



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Química de Araraquara



BÁRBARA CAMILA DE ARAÚJO SOUZA

Desenvolvimento de magneto-ELISA e imunossensor eletroquímico para análise de *Legionella pneumophila* e eletrodos semicondutores bioinspirados de WO_3 para remoção de *Candida parapsilosis* em águas de rejeito de hemodiálise.

Araraquara

2020

BÁRBARA CAMILA DE ARAÚJO SOUZA

Desenvolvimento de magneto-ELISA e imunossensor eletroquímico para análise de *Legionella pneumophila* e eletrodos semicondutores bioinspirados de W/WO₃ para remoção de *Candida parapsilosis* em águas de rejeito de hemodiálise.

Bárbara Camila de Araújo Souza

Tese apresentada ao Instituto de Química de Araraquara como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Química.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Valnice Boldrin

Araraquara

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

S719d Souza, Barbara Camila de Araújo
Desenvolvimento de magneto-ELISA e imunossensor eletroquímico para a análise de *Legionella pneumophila* e eletrodos semicondutores bioinspirados de WO₃ para a remoção de *Candida parapsilosis* em águas de rejeito de hemodiálise / Barbara Camila de Araújo Souza. – Araraquara : [s.n.], 2020
227 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Maria Valnice Boldrin

1. Fotoeletroquímica. 2. Desinfecção. 3. Candida.
4. Biossensores. 5. Bactérias patogênicas. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Desenvolvimento de magneto-ELISA e imunossensor eletroquímico para análise de Legionella pneumophila e eletrodos semicondutores bioinspirados de WO₃ para remoção de Candida parapsilosis em águas de rejeito de hemodiálise"

AUTORA: BARBARA CAMILA DE ARAUJO

SOUZA ORIENTADORA: MARIA VALNICE

BOLDRIN

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em QUÍMICA,
pela Comissão Examinadora:



Prof.^a Dr.^a MARIA VALNICE BOLDRIN (Participação Virtual)
Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara




Prof.^a Dr.^a RAQUEL FERNANDES PUPO NOGUEIRA (Participação Virtual)
Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. MARCELO ORNAGHI ORLANDI (Participação Virtual)
Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof.^a Dr.^a REGINA HELENA PIRES (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica / Universidade de Franca - UNIFRAN - Franca



Prof.^a Dr.^a CHRISTIANE DE ARRUDA RODRIGUES (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas / Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP- São Paulo

Araraquara, 20 de outubro de 2020

DADOS CURRICULARES

Nome: Bárbara Camila de Araújo Souza

Nascimento: 08 de janeiro de 1990

Filiação: Gerson Costa de Souza e Magaly de Araújo Souza

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: Salvador - BA

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2016 – Atual: Doutorado em Química junto ao Departamento de Química Analítica do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, São Paulo, Brasil com período sanduíche em Universitat Autònoma de Barcelona - UAB (Orientador: Maria Isabel Pvidori)

Título: **Desenvolvimento de magneto-ELISA e imunossensor eletroquímico para análise de *Legionella pneumophila* e eletrodos semicondutores bioinspirados de W/WO₃ para remoção de *Candida parapsilosis* em águas de rejeito de hemodiálise**

Orientador: Maria Valnice Boldrin Zanoni

2013 – 2015: Mestrado em Química junto ao Departamento de Química Analítica do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,

Título: Desinfecção fotocatalítica e fotoeletrocatalítica de cândidas utilizando eletrodos de nanotubos de W/WO₃,

Orientador: Maria Valnice Boldrin Zanoni

2008 – 2013: Graduação em Química junto ao Departamento de Química da Universidade Federal da Bahia, UFBA,

Título: Antraquinonas: Organismos produtores, biossíntese, atividade biológica e identificação estrutural

Orientador: Regina Maria Geris dos Santos

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2011 - 2011 Curso de curta duração em Desenvolvimento de métodos em LC-MS-MS- Uma abordagem teórica e prática. (Carga horária: 6h). Universidade Federal da Bahia, UFBA, Salvador, Brasil

2010 – 2010 Curso de curta duração em Química de Coordenação: Aplicação Industrial e Biológica. (Carga horária: 6h). Universidade do Estado da Bahia, UNEB, Salvador, Brasil

2010 - 2010 Curso de curta duração em Química de Coordenação: Aplicação Industrial e Biológica. (Carga horária: 6h). Universidade do Estado da Bahia, UNEB, Salvador, Brasil

2009 - 2009 Curso de curta duração em Transformações e co-produtos da formação de Biodiesel. (Carga horária: 6h). Universidade Federal da Bahia, UFBA, Salvador, Brasil

2008 – 2008 Curso de curta duração em Reatividade e mecanismos em reações orgânicas. (Carga horária: 6h). Universidade do Estado da Bahia, UNEB, Salvador, Brasil

2008 – 2008 Curso de curta duração em Fundamentos da Geoquímica e Química dos Solos. (Carga horária: 6h). Universidade do Estado da Bahia, UNEB, Salvador, Brasil

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

A) Artigos completos publicados em periódicos:

1. KIM, JOAQUIM YUJI USUKURA; BESSEGATO, GUILHERME G.; DE SOUZA, BÁRBARA C.; DA SILVA, JOSIEL J.; Zanoni, Maria Valnice Boldrin Efficient treatment of swimming pool water by photoelectrocatalytic ozonation: Inactivation of *Candida parapsilosis* and mineralization of Benzophenone-3 and urea. *Chemical Engineering Journal*. v.378, p.122094 -, 2019. 2.
2. SOUZA, BARBARA A.; PERINI, JOAO A.; GIANNINI, MARIA JOSÉ S.M.; Zanoni, Maria Valnice Boldrin Fast removal of *Candida parapsilosis* from hemodialysis dialysate using ultraviolet or visible light at nanoporous W/WO₃ electrodes. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. v.7, p.103-104, 2019.
3. SOUZA, B. C. A.; GUARALDO, T. T.; BRUGNERA, Michelle Fernanda; PIRES, R. H.; GIANNINI, M. M.; Zanoni, M. V. B. Antifungal properties of high efficient W/WO₃ electrodes acting under Uv/Vis And Visible Light and chloride medium. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol.28 no.11 São Paulo, 2015
4. FRAGA, LUCIANO EVANGELISTA; GUARALDO, THAIS TASSO; DE ARAÚJO SOUZA, BÁRBARA CAMILA; Zanoni, Maria Valnice Boldrin Semi-permanent hair dyes degradation at W/WO₃ photoanode under controlled current density assisted by visible light. *Journal of Advanced Oxidation Technologies*, v. 20, n. 2 2017

B) Artigos submetidos em periódicos sob análise:

SOUZA, B. C.A, GIANNINI, M.J.M, YONASHIRO, M., ZANONI, M.V.B.

Application of bioinspired W/WO₃ electrodes electrochemically constructed on microbial biofilm for the disinfection of dialysate contaminated by *Candida parapsilosis*

C) Capítulos de Livros Publicados

1. CARDOSO, JULIANO CARVALHO; BESSEGATO, GUILHERME GARCIA; DE BRITO, JULIANA FERREIRA; SOUZA, BÁRBARA CAMILA A.; ZANONI, MARIA VALNICE BOLDRIN *Electrochemistry: A Powerful Tool for Preparation of Semiconductor Materials for Decontamination of Organic and Inorganic Pollutants, Disinfection, and CO₂ Reduction* In: *Recent Advances in Complex Functional Materials*. 1 ed.: Springer International Publishing, 2017, p. 239-269.
2. BRUGNERA, M.F. SOUZA, B.C.A., ZANONI, M.V.B. *Advanced Oxidation Process Applied to Actinobacterium Disinfection* In: *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*. 1^a ed. Rijeka: Intech, 2016, p. 353-376.

D) PARTICIPAÇÕES EM CONGRESSOS

1. SOUZA, B. C. A.; YONASHIRO, M.; GIANNINI, M. M.; Zanoni, Maria Valnice Boldrin *Bioinspired W/WO₃ electrodes applied in the improvement of quality of hemodialysis dialysate contaminated by *C. parapsilosis**, 2019. (Simpósio, Apresentação de Trabalho). **25th Topical Meeting - International Society of Electrochemistry**.
2. SOUZA, B. C. A.; MESAS, M.; Moliina, Barbara; Zanoni, Maria Valnice Boldrin; Dominguez, J; Pvidori, Isabel. **IMMUNOSENSING TEST FOR**

LEGIONELLA PNEUMOPHILLA, 2019. (Comunicação, Apresentação de Trabalho). **XXIII TRANSFRONTIER MEETING ON SENSORS AND BIOSENSORS**

3. SOUZA, B. C. A.; GUARALDO, T. T.; Zanoni, Maria Valnice Boldrin Nanostructured W/WO₃ electrodes obtained by templates model in the inactivation of fungi, 2017. (Congresso, Apresentação de Trabalho). **XVI Brazilian MRS Meeting.**
4. SOUZA, B. C. A.; GUARALDO, T. T.; Zanoni, Maria Valnice Boldrin. Comparision of photoactivity of nanoporous and nanstructured electrodes of W/WO₃ prepared by eletrochemical anodization and electrodeposition by templates, 2016. (Congresso, Apresentação de Trabalho) **XV Brazilian MRS Meeting.**
5. SOUZA, B. C. A.; GUARALDO, T. T.; Zanoni, Maria Valnice Boldrin Photoelectrocatalysis applied in water disinfection contaminated by *C. parapsilosis* using nanoporous electrode of W/WO₃ prepared by electrochemical anodization, 2015. (Congresso, Apresentação de Trabalho) **227th Electrochemical Society Meeting, 2015.**

ATIVIDADES EXTRACURRICULARES

1. Membro empresa Quantum Jr de Química: Diretora de Marketing
2. Membro Show da Química

EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

2016-2016 Método Ensino: Professor de Química

2012-2014 Centro de Pesquisa de Desenvolvimento: Analista Químico

IDIOMAS

Inglês: Compreende Bem, Fala Bem, escreve bem, Lê Bem

Espanhol: Compreende Bem, Fala bem, Escreve Bem, lê bem

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Gerson e Magaly, pelo exemplo de perseverança, resiliência e caráter, fundamentais na minha concepção, para se viver essa vida de forma digna e honrosa.

