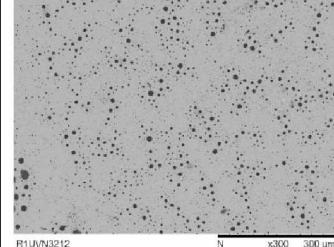
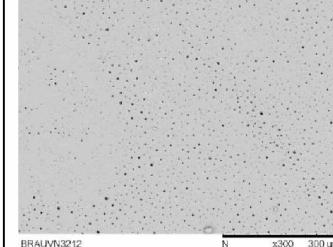
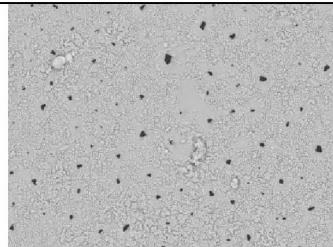
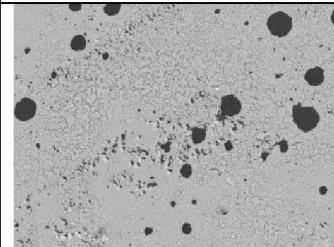
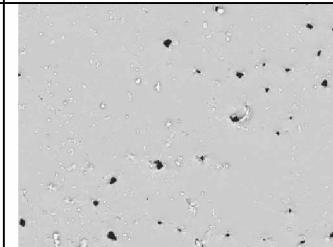
A.1.3 DUPLICATA – EXPOSIÇÃO À ILUMINAÇÃO UV

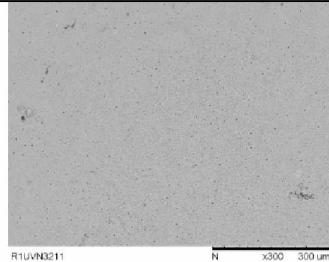
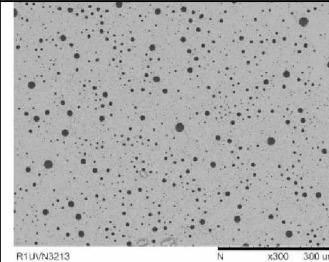
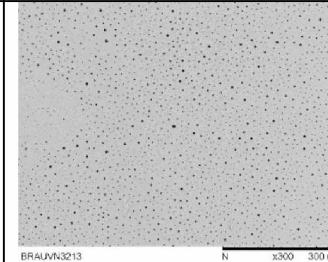
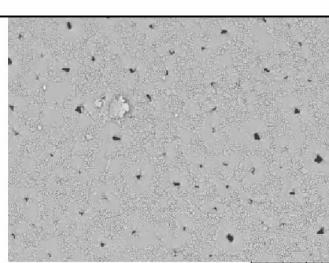
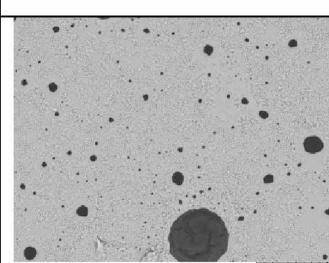
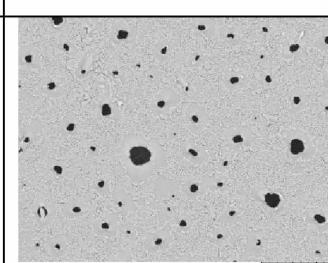
Iluminação UV - EXEMPLARES 1		
RR0	R1	REFERÊNCIA
Tool_8 H x300 300 µm	R1UVSA1 N x300 300 µm	BRANUVSA1 N x300 300 µm
Tool_8 H x2.5k 30 µm	R1UVSA1 N x2.0k 30 µm	BRANUVSA1 N x2.0k 30 µm
<i>Staphylococcus aureus</i> 25923 icaD+		

Iluminação UV - EXEMPLARES 2		
RR0	R1	REFERÊNCIA
		
		
<i>Staphylococcus aureus</i> 25923 icaD+		

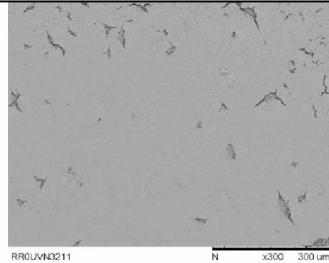
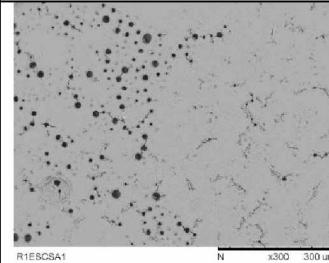
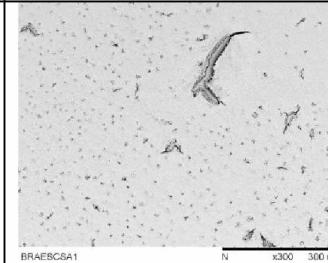
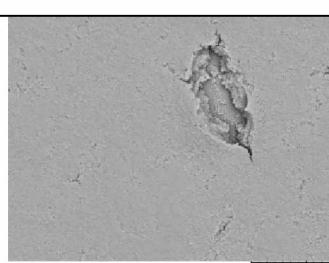
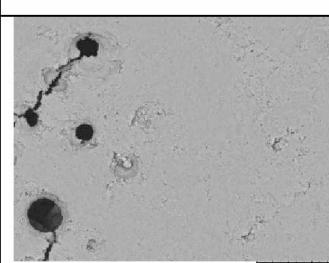
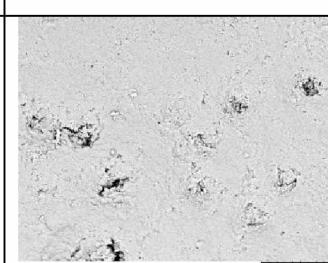
Iluminação UV - EXEMPLARES 3		
RR0	R1	REFERÊNCIA
		