Aos meus irmãos Henrique e Ricardo por todo apoio e incentivo.

A todos aqueles que acreditaram e me apoiaram no desenvolvimento dessa tese.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por acreditar que nossa existência pressupõe outra infinitamente superior e por sua imensa sabedoria e por estar junto comigo principalmente nos momentos difíceis.

À professora Doutora **Maria Valnice Boldrin**, pela paciência na orientação e incentivo que tornaram possível a conclusão desta tese.

À professora Doutora **Maria Isabel Pvidori** pela co-orientação e ajuda no dia a dia do laboratório, durante meu estágio na Universitat Autònoma de Barcelona.

Ao Professor Doutor **José Luiz Domiguez** pelo suporte e orientação no Institut d'Investigació em Ciències de Salut Germans Trias i Pujol (IGTP) em Barcelona e à Doutora **Barbara Molina** pelo suporte diário no laboratório.

À Doutora **Monica Yonashiro** pela intensa ajuda no centro de proteômica da Faculdade de Ciências e Letra da Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”.

Aos professores doutores **Nelson Stradiotto, Hideko Yamanaka, Pilar Taboada e Fabíola Mascarenhas**, por contribuírem para o meu aprendizado cotidiano e principalmente nas reuniões de grupo.

Ao Doutor **José Luiz Saheb**, diretor geral do Centro de Tratamento Dialítico de Araraquara, pela grande ajuda em ceder gentilmente as amostras de dialisato e dialisado

Aos **membros do Grupo de Eletroanalítica (GeAr)** pelo agradável convívio e discussões construtivas.

Aos **membros do Grupo de Sensores e Biosensores (GSB)** da Universitat Autònoma de Barcelona.

Aos grandes amigos que fiz aqui em Araraquara e Barcelona em especial: **Elsa Materón, Fabiana Sayão, Lucas Silva, Rafael Fonseca, Caio Silva, Alysson Martins, Fernanda**

Rodrigues, Max Falone, Jennifer Mafra, Melania Mesas, Paula Daltro e Hélyda di Oliveira. Sem vocês seria bem mais difícil.

Aos meus queridos pais **Gerson Costa** e **Magaly Araújo** por acreditarem em mim.

Aos meus irmãos **Gerson Ricardo** e **Henrique César** pelo incentivo diário.

À minha querida cunhada **Ariadne Alves** por todo carinho nessa jornada.

Ao meu querido **Giovani Ângelo** pelo carinho e intenso apoio.

Aos funcionários do **IQ-UNESP de Araraquara** pelo bom humor e disposição em ajudar.

À **CAPES, FAPESP E CNPq** pelo incentivo financeiro.

Meus sinceros agradecimentos a **todos** aqueles que de alguma forma doaram um pouco de si para que a conclusão deste trabalho se tornasse possível.

Muito obrigada!

“nada tão comum que não possa chamá-lo meu

nada tão meu que não possa dizê-lo nosso

nada tão mole que não possa dizê-lo osso

nada tão duro que não possa dizer posso”

Paulo Leminski

Livro Caprichos & Relaxos Editora Brasiliense, 19

RESUMO

O uso da água no ambiente hospitalar tem despertado grande atenção pela probabilidade de ocorrência de patologias em decorrência da ingestão de águas contaminadas, pela excreção de medicamentos, pelo alto índice de microrganismo e espécies patogênicas nos esgotos hospitalares etc. O presente trabalho investiga o desenvolvimento de eletrodos bioinspirados de trióxido de tungstênio sem e modificados com Ag (W/WO₃ e W/WO₃-Ag) e eletrodos nanoestruturados de W/WO₃ formados por *templates* sintéticos e eletrodeposição. Estes eletrodos foram aplicados na desinfecção de águas de origem ambiental e hospitalar utilizando-se a técnica de fotoeletrocatalise. Todos os eletrodos foram caracterizados pelos métodos convencionais e os eletrodos W/WO₃ e W/WO₃-Ag, mostraram melhor atividade fotoeletrocatalítica para desinfecção do dialisato e do dialisado contaminados com *Candida parapsilosis* na forma planctônica e de biofilme sem adição extra de eletrólito em relação aos eletrodos W/WO₃ convencionais. Após otimização do método, a desinfecção fotoeletrocatalítica das cepas em concentração de $1,0 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ em dialisato alcançou 99.99% de inativação após 1 min de tratamento sob potencial aplicado de 1,5 V vs. Ag/AgCl, irradiação UV/vis e nenhuma regeneração destas mesmo após mais de três semanas de incubação. Ainda foi observada alta remoção de carbono orgânico (60%) total (COT), eliminação da turbidez e redução da demanda química de oxigênio. A inativação, morte dos fungos e remoção dos orgânicos lixiviados da análise celular do microrganismo foi atribuída a ação dos radicais hidroxilas fotogerados no meio reacional. A desinfecção dos fungos em efluente proveniente da hemodiálise (dialisado), também alcançou 99.9% de desinfecção após 3 min de tratamento sob irradiação UV/Vis e 15 minutos sob irradiação na região do visível. Para biofilmes, alcançou-se 99,9% de inativação em tempos de tratamento superiores a 120 min, e remoção de COT de 60% das leveduras. Ainda neste trabalho apresentamos o estudo do desenvolvimento de dois métodos imunológicos para detecção de *Legionella pneumophila*. Foram usados o método de magneto-ELISA e biossensor impedimétrico usando ensaio imunológico entre *L. pneumophila* e os anticorpos monoclonais específicos para a bactéria que reagem com o epítipo LPS. A captura e pré-concentração da amostra foi feita utilizando-se partículas magnéticas e transdução óptica e eletroquímica, para os ensaios de magneto-ELISA e biossensor, respectivamente. Resultados mais satisfatórios foram obtidos para imunossensor impedimétrico, utilizando-se partículas magnéticas tosiladas com 450nm de tamanho modificadas com anticorpo *Legionella* Polyclonal Antibody genus depositadas sobre eletrodo composto de grafite epóxi modificado por imã. Valores de LD = 59,91 UFC mL⁻¹ e LQ = 183,03 UFC mL⁻¹ foram obtidos para detecção de *L. pneumophila* em meio aquoso. O método foi aplicado na determinação de LP em água de torneira e dialisato de hemodiálise, alcançando-se detecção de ao redor de 10^5 UFC mL⁻¹, com recuperações superiores a 85%.

Palavras chave: Fotoeletrocatalise, *Candida parapsilosis*, *Legionella pneumophila*, imunossensores, eletrodos bioinspirados de trióxido de tungstênio, desinfecção

ABSTRACT

The use of water in the hospital environment has attracted great attention due to the probability of the occurrence of pathologies due to the ingestion of contaminated water, the excretion of medicines, the high rate of microorganisms and pathogenic species in hospital sewers, etc. The present work investigates the development of bioinspired trioxide electrodes without and modified with Ag (W/WO₃ and W/WO₃-Ag) and nanostructured W / WO₃ electrodes formed by synthetic templates and electrodeposition. These electrodes were applied to disinfect waters of environmental and hospital origin using the photoelectrocatalysis technique. All electrodes were characterized by conventional methods and the W/WO₃ and W/WO₃-Ag electrodes showed better photoelectrocatalytic activity for disinfecting the dialysate and dialysate contaminated with *Candida parapsilosis* in the plactonic and biofilm form without extra electrolyte in relation to conventional W/WO₃ electrodes. After optimizing the method, the photoelectrocatalytic disinfection of strains at a concentration of 1.0 x 10⁶ CFU mL⁻¹ in dialysate reached 99.99% of inactivation after 1 min of treatment under applied potential of 1.5 V vs. Ag / AgCl, UV / vis irradiation and no regeneration even after more than three weeks of incubation. High removal of total organic carbon (60%) was also observed, elimination of turbidity and reduction of chemical oxygen demand. The inactivation, death of the fungi and removal of the leachate organics from the cell lysis of the microorganism was attributed to the action of the photogenerated hydroxyl radicals in the reaction medium. The disinfection of fungi in effluent from hemodialysis (dialysate) also reached 99.9% disinfection after 3 min of treatment under UV / Vis irradiation and 15 minutes under irradiation in the visible region. For biofilms, 99.9% of inactivation was achieved in treatment times longer than 120 min, and TOC removal of 60% of yeasts. Still in this work, we present the study of the development of two immunological methods for the detection of *Legionella pneumophila*. The magneto-ELISA method and impedimetric biosensor were used using an immunological assay between *L. pneumophila* and the monoclonal antibodies specific for the bacteria that react with the LPS epitope. The capture and pre-concentration of the sample was done using magnetic particles and optical and electrochemical transduction, for the magneto-ELISA and biosensor assays, respectively. More satisfactory results were obtained for impedimetric immunosensor, using tosylated magnetic particles 450nm in size modified with Legionella Polyclonal Antibody genus antibody deposited on a magnet electrode made of magnetite-modified epoxy graphite. LD values = 59.91 CFU mL⁻¹ and LQ = 183.03 CFU mL⁻¹ were obtained for the detection of *L. pneumophila* in an aqueous medium. The method was applied in the determination of LP in tap water and hemodialysis dialysate, reaching a detection of around 105 UFC mL⁻¹, with recoveries above 85%.

Keywords: Photoelectrocatalysis, *Candida parapsilosis*, *Legionella pneumophila*, immunosensors, bioinspired tungsten trioxide electrodes, disinfection

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Célula fúngica com destaque para os envoltórios.....	39
Figura 2: Ilustração do processo de hemodiálise	47
Figura 3: Representação esquemática de um semiconductor fotoexcitado.....	49
Figura 4: Representação esquemática de um reator fotoeletrocatalítico usando um semiconductor tipo n sob irradiação de luz. principais constituintes são: (A) fotoânodo, (B) cátodo e (C) potenciostato.	53
Figura 5: Representação esquemática do diagrama de energia em um semiconductor do tipo n. Em (a) encontra-se o mecanismo de geração de carregadores de carga por fotoexcitação; (b) e (c) evidenciam as bandas energéticas antes e após contato com um eletrólito redox.....	55
Figura 6: Comportamento de um semiconductor do tipo n quando submetido a potencial de: (a) $E = E_{fb}$; (b) $E > E_{fb}$ (formação da camada de depleção); e (c) $E < E_{fb}$ (formação da camada de acumulação).	56
Figura 7: Ilustração das bandas em um eletrodo tipo n ao ser fotoexcitado com radiação superior ao potencial flat band (E_{fb}).	58
Figura 8: Curva típica de fotocorrente vs potencial aplicado a um eletrodo com semiconductor do tipo n na ausência e presença de luz.	58
Figura 9: Representação esquemática da posição das E_{bg} valores (em eV), posição de BC e BV para semicondutores selecionados.	61
Figura 10: Representação de estrutura da célula unitária monoclinica de WO_3 . No modelo, bolas verdes e vermelhas representam os átomos de W e O, respectivamente. As direções x, y e z das cadeias -W-O-W- com e sem vacância de oxigênio são mostradas em (em (b),(c) e (d), respectivamente. As distâncias estão em Å	64
Figura 11: Esquema de reator fotoeletrocatalítico: (A) saída de água, (B) entrada de água, (C) eletrodo de trabalho, (D) eletrodo de referência, (E) eletrodo auxiliar, (F) Agitador magnético.	76
Figura 12: Microscopia eletrônica de alta resolução (FEG-MEV) dos biofilmes microbianos obtidos na superfície metálica de tungstênio com 100 vezes (A) e 500 vezes de aumento (B) e biofilmes microbianos obtidos na superfície nanoporosa do trióxido de	

Lista de Figuras

tungstênio c com 100 vezes (A) e 500 vezes de aumento (B) e biofilmes microbianos obtidos na superfície nanoporosa do trióxido de tungstênio com 100 vezes (C) e 500 vezes de aumento (D).	81
Figura 13: Microscopia eletrônica de alta resolução (FEG-MEV) dos biofilmes microbianos obtidos com 24 (A), 48 (B) e 72 h de crescimento (C).....	82
Figura 14: Imagens de microscopia eletrônica de alta resolução (FEG-MEV) de (A) folha de W com aumento de 20.00 vezes, (B) eletrodos de W/WO ₃ após a anodização em NaF 0,15 mol.L ⁻¹ , 60 V, 2h com um aumento de 20.000 e após o crescimento do biofilme seguido da eletrodeposição eletroquímica por 45 min a -0,45 V com aumento de 100 vezes (C), 1500 (D), 5000 (E) e 50.000 (F) vezes.....	84
Figura 15: Imagem de microscopia eletrônica de alta eficiência dos eletrodos bioinspirados de WO ₃ com o respectivo resultado das análises de EDS da região escolhida.	85
Figura 16: Difratogramas de Raios-X obtidos para a folha de tungstênio sem modificação (A) e anodizada em NaF 0,15 mol.L ⁻¹ e eletrodepositada em solução de precursora a 0,45 V (B).....	86
Figura 17: Curva de reflectância difusa obtida para o eletrodo bioinspirado de W/WO ₃ (A). Gráfico de Tauc construído para o cálculo do band gap do eletrodo de W/WO ₃ obtido (B).....	87
Figura 18: Espectro da lâmpada de Vapor de Mercúrio (125W) utilizada na fotoexcitação do semiconductor construído.....	88
Figura 19: Curvas de fotocorrente vs potencial obtidas para o para o eletrodo bioinspirado de W/WO ₃ na ausência de luz e iluminado por uma lâmpada de 125W na região UV/Vis e Vis em meio de dialisato (A). Variação de potencial de -0,5 a 2,0V, velocidade de varedura igual a 10 mVs ⁻¹	90
Figura 20: Quadrado da densidade de fotocorrente vs. potencial aplicado para eletrodo de W/WO ₃ em dialisato sob irradiação UV, sendo a área dos eletrodos 1 cm ²	92
Figura 21: Rota de reação para a polimerização da dopamina.....	93
Figura 22: Microscopia eletrônica de alta resolução (FEG-MEV) dos eletrodos bioinspirados de W/WO ₃ modificados com Ag pela deposição química de PDA com aumento de 100 (A), 10.000 (B) e 50.000 vezes (C).....	94

Lista de Figuras

- Figura 23:** Curva de reflectância difusa obtida para o eletrodo bioinspirado de W/WO₃-Ag (A). Gráfico de Tauc construído para o cálculo do band gap do eletrodo de W/WO₃-Ag obtido (B). Difratograma de Raios-X obtidos para o eletrodo bioinspirado W/WO₃-Ag (C)..... 95
- Figura 24:** Curvas de fotocorrente vs potencial obtidas para o para o eletrodo bioinspirado de W/WO₃-Ag na ausência de luz e iluminado por uma lâmpada de 125W na região UV/Vis e Vis em meio de dialisato (A) e Efluente (B). Variação de potencial de -0, de -0,5 a 2,0V, velocidade de varedura igual a 10 mVs⁻¹..... 96
- Figura 25:** Quadrado da densidade de fotocorrente vs. potencial aplicado para eletrodo de W/WO₃ - Ag em dialisato sob irradiação UV, sendo a área dos eletrodos 1 cm². 97
- Figura 26:** Estrutura molecular do Triton X-100 98
- Figura 27:** Microscopia eletrônica de alta resolução (FE-SEM) dos eletrodos de W/WO₃ recobertos por nanoesferas de poliestireno a uma concentração de Triton X-100 de 1,0 x 10⁻⁴ mol.L⁻¹ (A) e depois do filme eletrodepositado (B) para as concentrações de 1 X 10⁻⁷(1), 1,0 x 10⁻⁶ (2), 1,0 x 10⁻⁵(3) e 1,0 x 10⁻⁴ (4) mol L⁻¹ 99
- Figura 28: Imagens de microscopia eletrônica de alta eficiência dos eletrodos de WO₃ com o respectivo resultado das análises de EDS da região escolhida para as concentrações de 1,0 x 10⁻⁷ mol L⁻¹ (A), 1,0 x 10⁻⁶ mol.L⁻¹ (B), 1,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ (C) e 10⁻⁴ mol L⁻¹ (D). 100
- Figura 29:** Difratogramas de Raios-X obtidos para a folha de tungstênio sem modificação (A) e para os eletrodos construídos por templates em diferentes concentrações de Triton X-100. 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ (D), 1,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ (E), 1,0 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ (F) e 10⁻⁷ mol. L⁻¹ 103
- Figura 30:** Microscopia eletrônica de alta resolução (FE-SEM) dos eletrodos de W recobertos por nanoesferas de poliestireno a uma concentração de Triton X-100 de 1,0 x 10⁻⁴ com diferentes volumes: 50µL (A), 70 µL (B) e 90 µL(C). Aumento de cinco mil vezes. 104
- Figura 31:** Curva de contagem microbiana obtida durante 120 min de tratamento fotoeletrocatalítico para o dialisato (pH 7,2) fortificado com 1,0 x 10⁶ UFC mL⁻¹ de *C. parapsilosis*, E = + 1,5 V sob irradiação UV/Vis..... 107