		
<i>Staphylococcus aureus</i> 25923 icaD+		

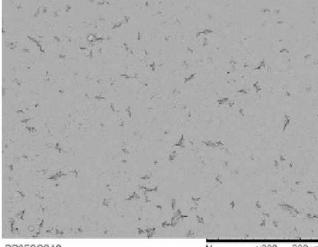
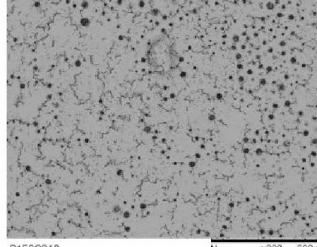
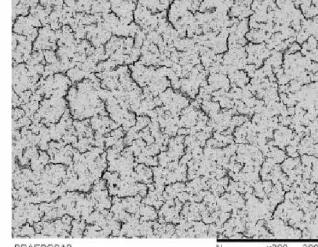
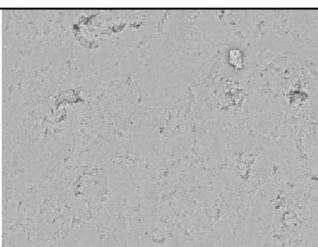
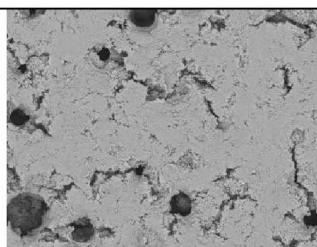
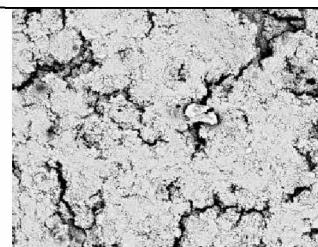
Iluminação UV - EXEMPLARES 1		
RR0	R1	REFERÊNCIA
		
RR0UVN3211 N x300 300 µm	R1UVN3211 N x300 300 µm	BRAUVN321 N x300 300 µm
		
RR0UVN3211 N x2.0k 30 µm	R1UVN3211 N x2.0k 30 µm	BRAUVN321 N x2.0k 30 µm
<i>Staphylococcus aureus N 321</i>		

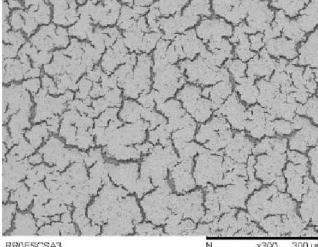
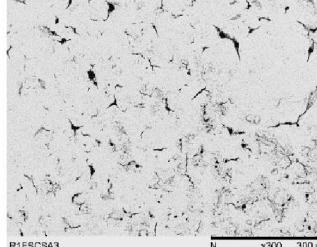
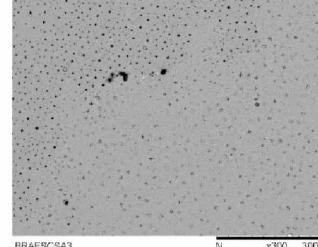
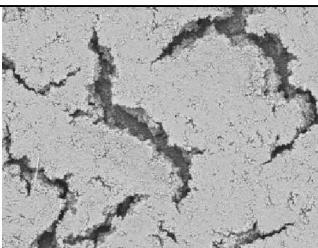
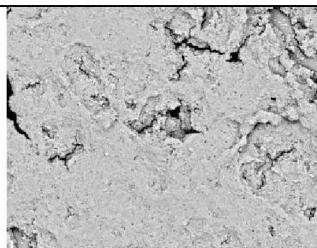
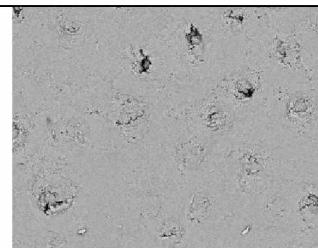
Iluminação UV - EXEMPLARES 2		
RR0	R1	REFERÊNCIA
		
RR0UVN3212 N x300 300 µm	R1UVN3212 N x300 300 µm	BRAUVN3212 N x300 300 µm
		
RR0UVN3212 N x2.0k 30 µm	R1UVN3212 N x2.0k 30 µm	BRAUVN3212 N x2.0k 30 µm
<i>Staphylococcus aureus N 321</i>		

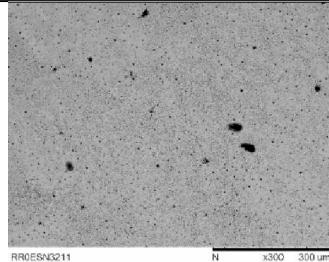
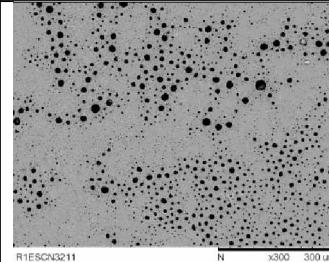
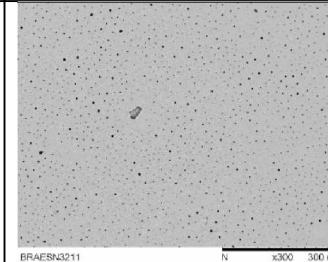
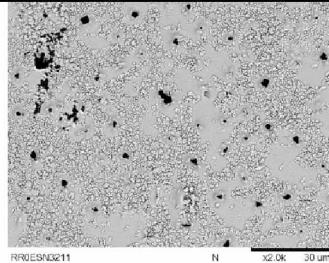
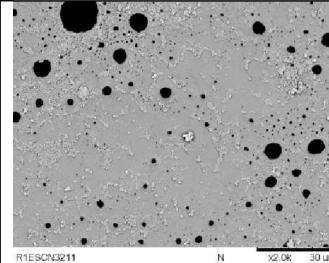
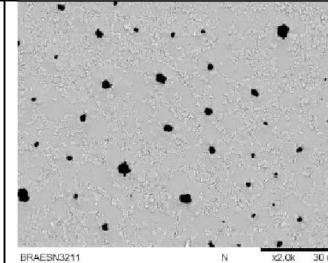
Iluminação UV - EXEMPLARES 3		
RR0	R1	REFERÊNCIA
		
		
<i>Staphylococcus aureus</i> N 321		

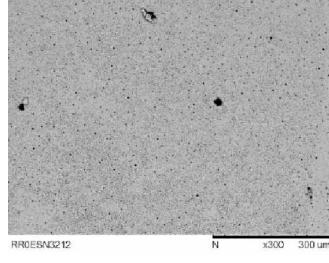
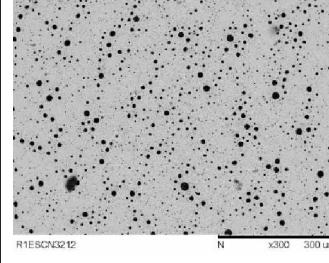
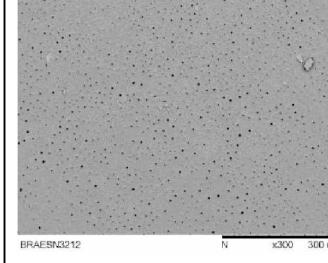
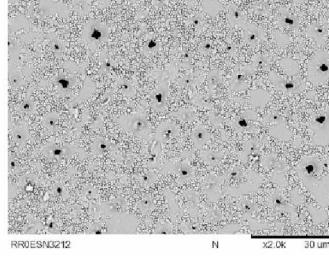
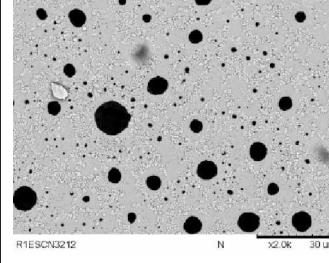
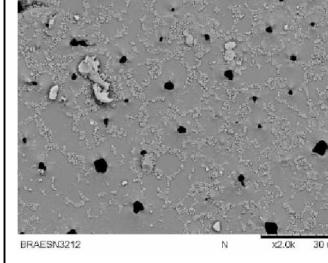
A.1.4 DUPLICATA – EXPOSIÇÃO AO ESCURO

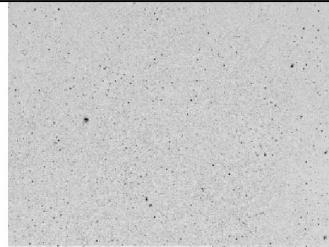
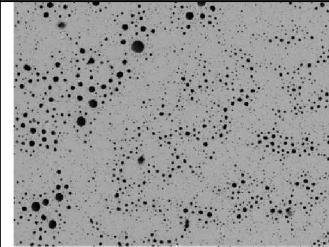
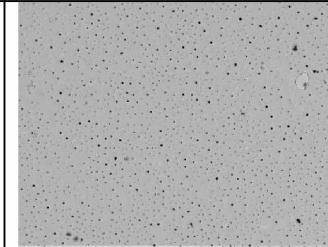
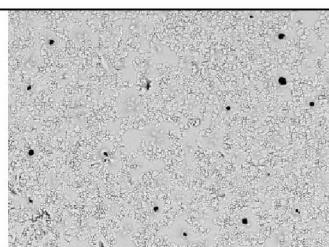
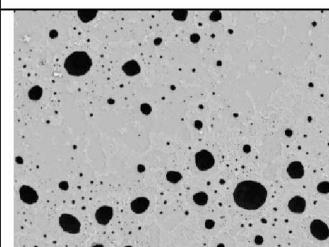
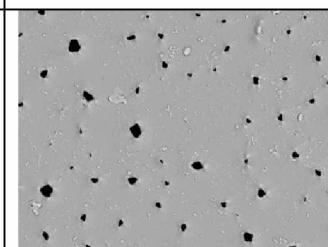
Escuro - EXEMPLARES 1		
RR0	R1	REFERÊNCIA
		