Lista de Figuras

- Figura 32:** Remoção de carbono orgânico total de acordo com o potencial aplicado. Condições: $1,0 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ de *C. parapsilosis* em dialisato, pH =7,2. $E_{app} = +1,5$ V tempo de reação de 120 min. Radiação UV/Vis..... 108
- Figura 33:** Efeito do potencial aplicado na variação da turbidez da solução durante 120min de tratamento fotoelercatalitco. Condições: $1,0 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ de *C. parapsilosis* em dialisato, pH =7,2. $E_{app} = +1,5$ V . Radiação UV/Vis. 109
- Figura 34:** Variação da porcentagem de remoção de carbono orgânico total dissolvido em função do tempo de fotoeletrocatalise. Condições: $1,0 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ de *C. parapsilosis* em dialisato, pH =7,2. $E_{app} = +1,5$ V. Radiação UV/Vis 110
- Figura 35:** Efeito da concentração de *C. parapsilosis* na conversão da matéria orgânica a CO₂ durante 120 minutos de tratamento fotoeletrocatalítico conduzido no dialisato, pH 7,2, $E = +1,5$ V. Radiação UV/Vis 111
- Figura 36:** Variação de turbidez no tratamento fotoeletrocatalítico conduzido no dialisato pH 7,2. $E = +1,5$ V conforme o aumento da concentração de *C. parapsilosis* no meio. Tempo de tratamento: 120 min. Radiação UV/Vis 112
- Figura 37:** Contagem microbiana para os sessenta segundos iniciais da degradação de $1,0 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ de *C. parapsilosis* em dialisato, pH 7,2, $E = +1,5$ V, Radiação UV/Vis 114
- Figura 38:** Formação do intermediário colorido proveniente da reação entre Cl₂ e DPD 116
- Figura 39:** Curva analítica obtida para a determinação de cloro ativo. $A = 0,0115[Cl_2] + 0,01108$, 515 nm..... 117
- Figura 40:** Cromatogramas obtidos para a alíquota proveniente da degradação fotoeletrocatalítica de 120 minutos de *C. parapsilosis* no dialisato fortificada com 0,1 mol L⁻¹ de clorofórmio (B) e alíquota sem fortificação. Condições: $1,0 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ de *C. parapsilosis* no dialisato fortificada com 0,1 mol L⁻¹ de clorofórmio (B) e alíquota sem fortificação . Condições: $1,0 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ em dialisato, pH 7,2, $E = +1,5$ V, Radiação UV/Vis..... 119
- Figura 41:** Contagem microbiana obtida para de fotólise., fotocátalise.e fotoeletrocátalise. Condições experimentais: $1,0 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ de *C. parapsilosis* em dialisato, pH 7,3 durante 120 min..... 120

Lista de Figuras

Figura 42: Diferentes mecanismos para fotólise (A), fotocatalise (B) e fotoeletrocatalise (C).....	122
Figura 43: Gráfico de porcentagem de mineralização para fotoeletrocatalise realizada com luz na região do ultravioleta e visível, na região do visível sobre eletrodo W/WO ₃ (E= +1,5 V vs. Ag/AgCl) obtido para desinfecção de <i>C. parapsilosis</i> 1,0 x 10 ⁶ UFC mL ⁻¹ no intervalo de 120 minutos em dialisato pH 7, 2, fotocatalise e fotólise.	123
Figura 44: Gráfico de porcentagem de mineralização para fotoeletrocatalise realizada com luz na região do ultravioleta e visível, na região do visível sobre eletrodo W/WO ₃ (E= +1,5 V vs. Ag/AgCl) obtido para desinfecção de <i>C. parapsilosis</i> 1,0 x 10 ⁶ UFC mL ⁻¹ no intervalo de 120 minutos no dialisato (pH 7,2).....	125
Figura 45: Contagem microbiana para tratamento fotoeletrocatalítico de <i>C. parapsilosis</i> em pH 7,2, em dialisato, irradiação UV-Vis (125W), E =1,5 V para os 60 segundos iniciais.....	125
Figura 46: Mecanismo de formação de um biofilme em uma superfície sólida com todas as fases envolvidas.....	126
Figura 47: Porcentagem de mineralização para a degradação fotoeletrocatalítica do biofilme de <i>C.parapsilosis</i> sob radiação UV/Vis e Vis em dialisato.	127
Figura 48: Porcentagem de mineralização para a degradação fotoeletrocatalítica, fotocatalítica e fotolítica do biofilme de <i>C.parapsilosis</i> sob radiação UV/Vis e Vis em dialisato. Condições: Meio reacional dialisato, pH =7,2. E _{app} = +1,5 V tempo de reação de 120 min. Radiação UV/Vis.	129
Figura 49: Contagem microbiana para tratamento fotoeletrocatalítico de <i>C. parapsilosis</i> em pH 6,7, em efluente, irradiação UV-Vis e Visível (125W), E = +1,5 V para os 120 minutos de reação	130
Figura 50: Porcentagem de mineralização para a degradação fotoeletrocatalítica do biofilme de <i>C.parapsilosis</i> sob radiação UV/Vis e Vis em efluente.....	131
Figura 51: Contagem microbiana para tratamento fotoeletrocatalítico de <i>C. parapsilosis</i> em pH 3, 6,7 e 10. Eletrólito suporte: Efluente da hemodiálise, irradiação UV-Vis (125W), E =1,5 V.	133
Figura 52 : Efeito do pH na mineralização vs. tempo para desinfecção fotoeletrocatalítica de <i>C. parapsilosis</i> em pH 3, 6,7 e 10 sob eletrodo bioinspirado de W/WO ₃ (E= 1,5 V vs.	

Lista de Figuras

Ag/AgCl), em efluente e irradiação UV-Vis (125W). No <i>insert</i> do gráfico há um melhor detalhamento dos primeiros 25 minutos iniciais de reação.	134
Figura 53: Efeito da variação do valor do pH em relação ao tempo de fotoeletrocatalise na geração de cloro ativo utilizando eletrodo de W/WO ₃ , sob irradiação UV-Vis 125W. pH 3, 6,7 e 10.....	135
Figura 54 Porcentagem de mineralização para a degradação fotoeletrocatalítica, fotocatalítica e fotolítica de 1,0 x 10 ⁶ UFC mL ⁻¹ de <i>C.parapsilosis</i> sob radiação UV/Vis em efluente. Condições: Meio reacional efluente, pH =3. Tempo de reação de 120 min. Radiação UV/Vis.....	137
Figura 55: Redução na quantidade de carbono orgânico total (em preto) e demanda química de oxigênio na desinfecção de <i>C. parapsilosis</i> em dialisato sob eletrodo de W/WO ₃ -Ag. Condições: 1,0 x 10 ⁶ UFC mL ⁻¹ de <i>C. parapsilosis</i> em dialisato, pH =7,2. E _{app} = +1,5 V. Radiação UV/Vis.....	139
Figura 56: Porcentagem de mineralização para a degradação fotoeletrocatalítica, fotocatalítica e fotolítica de 1,0 x 10 ⁶ UFC mL ⁻¹ de <i>C.parapsilosis</i> sob radiação UV/Vis e Visível em dialisato sob eletrodos de W/WO ₃ -Ag. Condições: Meio dialisato, pH =7,2. Tempo de reação de 120 min.....	140
Figura 57: Porcentagem de mineralização para a degradação fotoeletrocatalítica do biofilme de <i>C.parapsilosis</i> sob radiação UV/Vis e Vis em dialisato para os eletrodos de W/WO ₃ feitos por templates sintéticos em dialisato: pH 7, 2, E _{app} =1,5 V.....	142
Figura 58: Porcentagem de mineralização para a degradação fotoeletrocatalítica, fotocatalítica e fotolítica de 1,0 x 10 ⁶ UFC mL ⁻¹ de <i>C.parapsilosis</i> sob radiação UV/Vis e Visível em dialisato sob eletrodos de W/WO ₃ construídos por templates. Condições: Meio dialisato, pH =7,2. Tempo de reação de 120 min.....	143
Figura 59: Porcentagem de mineralização para as técnicas de FEC UV/Vis, fotocatalise e fotólise conduzidas sob eletrodos construídos por templates de W/WO ₃ em presença de efluente.	145
Figura 60: Processo de infecção e replicação de <i>Legionella pneumophila</i> no interior da célula hospedeira	152
Figura 61: Representação esquemática de um biossensor	157
Figura 62: Estrutura do anticorpo e suas principais partes.....	158

Lista de Figuras

Figura 63: Tipos de imunoenensaio ELISA: (A) configuração direta, (B) configuração indireta, (C) competitiva e (D) indireta do tipo sanduíche.	162
Figura 64: Representação de um diagrama de Nyquist típico.....	166
Figura 65: Gráfico típico de Bode.....	168
Figura 66: Esquema do ensaio de Magneto-Elisa realizado	174
Figura 67: Esquema para o procedimento realizado na análise eletroquímica	176
Figura 68: Imagens de microscopia confocal obtida após a modificação das MPs com o anticorpo primário.	178
Figura 69: Mecanismo proposto para modificação da MP com anticorpo α -Legionella LPS	179
Figura 70: Reativação das Cepas de <i>L. pneumophila</i> A e B. Curva de crescimento microbiano obtida em C	180
Figura 71: Absorbância obtida para diferentes concentrações de no ELISA-2D indireto inicial. Condições: [<i>L. pneumophila</i>]= $1,0 \times 10^5$ UFC mL ⁻¹ , [Ac primário] = 10, 1, 0,1 e 0,01 μ g mL ⁻¹ , Diluição Ab secundário: 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/5000, 1/10000, 1/20000 tempo de incubação= 1h.....	181
Figura 72: Estrutura de uma membrana de uma endobactéria, com destaque para a estrutura química do LPS	182
Figura 73: Absorbância obtida para diferentes concentrações no teste ELISA-2D sanduíche inicial. Condições: [<i>L. pneumophila</i>]= $1,0 \times 10^5$ UFC mL ⁻¹ , [Ac primário] = 5 e 10 μ g mL ⁻¹ , Diluição Ab secundário: 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/5000, 1/10000, 1/20000 tempo de incubação= 1h.....	183
Figura 74: Absorbância vs concentrações de <i>L. pneumophila</i> em UFC mL ⁻¹ (A) e em Log (B). Condições: [Ac primário] = 10 μ g mL ⁻¹ , Diluição Ab secundário: 1/2000, tempo de incubação = 1h.....	184
Figura 75: Absorbância obtida para diferentes concentrações tamanhos 280 e 450nm de partículas magnéticas no magneto-ELISA. Condições: [<i>L. pneumophila</i>] = $1,0 \times 10^5$ UFC mL ⁻¹ , Diluição Ab secundário: 1/2000, tempo de incubação = 1h.....	187
Figura 76: Absorbância obtida para diferentes concentrações de partículas magnéticas no magneto-ELISA. Condições: [<i>L. pneumophila</i>]= $1,0 \times 10^5$ UFC mL ⁻¹ , Diluição Ab secundário: 1/2000, 1/5000, 1/10000 (A), 1/5000 (B), 1/2000 (C). [PMs] = 1×10^6 mp	