		
<i>Staphylococcus aureus</i> 25923 icaD+		

Escuro - EXEMPLARES 2		
RR0	R1	REFERÊNCIA
		
		
<i>Staphylococcus aureus 25923 icaD+</i>		

Escuro - EXEMPLARES 3		
RR0	R1	REFERÊNCIA
		
		
<i>Staphylococcus aureus 25923 icaD+</i>		

Escuro - EXEMPLARES 1		
RR0	R1	REFERÊNCIA
		
		
<i>Staphylococcus aureus N 321</i>		

Escuro - EXEMPLARES 2		
RR0	R1	REFERÊNCIA
		
		
<i>Staphylococcus aureus N 321</i>		

Escuro - EXEMPLARES 3		
RR0	R1	REFERÊNCIA
 RR0ESCN3213 N x300 300 µm	 R1ESCN3212 N x300 300 µm	 BRAESN3213 N x300 300 µm
 RR0ESCN3213 N x2.0k 30 µm	 R1ESCN3213 N x2.0k 30 µm	 BRAESN3213 N x2.0k 30 µm

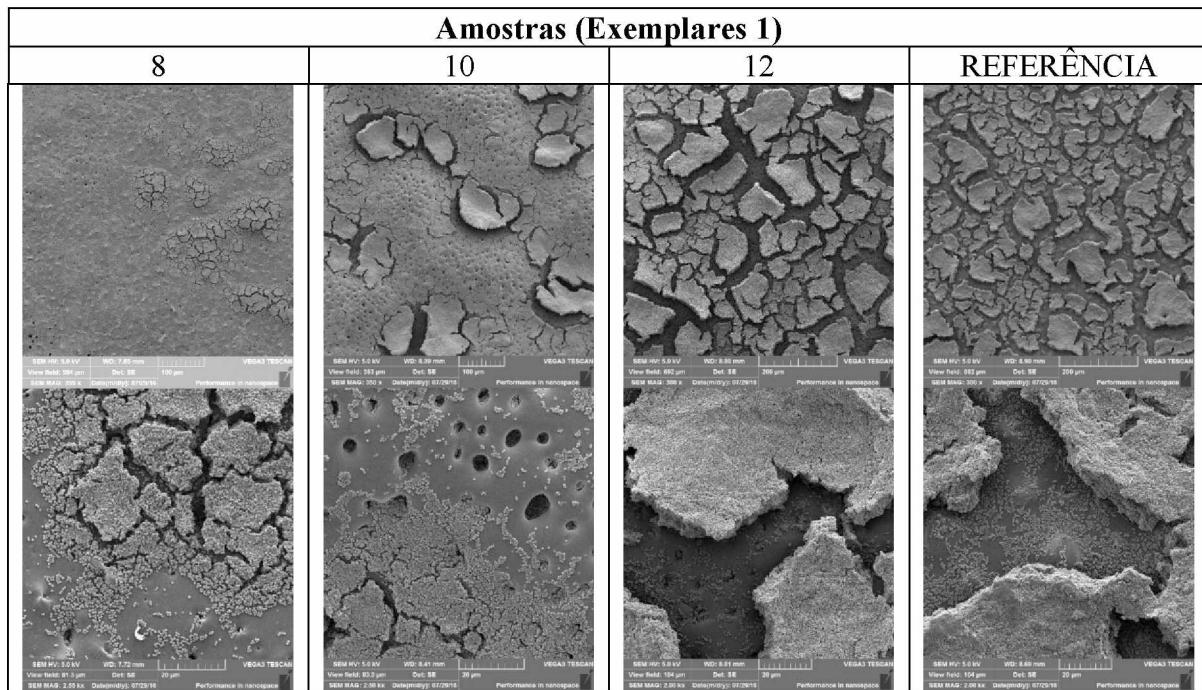
Staphylococcus aureus N 321

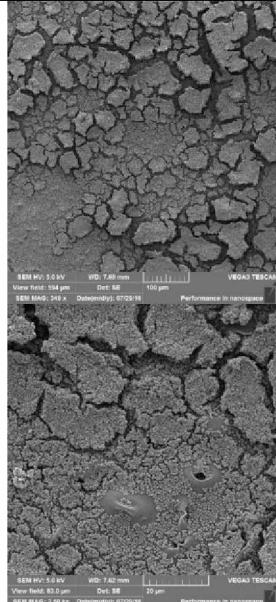
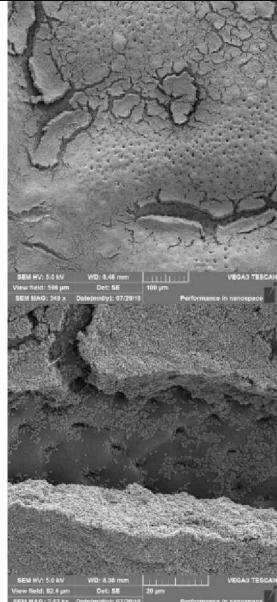
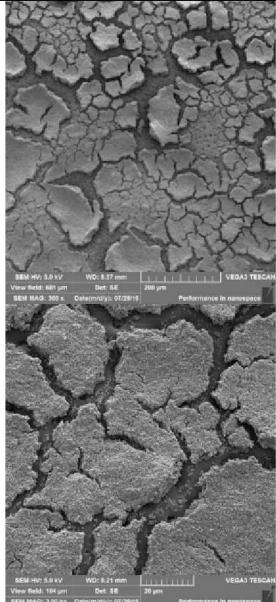
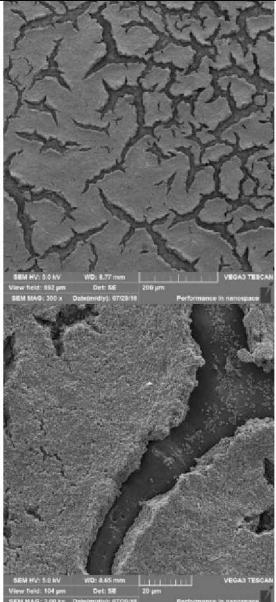
A.2 ETAPA 4

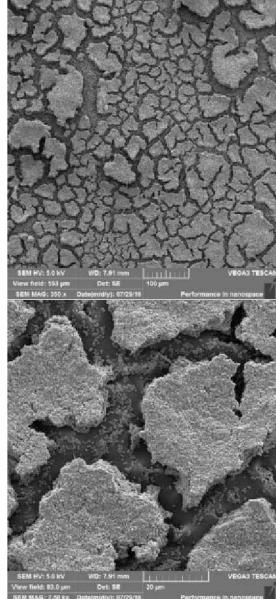
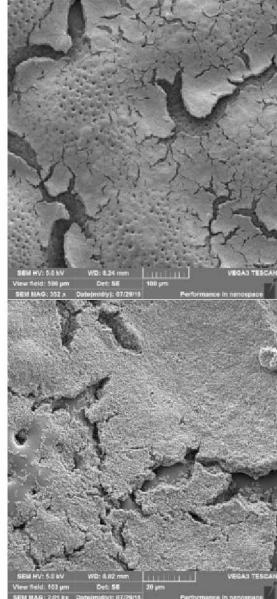
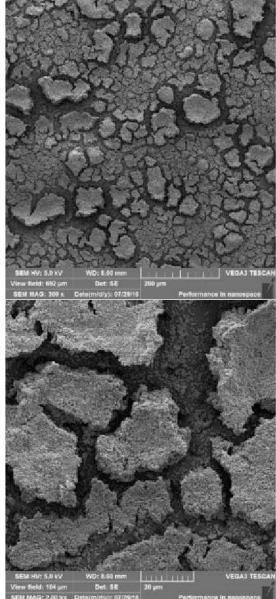
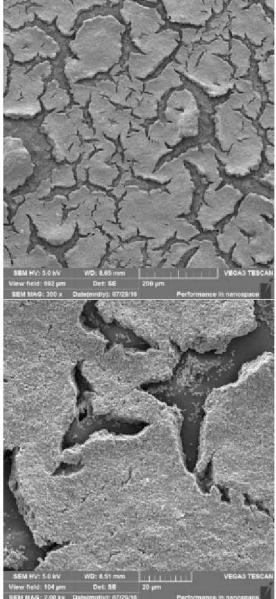
Os quadros estão dispostos de acordo com a realização dos ensaios, como: 1º Ensaio, Duplicata e Triplicata. Cada quadro apresenta um exemplar de cada amostra.

Na etapa 4, realizou-se apenas um experimento, sendo o mesmo repetido duas vezes. As imagens são apresentadas nos quadros a seguir.