Lista de Figuras

mL ⁻¹ , 5 x 10 ⁵ mp mL ⁻¹ , 1 x 10 ⁵ mp mL ⁻¹ , 5 x 10 ⁴ mp mL ⁻¹ , 1 x 10 ⁴ mp mL ⁻¹ e 5 x 10 ³ mp mL ⁻¹ tempo de incubação= 1h.....	188
Figura 77: Absorbância obtida para diferentes concentrações de partículas magnéticas no magneto-ELISA. Condições: [L. pneumophila]= 1,0 x 10 ⁵ UFC mL ⁻¹ , Diluição Ab secundário 1/10000. [MPs] = 1,0 x 10 ⁶ mp mL ⁻¹ , 5,0 x 10 ⁵ mp mL ⁻¹ , 1,0 x 10 ⁵ mp mL ⁻¹ , 5,0 x 10 ⁴ tempo de incubação = 1h.....	190
Figura 78 Absorbância vs concentrações de <i>L. pneumophila</i> em UFC mL ⁻¹ (A) e em Log (B). Condições: [MP] = 5 x 10 ⁴ mp mL ⁻¹ , Diluição Ab secundário: 1/10000, tempo de incubação igual = 1h.....	191
Figura 79: Variação do potencial de circuito aberto do eletrodo m-GEC ao longo de 1 hora. Medida realizada em solução de Fe (CN) ₆ ^{3-/4-} 5 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ preparada em solução KCl 0,5 mol L ⁻¹	194
Figura 80: Valores da razão de Z / Z _{5mV} vs amplitude (rms) para o eletrodo m-GEC. Medidas realizadas em solução Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} 5 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ preparada em solução KCl 0,5 mol L ⁻¹ . A frequência analisada foi 50 mHz.	196
Figura 81: Medidas obtidas com eletrodo m-GEC sem modificação e após a modificação com 1,0 x 10 ⁴ mps mL ⁻¹ . Medidas realizadas em solução Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} 5 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ preparada em solução KCl 0,5 mol L ⁻¹	197
Figura 82: Gráficos de Niquist (A) e variação de Rct proveniente da otimização da concentração de partículas magnéticas modificadas com anticorpo monoclonal anti-Legionella. Medidas realizadas em solução Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} 5 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ preparada em solução de KCl 0,5 mol L ⁻¹	198
Figura 83: Gráficos de Niquist (A) e variação de ΔRct proveniente da otimização do volume de partículas magnéticas modificadas com anticorpo monoclonal anti-Legionella. Medidas realizadas em solução Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} 5 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ preparada em solução KCl 0,5 mol L ⁻¹	199
Figura 84: Gráficos de Nyquist (A) e variação de ΔRct (B) proveniente da otimização do volume de partículas magnéticas modificadas com anticorpo monoclonal anti-Legionella. Medidas realizadas em solução Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} 5 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ preparada em solução KCl 0,5 mol L ⁻¹	201

Lista de Figuras

- Figura 85:** Valores de ΔR_{ct} obtidos em cada medida (A). Diagramas de Nyquist referentes à medida Medidas realizadas em solução $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ preparada em solução KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (B). 202
- Figura 86:** Circuito equivalente utilizado na ferramenta de análise “electrochemical circle fit” 204
- Figura 87:** Gráficos de Nyquist (A) e: Gráfico de ΔR_{ct} em função da concentração de *L. pneumophila* expressa em escala logarítmica. As barras de erro mostram o desvio padrão obtido a partir da triplicata dos dados dos experimentos..... 206

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição e concentração dos sais utilizados em uma máquina de hemodiálise.....	45
Tabela 2: Valores iniciais de TOC, DQO e condutividade e pH medidos para o dialisato e efluente.....	90
Tabela 3: Efeito do eletrodo sobre os valores de fotocorrente observados para diferentes concentrações de Triton X-100 em meio de dialisato efluente utilizando radiação UV/Vis e Vis. Eletrodos 1) 1×10^{-7} mol L ⁻¹ , 2) 1×10^{-6} mol L ⁻¹ 3) 1×10^{-5} mol L ⁻¹ e 1×10^{-4} mol L ⁻¹ , 90 µL de suspensão.	105
Tabela 4: Parâmetros avaliados e otimizados para a desinfecção e degradação fotoeletrocatalítica de <i>C. parapsilosis</i> no dialisato utilizado na hemodiálise	113
Tabela 5: Valores de constantes cinéticas obtidas para FEC, fotocatalise e fotólise realizadas com os eletrodos bioinspirados de W/WO ₃ em meio de dialisato.....	121
Tabela 6: Redução de DQO e turbidez para a degradação fotoeletrocatalítica dos biofilmes após 120 minutos de reação em dialisato.	128
Tabela 7: Redução de DQO e turbidez para a degradação fotoeletrocatalítica dos biofilmes após 120 minutos de reação em dialisato.	132
Tabela 8: valores de redução de DQO e turbidez para as reações realizadas após 120 min sob eletrodos de bioinspirados de W/WO ₃ em presença de efluente.	136
Tabela 9: Tempos de inativação microbiana para os experimentos realizados com os eletrodos de W/WO ₃ -Ag.....	139
Tabela 10: Tempos de inativação microbiana para os experimentos realizados com os eletrodos de W/WO ₃ -Ag, % de mineralização e % de redução em meio de efluente. .	141
Tabela 11: Resultados obtidos para os diferentes experimentos realizados com os eletrodos feitos por <i>templates</i> sintéticos de W/WO ₃ na presença de biofilme em meio de dialisato.....	144
Tabela 12: Valores da relação sinal/ruído obtidos no Ensaio ELISA-2D Sanduíche .	184
Tabela 13 : Amostra analisada e recuperações obtidas utilizando o método ELISA sanduíche	185

Lista de Tabelas

Tabela 14: Variáveis estudadas, intervalos avaliados e condição otimizada para ensaio magneto-ELISA para detecção de <i>L. Legionella</i>	190
Tabela 15: Amostra analisada e recuperações obtidas utilizando-se o método magneto-ELISA.	192
Tabela 16: Amostra analisada e recuperações obtidas utilizando-se o método magneto-ELISA apenas com fortificação da amostra.	193
Tabela 17: Parâmetros avaliados e condições otimizadas.....	202
Tabela 18: Valores adicionados e recuperados de <i>L. pneumophila</i> em amostras de água de torneira e dialisato.....	208

Lista de Abreviações e Símbolos

LISTA DE ABREVIÇÕES E SÍMBOLOS

Ab – Anticorpo (do inglês – “antibody”)

AC – Corrente Alternada (do inglês – “alternating current”)

Ag – Antígeno (do inglês – “antigen”)

ADN- Ácido desoxirribonucleico

ATCC- *American type culture collection*

BC- Banda de condução

BV- Banda de valência

Ca – Capacitância da Dupla Camada Elétrica

C. parapsilosis- *Candida parapsilosis*

CI- Carbono inorgânico

COT- Carbono orgânico total

CT- Carbono total

DC – Corrente Contínua (do inglês – “direct current”)

DPD- N, N-Dietil-p-*fenilenodiamina*

DQO – Demanda química de oxigênio

DRC – Doença renal crônica

DRX- Difração de Raios-X

e⁻ - Elétron

EDX- Energia dispersiva de Raios-X

EIS – Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (do inglês – “electrochemical impedance spectroscopy”)

EROs – Espécies reativas de oxigênio

E_{fb} – Potencial de banda plana

E^o- Potencial padrão de redução

Lista de Abreviações e Símbolos

E_{oc} – Potencial de Circuito Aberto

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

eV- Elétron-volt

FEC- Fotoeletrocatalise

FEC-UV-Vis – Fotoeletrocatalise realizada com irradiação na região do ultravioleta e visível