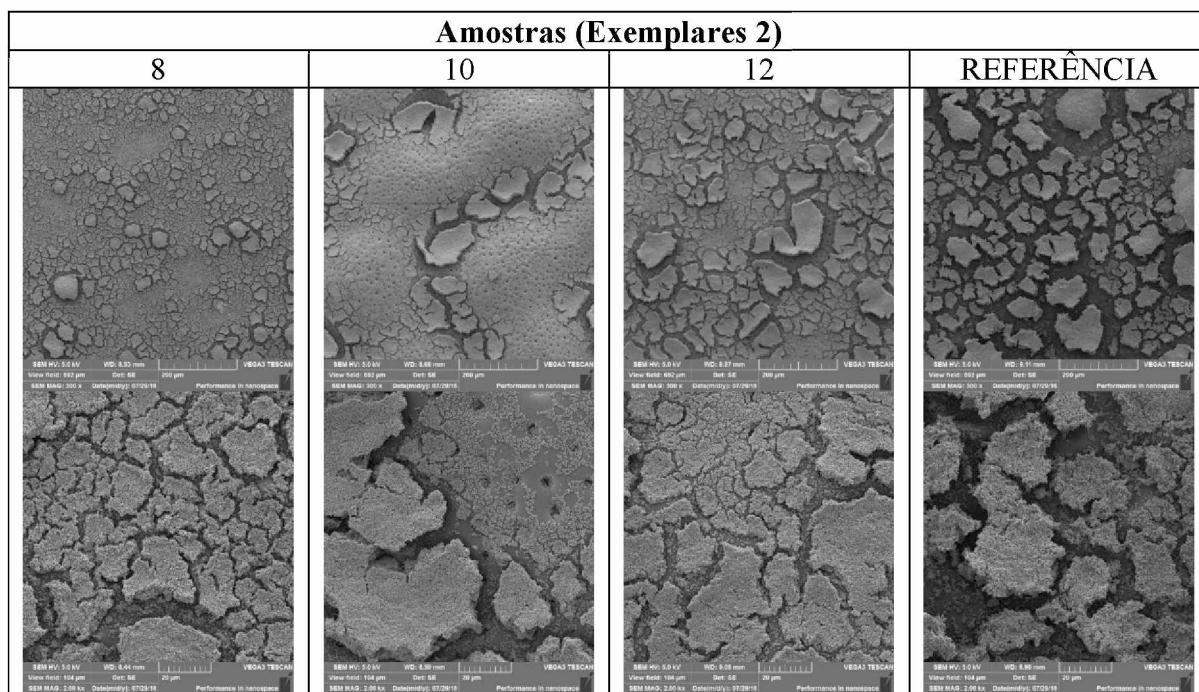
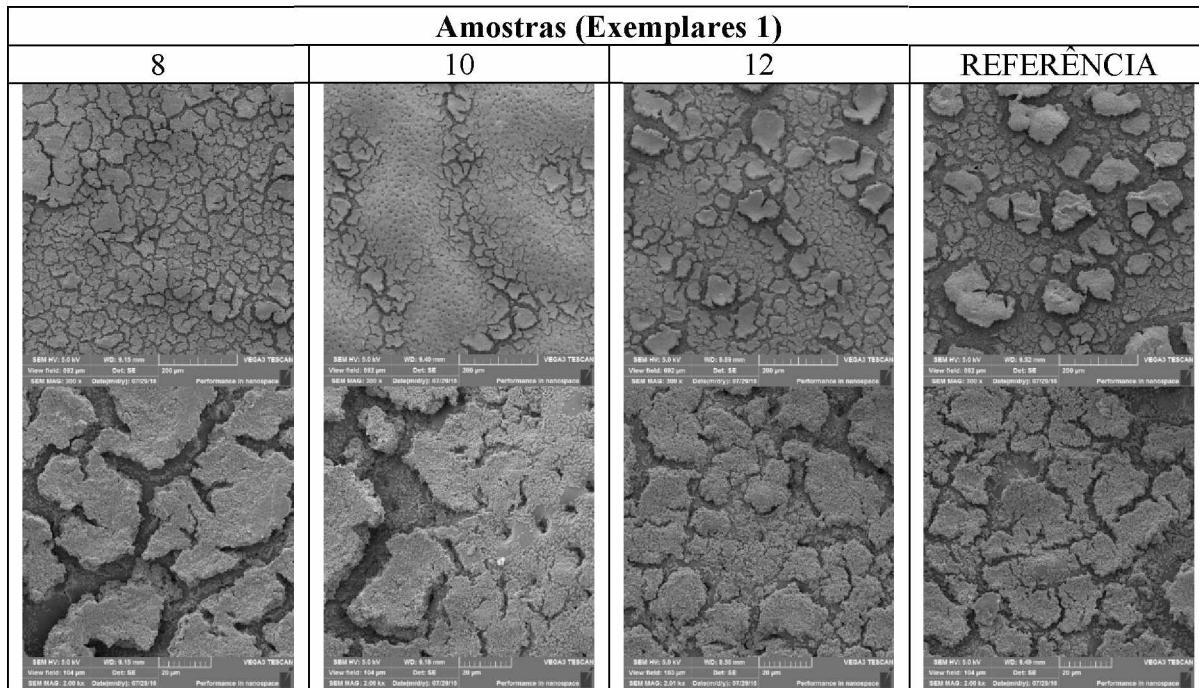
A.2.1 1º ENSAIO - EXPOSIÇÃO À ILUMINAÇÃO UV