FEC-Vis- Fotoeletrocatalise realizada com irradiação na região do visível

FEG-SEM – Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução com fonte de elétrons por emissão de campo

h⁺- buraco

Hz - Hertz

kHz - Quilohertz

kV- Quilovolts

L. pneumophila – *Legionella pneumophila*

LPS - Lipossacarídeo

m/m- Unidade de massa por massa total

MΩ cm⁻¹- Megaohms por centímetro

NCAC – Não *Candida albicans*

nm- Nanômetro

PA- Para análise

pH- Potencial hidrogeniônico

POA- Processo oxidativos avançados

PDA - Polidopamina

R_{ct} - Resistência de Transferência de Carga

RPMI - Roswell Park Memorial Institute

R_s – Resistência Ôhmica da Solução

Lista de Abreviações e Símbolos

SIDA- Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

UV- Ultravioleta

UV-Vis- Ultravioleta e Visível

V- Volt

YPD - Yest Peptome Dextrose

W- Watts

ΔC_d – Variação da Capacitância

ΔR_{ct} – Variação da Resistência de Transferência de Carga

ω – Frequência de oscilação de uma onda senoidal

ϕ – Ângulo de Fase

χ^2 – Chi quadrado

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	33
CAPÍTULO 1.....	37
1. REVISÃO DA LITERATURA E ESTADO DA ARTE	37
1.1. Fungos: Uma abordagem geral sobre este Reino.....	37
1.2. O gênero <i>Candida</i> e a presença em hospitais.....	40
1.3. O processo de hemodiálise e a geração de efluentes	44
1.4. Processos oxidativos avançados aplicados em tratamentos de desinfecção	48
1.6. Materiais semicondutores bioinspirados	64
1.7. Crescimento de filmes semicondutores de W/WO_3 pelo uso de moldes sintéticos (<i>templates</i>)	66
2. OBJETIVO	68
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	69
3.1. Materiais e reagentes mais utilizados.....	69
3.1.1. Obtenção do efluente e dialisato.....	69
3.1.2. Obtenção das Cepas de <i>C.parapsilosis</i>	69
3.2. Procedimento experimental	70
3.2.1. Preparo dos eletrodos Bioinspirados de W/WO_3	70
3.2.1.1. Preparo de eletrodo de W/WO_3 por eletrodeposição	70
3.2.1.2. Biofilmes de <i>C. parapsilosis</i>	71
3.2.1.3. Eletrodeposição dos filmes de WO_3 nos eletrodos com biofilme de <i>C.</i> <i>parapsilosis</i>	71
3.2.1.4. Modificação dos eletrodos de W/WO_3 com Ag	72
3.2.2. Preparo dos eletrodos de W/WO_3 por moldes sintéticos.....	72
3.2.2. Determinação da concentração de prata	73
3.2.3. Caracterização dos eletrodos	74
3.2.4. Medidas fotoeletrocatalíticas, fotocatalíticas e fotolíticas	74

Sumário

3.2.4.1.	<i>Preparo das suspensões e crescimento dos Biofilmes de C. parapsilosis para degradação fotoeletrocatalítica</i>	74
3.2.4.2.	<i>O reator fotoeletrocatalítico</i>	75
3.2.5.	<i>Avaliação da eficiência dos métodos de tratamento</i>	76
3.2.5.1.	<i>Contagem microbiana</i>	77
3.2.5.2.	<i>Carbono orgânico total (COT)</i>	77
3.2.5.3.	<i>Formação de cloroativo</i>	78
3.2.5.4.	<i>Formação de espécies organocloradas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas</i>	78
3.2.5.5.	<i>Medidas de pH, condutividade, turbidez e demanda química de oxigênio (DQO)</i>	79
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
4.1.	Caracterização morfológica e eletroquímica dos eletrodos de W/WO₃	80
4.1.1.	<i>Eletrodos Bioinspirados de W/WO₃</i>	80
4.1.2.	<i>Eletrodos bioinspirados W/WO₃-Ag</i>	92
4.1.3.	<i>Eletrodo de W/WO₃ feito por template sintéticos de poliestireno</i>	97
4.2.	Medidas fotolíticas, fotocatalíticas e fotoeletrocatalíticas	106
4.2.3.	<i>Aplicação dos eletrodos bioinspirados de W/WO₃</i>	106
4.2.3.1.	<i>Reações fotoeletrocatalíticas realizadas utilizando dialisato como suporte e microrganismo na sua forma planctônica</i>	106
4.2.3.1.1.	<i>Otimização de parâmetros para um melhor desempenho fotoeletrocatalítico</i>	107
4.2.3.1.1.1.	<i>Efeito do potencial aplicado</i>	107
4.2.3.1.1.2.	<i>Efeito do tempo de tratamento fotoeletrocatalítico</i>	109
4.2.3.1.1.3.	<i>Influência da concentração de C. parapsilosis no processo de desinfecção fotoeletrocatalítica</i>	110
4.2.3.1.3.	<i>Avaliação da formação de Cloro ativo pelo método DPD durante processo fotoeletrocatalítico</i>	115
4.2.3.2.	<i>Avaliação da formação de espécies organocloradas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM)</i>	117
4.2.3.4.	<i>Estudo da Influência da radiação visível na degradação de C. parapsilosis na sua forma livre em meio de dialisato</i>	124
4.2.3.5.	<i>Aplicação dos eletrodos bioinspirados de W/WO₃ na desinfecção do dialisato na presença de biofilmes</i>	126

Sumário

4.2.3.5.1. Comparação entre luz UV/Vis e visível na degradação fotoeletrocatalítica dos biofilmes de <i>C. parapsilosis</i>	127
4.2.3.5.2. Comparação entre as técnicas de fotoeletrocatalise, fotocatalise e fotólise na desinfecção de degradação dos biofilmes de <i>C. parapsilosis</i>	128
4.2.3.6. Aplicação dos eletrodos bioinspirados de W/WO ₃ em efluentes hospitalares provenientes do processo de hemodiálise	130
4.2.3.6.1. Efeito do pH na degradação fotoeletrocatalítica de <i>C. parapsilosis</i> na presença do efluente proveniente do processo de hemodiálise	133
4.2.4. Aplicação dos eletrodos bioinspirados de W/WO ₃ -Ag na degradação fotoeletrocatalítica de <i>C. parapsilosis</i> na presença de dialisato e efluente	138
5. FUTUROS EXPERIMENTOS	146
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	147
CAPÍTULO 2	150
1. INTRODUÇÃO	150
1.1. Detecção de <i>Legionella</i> em amostras ambientais	154
1.2. Biossensores e imunossensores aplicados à detecção de bactérias	156
1.3. Espectroscopia de impedância eletroquímica aplicada ao desenvolvimento de Imunossensores	164
2. OBJETIVO	170
3. MATERIAIS E MÉTODOS	171
3.1. Reagentes e Equipamentos	171
3.2. Imobilização do Anticorpo monoclonal anti- <i>Legionella</i> na partícula magnética (MP)	172
3.3. Ensaio ELISA e magneto-ELISA	173
3.4. Magneto Imunossensor impedimétrico	174
3.4.1. Construção do eletrodo Grafite-Epóxi	174
3.4.2. Otimização do magneto-Imunossensor impedimétrico	175
3.5. Microscopia Confocal	176
3.6. Aplicação do método propostos para determinação de <i>L. pneumophila</i> em amostras ambientais e hospitalares	177
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	178
4.1. Caracterização das partículas magnéticas modificadas com anticorpo monoclonal LPS por microscopia confocal	178

Sumário

4.2. Ensaio ELISA e Magneto-ELISA para a detecção de <i>L. pneumophila</i>	179
4.2.1. Otimização Ensaio ELISA	180
4.2.3. Desenvolvimento magneto-imunossensor eletroquímico por Espectroscopia de impedância eletroquímica	193
4.2.3.1. Otimizações parâmetros EIS	193
4.2.3.2. Otimização das etapas de construção do imunossensor	197
4.2.3.4. Determinação do Circuito equivalente	203
4.2.3.6. Aplicação do imunossensor em determinação de legionella em amostra de água	207
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	209
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	210

1. INTRODUÇÃO GERAL

A água é um bem de grande relevância à vida na Terra, uma vez que esta atende desde as necessidades básicas do homem para sobrevivência até a sua aplicação em atividades correlacionadas a sua qualidade de vida, tais como fonte de energia, obtenção de matéria prima de produção e via de transporte. De acordo com a portaria número 36 do Ministério da Saúde (2011), para a água ser considerada como potável e adequada para o consumo humano é necessário obedecer a parâmetros físicos, químicos, microbiológicos e organolépticos pré-estabelecidos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Dentre estes, os parâmetros microbiológicos influenciam a saúde diretamente e por isso não devem ser negligenciados. Desta forma, sabe-se que o uso inadequado da água coloca em risco o seu consumo pela contaminação direta e indireta por microrganismos patógenos (MACHADO, 2006).

Em relação ao uso da água no nicho hospitalar, um problema que tem despertado a atenção é a ocorrência de patologias em pacientes hemodialisados decorrente do uso de águas contaminadas. Esta tem sido, por exemplo, a segunda causa de morte em pacientes renais crônicos, que tem desenvolvido doenças infecciosas pelo uso de dialisatos não totalmente livres de microrganismos (GOLDBLUM, E.S.; REED, 1980). Entre estes, destaca-se a preocupação com microrganismos pertencentes ao Reino *Fungi*.

Adicionalmente, os hospitais em geral constituem um grupo importante de fontes de poluentes oriundos das atividades laboratoriais e de pesquisa, diagnósticas, além da excreção de medicamentos dos pacientes, os quais podem incluir componentes ativos de medicamentos e metabólitos, produtos químicos, resíduos de produtos farmacêuticos, marcadores radioativos, meios de contraste iodados, além do grande índice de microrganismo e espécies patogênicas como fungos (MACHADO et al., 2014). O descarte de resíduos hospitalares e de águas residuais, especialmente aqueles que não possuem o tratamento devido, pode culminar na exposição da sociedade, aumentando dessa maneira o risco de infecção. Em particular, no contexto da pandemia de COVID-19 em todo o mundo, é de grande importância reduzir os riscos à saúde do público e do meio ambiente. Portanto, é necessário desinfetar e descartar adequadamente os resíduos

Introdução Geral

hospitalares e as águas residuais antes de serem transportados ou descarregados (WANG et al., 2020).

Além disso, os efluentes líquidos gerados por hemodiálise possuem um significativo impacto sobre o meio ambiente devido à sua elevada condutividade e salinidade. No entanto, o risco resultante do seu descarte em corpos de água permanece subexplorado. É evidente que a poluição pode ser substancialmente reduzida por meio do reuso de água. Além disso, a limitação do descarte pode indiretamente ajudar na manutenção da qualidade da água (TARRASS; BENJELLOUN; BENJELLOUN, 2008). A contaminação dos corpos hídricos pode suceder através de diferentes fontes de contaminação destes, um dos tipos de contaminação pode ser atribuído ao descarte de efluentes com alto poder poluidor, os quais são descartados diretamente sem nenhum tipo de tratamento preliminar em rios ou sistema de tratamento de esgotos sem a capacidade adequada para o tratamento deste tipo de efluente (AGAR et al., 2008).

Além da qualidade da água, um grande fator importante relacionado à saúde e bem estar das pessoas é a qualidade do ar. A partir da década de 70, observou-se um aumento gradual de pessoas trabalhando em ambientes fechados como escritórios e edifícios comerciais (SEPPANEN; FISK, 2002). O ambiente normalmente é refrigerado/aquecido por sistemas de ar condicionado, onde a circulação e distribuição rotineiramente é feita através de dutos que passam por um equipamento central. Tais dutos possibilitam a circulação constante do ar dentro do edifício, resultando em pouca renovação do ar e acúmulo de agentes tóxico, culminando em danos à saúde.

Estudos apontam que a qualidade do ar influencia no rendimento, bem estar e temperamento das pessoas enquanto desenvolvem suas atividades, dessa forma, a manutenção de um ambiente saudável acarretará repercussões positivas tanto à produtividade, quanto à saúde do ser humano (CARDOSO, 2016). Os contaminantes biológicos atmosféricos ainda são pouco investigados e podem causar doenças por transmissão aérea. Sendo assim, indubitavelmente, a ocorrência de microrganismos em suspensão no ar pode configurar um fator de risco às pessoas expostas. De acordo com MORAWSKA (2006) dentre os diversos contaminantes biológicos presentes nos ambientes internos estão os vírus (influenza, varicela), os fungos (em especial aos

Introdução Geral

pertencentes ao gênero *Aspergillus*) e as bactérias, com destaque para *Mycobacterium* e *Legionella*.

Diante desta conjuntura, para explicitar de maneira mais profunda e propiciar a resolução das problemáticas, a presente tese encontra-se dividida em dois capítulos. No primeiro capítulo é abordado o desenvolvimento de eletrodos de W/WO₃ e W/WO₃-Ag com diferentes morfologias aplicados para a desinfecção do dialisato e dialisado provenientes da hemodiálise, contaminados com *Candida parapsilosis*. Já no segundo capítulo, o desenvolvimento de métodos baseados em ensaios imunológicos para a identificação e quantificação de *Legionella pneumophila* é explanado.

Capítulo 1:

Eletrodos bioinspirados de WO_3 e $\text{WO}_3\text{-Ag}$ aplicados na melhoria da qualidade química e microbiológica do dialisato antes e após o processo de hemodiálise.

1. REVISÃO DA LITERATURA E ESTADO DA ARTE

1.1. Fungos: Uma abordagem geral sobre este Reino

A ocorrência de sepse em pacientes hemodialisados decorrente do uso de águas contaminadas é um problema emergente. Como já salientado, esta tem sido, por exemplo, a segunda causa de morte em pacientes renais crônicos, os quais tem desenvolvido doenças infecciosas pelo uso de dialisato, solução salina utilizada na hemodiálise, não totalmente livre de microrganismos (GOLDBLUM, E.S.; REED, 1980; MONTANARI et al., 2009; REYES, 2016). Um fato verídico que constata tal afirmação é o acidente ocorrido no Instituto de Doenças Renais (IDR) em Caruaru, PE, durante o mês de fevereiro de 1996. Esse evento transformou a história e a prática clínica da hemodiálise devido à contaminação da água utilizada para hemodiálise com microcistina-LR, uma toxina produzida por cianobactérias, causando a morte de 65 pacientes e possibilitando o aumento do rigor da comunidade médica e civil quanto à qualidade química e microbiológica dos fluidos utilizados para estes fins (SANCHES, S. M.; VIEIRA, E.M.; PRADO, E. L.; BENETTI; TAKAYANAGUI, 2007). Além das cianobactérias e bactérias, é válido ressaltar que os microrganismos pertencentes ao Reino *Fungi* merecem atenção devido ao alto grau de virulência de muitas espécies componentes do reino (PIRES et al., 2016b).

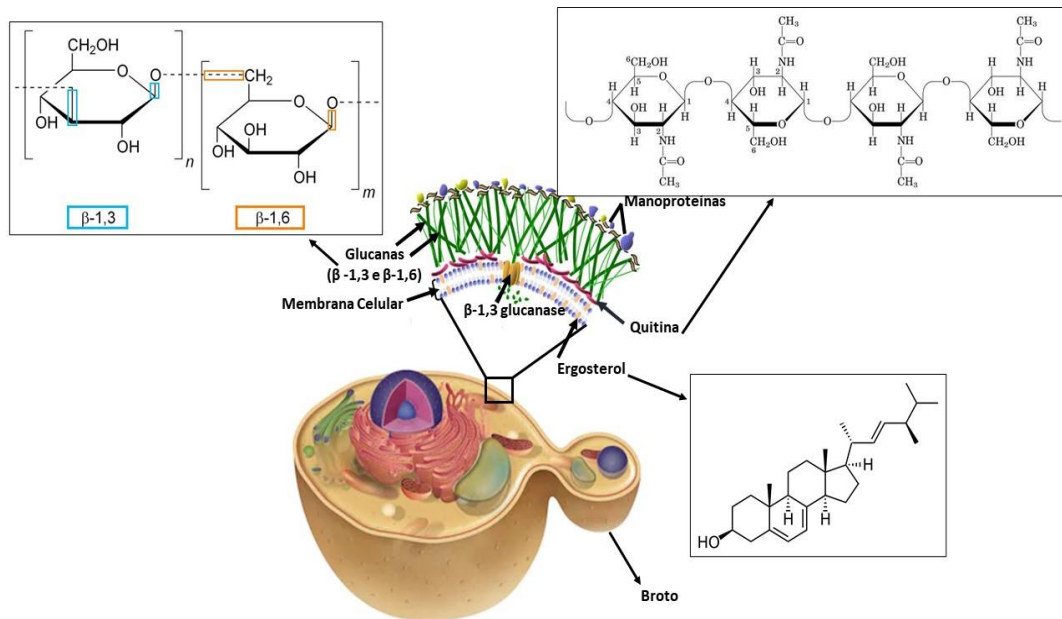
Desta maneira, no Reino *Fungi*, a espécie *Candida albicans* constitui o agente etiológico mais isolado em ambientes hospitalares, e em segundo lugar encontra-se *Candida parapsilosis*. Tal espécie apresenta várias características biológicas, sendo algumas relacionadas com a sua virulência, devido a sua facilidade em formar biofilmes nos dispositivos médicos implantados, o que aumenta a sua adesão a estes equipamentos e contribui para a produção de enzimas extracelulares. Além disso, *C. parapsilosis* expressa diferentes fenótipos e possui a capacidade de proliferar na presença de concentrações elevadas de glicose e lipídios (SILVA, 2012). Embora *C. parapsilosis* seja muitas vezes considerado como um organismo menos virulento, quando comparado à *C. albicans*, foi dessa espécie o maior aumento na incidência desde 1990, o que vem despertando uma significativa atenção para esse patógeno emergente (NOSEK et al., 2009; TROFA; GÁCSER; NOSANCHUK, 2008).

Os fungos são classificados como organismos eucariontes que possuem membrana chamada de carioteca, responsável pela delimitação do núcleo celular. É de notório conhecimento que os fungos podem ser unicelulares, ou pluricelulares. A membrana plasmática nesses organismos possui características únicas por conter o ergosterol. Este é composto do tipo esterol e difere de animais (colesterol) e das plantas (fitosterol e β - sitosterol) pela estrutura e propriedades únicas (PELCZAR; CHAN; KRIEGEL, 2011). A Figura 1 representa esquematicamente a estrutura de uma célula fúngica genérica e seus principais constituintes.

Inicialmente quando foram descobertos, os fungos foram comparados aos vegetais, no entanto, são organismos que não possuem cloroplastos e nem clorofila em suas células, não possuindo assim a capacidade de realizar fotossíntese. São conhecidos como organismos heterotróficos, dessa maneira obtêm nutrientes por absorção, ou seja, lançam enzimas aos substratos onde colonizam e absorvem os nutrientes através da parede e membrana celular, formada pela bicamada lipídica (DEACON, 2006). Nas células dos fungos filamentosos, há a presença de um fluxo citoplasmático o qual permite a difusão de nutrientes solúveis possibilitando o metabolismo entre as células. Todos os fungos são eucariontes e podem ser unicelulares (leveduras, quitrídias), ou multicelulares. Normalmente possuem dois núcleos em suas células os quais podem ser visualizados pelo microscópio óptico empregando-se técnicas de coloração apropriadas (PELCZAR; CHAN; KRIEGEL, 2011)

As leveduras, organismos unicelulares, podem apresentar morfologia oval, arredondada ou alongada. A reprodução pode ocorrer por via assexuada (estado anamorfo), brotamento ou fissão de células somáticas. No processo de brotamento ocorre o surgimento de uma estrutura denominada blastoconídio (broto ou gema) na superfície da levedura, que se separa, formando uma nova célula. Todavia, cabe-se ressaltar que em alguns casos, pode ocorrer a permanência da célula filha à célula mãe e este gerar um novo blastoconídio. A repetição deste fenômeno culmina na formação de um arranjo de células que são separadas por uma constrição no septo, originando uma estrutura denominada de pseudo-hifa. É válido lembrar que as hifas não possuem constrição em sua estrutura e sim paredes celulares paralelas a seus septos. Há leveduras que se reproduzem sexuadamente (estado teleomorfo), como as ascoporogoneas, por exemplo (TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, 2000).