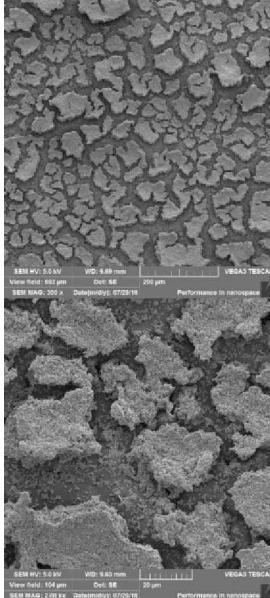
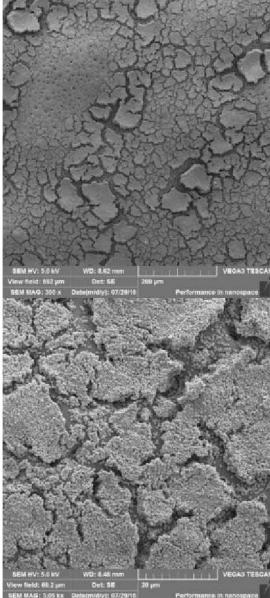
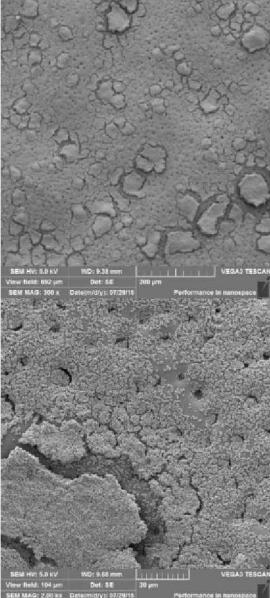
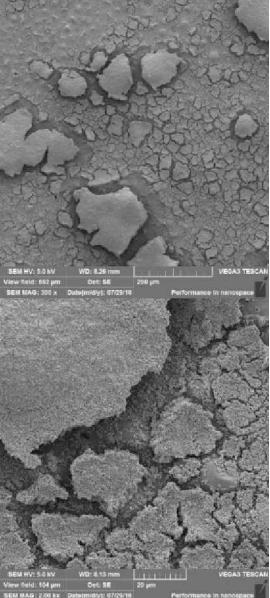


Amostras (Exemplares 2)			
8	10	12	REFERÊNCIA
			

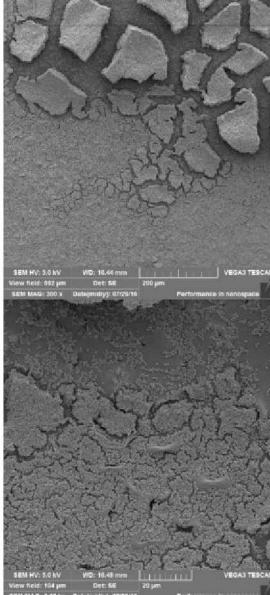
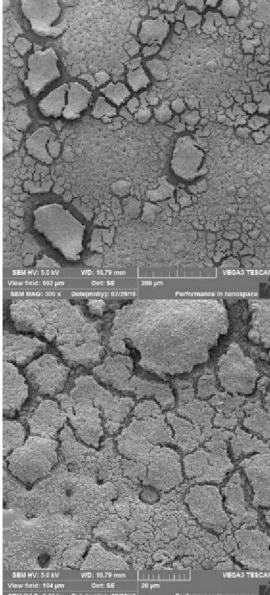
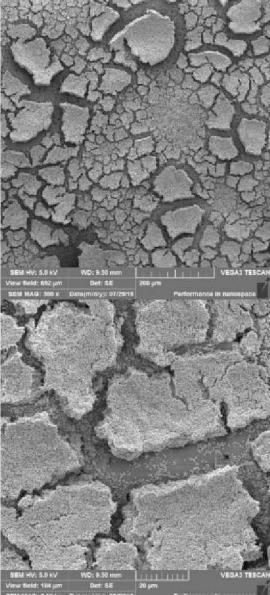
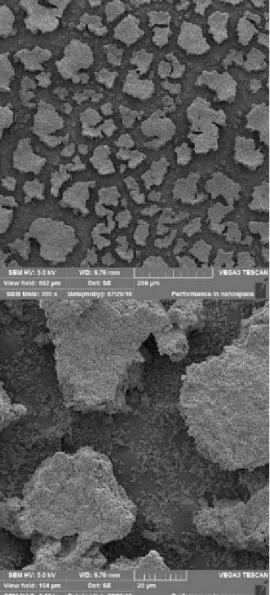
Amostras (Exemplares 3)			
8	10	12	REFERÊNCIA
			

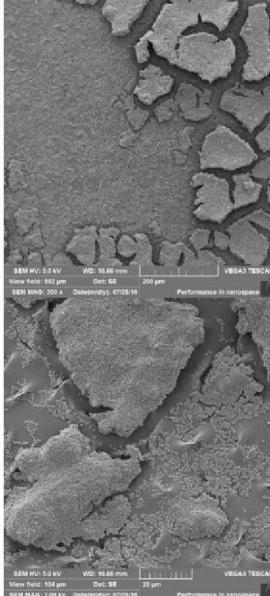
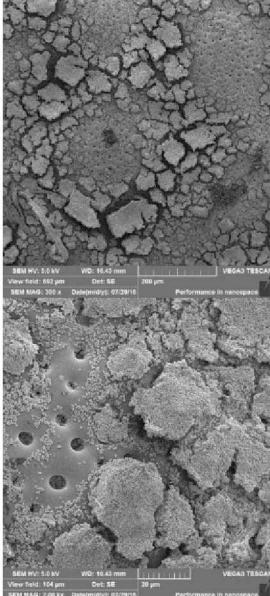
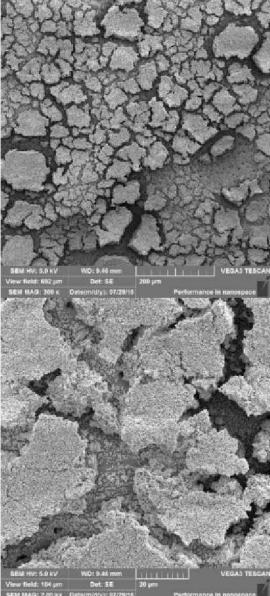
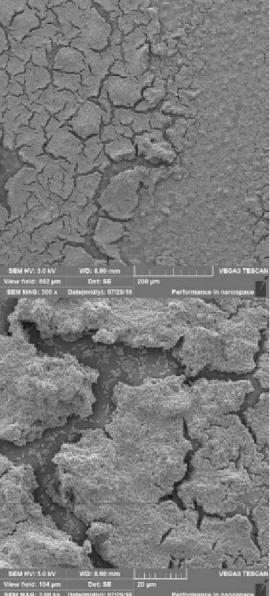
A.2.2 DUPLICATA - EXPOSIÇÃO À ILUMINAÇÃO UV



Amostras (Exemplares 3)			
8	10	12	REFERÊNCIA
			
SEM HV: 5.0 kV WD: 8.6 mm Det: SE 200 µm VEGA TESCAN SEM MAG: 300 x Data/microscopy: 07/29/18 Performance in nanospace	SEM HV: 5.0 kV WD: 8.62 mm Det: SE 200 µm VEGA TESCAN SEM MAG: 300 x Data/microscopy: 07/29/18 Performance in nanospace	SEM HV: 5.0 kV WD: 8.29 mm Det: SE 200 µm VEGA TESCAN SEM MAG: 300 x Data/microscopy: 07/29/18 Performance in nanospace	SEM HV: 5.0 kV WD: 8.26 mm Det: SE 200 µm VEGA TESCAN SEM MAG: 300 x Data/microscopy: 07/29/18 Performance in nanospace
SEM HV: 5.0 kV WD: 8.63 mm Det: SE 20 µm VEGA TESCAN SEM MAG: 2.0 kV Data/microscopy: 07/29/18 Performance in nanospace	SEM HV: 5.0 kV WD: 8.48 mm Det: SE 20 µm VEGA TESCAN SEM MAG: 2.0 kV Data/microscopy: 07/29/18 Performance in nanospace	SEM HV: 5.0 kV WD: 9.69 mm Det: SE 20 µm VEGA TESCAN SEM MAG: 2.0 kV Data/microscopy: 07/29/18 Performance in nanospace	SEM HV: 5.0 kV WD: 8.10 mm Det: SE 20 µm VEGA TESCAN SEM MAG: 2.0 kV Data/microscopy: 07/29/18 Performance in nanospace

A.2.3 TRPLICATA - EXPOSIÇÃO À ILUMINAÇÃO UV

Amostras (Exemplares 1)			
8	10	12	REFERÊNCIA
			
SEM HV: 5.0 kV WD: 16.45 mm Det: SE 200 µm VEGA TESCAN SEM MAG: 300 x Data/microscopy: 07/29/18 Performance in nanospace	SEM HV: 5.0 kV WD: 16.75 mm Det: SE 200 µm VEGA TESCAN SEM MAG: 300 x Data/microscopy: 07/29/18 Performance in nanospace	SEM HV: 5.0 kV WD: 9.55 mm Det: SE 200 µm VEGA TESCAN SEM MAG: 300 x Data/microscopy: 07/29/18 Performance in nanospace	SEM HV: 5.0 kV WD: 9.76 mm Det: SE 200 µm VEGA TESCAN SEM MAG: 300 x Data/microscopy: 07/29/18 Performance in nanospace
SEM HV: 5.0 kV WD: 16.48 mm Det: SE 20 µm VEGA TESCAN SEM MAG: 2.0 kV Data/microscopy: 07/29/18 Performance in nanospace	SEM HV: 5.0 kV WD: 16.78 mm Det: SE 20 µm VEGA TESCAN SEM MAG: 2.0 kV Data/microscopy: 07/29/18 Performance in nanospace	SEM HV: 5.0 kV WD: 9.58 mm Det: SE 20 µm VEGA TESCAN SEM MAG: 2.0 kV Data/microscopy: 07/29/18 Performance in nanospace	SEM HV: 5.0 kV WD: 9.78 mm Det: SE 20 µm VEGA TESCAN SEM MAG: 2.0 kV Data/microscopy: 07/29/18 Performance in nanospace

Amostras (Exemplares 2)			
8	10	12	REFERÊNCIA
			

Amostras (Exemplares 3)			
8	10	12	REFERÊNCIA