Figura 1: Célula fúngica com destaque para os envoltórios.



Fonte: Próprio autor.

Uma peculiaridade desses seres é a presença de parede celular, uma estrutura rígida e essencial para a sobrevivência de suas células. As leveduras e os organismos pluricelulares estão envolvidos pela parede celular, sendo esta, uma camada protetora externa, quimicamente diferente da parede celular encontrada nos vegetais ainda que possa exercer os mesmos tipos de funções (CARNEIRO, LUIZ C. ; JUNQUEIRA, 2005). A parede celular corresponde de 20 a 30% do peso seco da célula fúngica, com composição e dimensão variantes conforme as condições ambientais e/ou de cultivo laboratorial, sendo essa formação coordenada com o ciclo celular (IBRAHIM et al., 2009; KLIS; BOORSMA; DE GROOT, 2006) .

A composição química da parede celular possui uma complexidade significativa. Em sua grande maioria, é constituída principalmente por polissacarídeos, ligados ou não a proteínas ou lipídeos, polifosfatos e íons inorgânicos formando a matriz de cimentação. Ademais, a presença de Quitina, glucanas, galactomananas e proteínas são compostos mais freqüentes, apesar da quantidade variar entre as diferentes espécies de fungos (ADAMS, 2004).

Como já explicitado, os fungos foram agrupados em um único reino, Reino *Fungi*, por Whittaker em 1969, onde se procurou reunir todos os fungos com características típicas. ALEXOPOULOS et al. (1996) et al. propôs a classificação dos fungos que ainda é considerada pelos micologistas, apesar de já existir uma proposta mais recente conforme publicada por KIRK et al., (2008) que agrupa os fungos com base em estudos de biologia molecular. Entretanto, essa classificação ainda não é totalmente aceita entre os micologistas. Dentre as leveduras, encontram-se as espécies de *Candida*, pertencentes à divisão *ascomycota* capazes de causar inúmeras enfermidades ao homem (PELCZAR; CHAN; KRIEGEL, 2011).

1.2. O gênero *Candida* e a presença em hospitais

De acordo com a literatura, o gênero *Candida*, conforme já salientado, pertence ao Reino *Fungi*, Filo *Ascomycota*, Classe *Saccharomycetes*, Ordem *Saccharomycetales*, Família *Saccharomycetaceae* (GUARRO; GENÉ; STCHIGEL, 1999).

Pelo fato de possuírem dimorfismo invertido, as leveduras deste gênero crescem como leveduras durante a fase saprofítica e filamentam-se quando expostas a temperaturas em torno de 35°C e 37°C, com exceção de *C. glabrata*, o que é classificado como um organismo haplóide (BRANDT; LOCKHART; WARNOCK, 2011; TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, 2000). Em relação ao tipo de reprodução, em geral, microrganismos pertencentes a este gênero normalmente se apresentam como células individuais, podendo haver a formação de pseudo-hifas ou não, e se replicam de maneira assexuada por blastoporação e gemulação, esquema que pode ser visto na Figura 1 a formação do broto (SCHULZE; SONNENBORN, 2009).

Apesar de serem usados em várias áreas como gastronomia e produção de fármacos, desde os anos 80, os fungos surgiram como as principais causas de doenças humanas, especialmente entre indivíduos imunocomprometidos e os pacientes hospitalizados com condições subjacentes de gravidade elevada (WAINWRIGHT, 2008). Segundo TAMURA et al. (2007), as espécies pertencentes a este gênero correspondem a 80% das infecções fúngicas de origem hospitalar. Além disso, tais espécies constituem a quarta causa de infecções nosocomiais relatadas na literatura (BARADKAR et al., 2008). Embora *C. albicans* seja o agente mais prevalente de candidemia, infecção causada por

cândida spp., a epidemiologia da candidíase mudou nas últimas décadas. Em estudos epidemiológicos realizados no Brasil, leveduras pertencentes à espécie *C. parapsilosis* complexo além de *C. tropicalis* são as espécies NCAC mais frequentemente isoladas de hemoculturas (ALENCAR et al., 2017; MEDRANO et al., 2006).

A patogenicidade de *Candida* spp. pode ser atribuída a um conjunto de fatores de virulência, incluindo a capacidade de aderir ao epitélio bucal humano e células endoteliais, a transição de broto para pseudo-hifas (morfogênese, um fenômeno típico de *C. albicans* e *C. parapsilosis*), a produção de enzimas líticas (proteínases, fosfolipases e hemolisinas), a troca fenotípica, a formação de biofilme, muito comum em *C. parapsilosis*, e também a capacidade de evitar as células do sistema imunológico por diferentes mecanismos (LIN et al., 2015; TAMURA et al., 2007).

Em 1928, sucedeu o primeiro relato de *C. parapsilosis* quando Ashrford a isolou a partir das fezes de um paciente com diarreia em Porto Rico (ASHFORD, 1928; NUCCI et al., 2010) recebendo inicialmente o nome de *Monila parapsilosis* visto que era uma espécie semelhante à *Monila psilosis* (hoje conhecido como *Candida albicans*) sendo incapaz de fermentar maltose. De início, *C. parapsilosis* não foi considerado como patogênico, embora posteriormente tenha sido responsável por um caso fatal de endocardite em uma via intravenosa de um usuário de drogas em 1940. A partir daí, pesquisadores renunciaram a ligação de *C. parapsilosis* com instrumentação médica (TROFA; GÁCSEK; NOSANCHUK, 2008).

A espécie *C. parapsilosis* é um comensal humano normal, que é frequentemente isolado da pele da mão. Apresenta uma forma oval, redonda ou forma cilíndrica, sua cultura em Ágar Saboroud tem aspecto cremoso, branco, brilhante e suave. Embora seja um organismo comensal, sua patogenicidade é notória devido sua afinidade por materiais cateteres ou protéticos, capacidade de formar biofilme e capacidade de crescer em solução de hiperalimentação (LIN et al., 2015).

Até o ano de 2005, antes da publicação realizada por TAVANTI et al., (2005), a espécie *C. parapsilosis* constituía um complexo constituído por três grupos geneticamente distintos (grupo I, II e III). Atualmente, estes grupos foram renomeados em espécies diferentes estreitamente relacionadas entre elas: *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis*, e *C. metapsilosis* (TAVANTI et al., 2005). Adicionalmente, é de grande relevância pontuar que *C. parapsilosis* apresenta a facilidade em formar biofilmes nos

dispositivos médicos implantados, o que aumenta a sua adesão a tais equipamentos, contribuindo para a produção de enzimas extracelulares. Tal característica atrelada ao fato de que *C. parapsilosis* expressa diferentes fenótipos e possui a capacidade de proliferar na presença de concentrações elevadas de glicose e lipídios torna a mesma uma espécie virulenta (SILVA, 2012; SOUZA et al., 2017).

Em alguns casos, *C. parapsilosis* tem ultrapassado *C. albicans* entre as espécies que causam candidemia. O trabalho publicado por ALENCAR et al., (2017) mostra a ocorrência de *C. parapsilosis* em pacientes imunocomprometidos em um hospital na região Centro-oeste do Brasil, causando candidemia. Além disso, este trabalho apresenta aborda um problema bastante pertinente relacionado com o aumento da resistência antifúngica principalmente de espécies não *C. albicans*. Dessa maneira, o monitoramento contínuo com o uso de testes de sensibilidade é requerido ou até mesmo, maneiras de evitar contaminação por estas espécies. Outro estudo realizado aqui no Brasil em um hospital na cidade de Fortaleza no ano de 2006, verificou que das 50 culturas de sangue realizadas, 18 continham a presença de *C. parapsilosis*, enquanto que 14 cresceram *C. albicans* (MEDRANO et al., 2006).

Um estudo realizado na Espanha (BRANDT; LOCKHART; WARNOCK, 2011) revelou que os principais fatores de risco relacionados a infecção por *C. parapsilosis* incluem cateterismo vascular, história prévia de antibióticos, terapia imunossupressora, malignidade, recebimento de transplante e neutropenia. Uma quantidade significativa de trabalhos publicados na literatura descreve o surto de infecções por *C. parapsilosis* em unidades de terapia intensiva neonatal ou adulto. Métodos de tipagem epidemiológica revelaram uma ligação entre o transporte mecânico de *C. parapsilosis* dos profissionais de saúde e o patógeno para pacientes. Portanto, a infecção por este microrganismo está diretamente ligada à higiene das mãos por parte dos profissionais de saúde. (CLARK et al., 2004; HUANG et al., 1999; PAYAGALA et al., 2009; TROFA; GÁCSEK; NOSANCHUK, 2008)

Outro caso de ocorrência de *streptococos* sp. em hospitais é reportado CAPPELLI; TETTA; CANAUD (2005) no qual foi detectado a presença de biofilmes presentes no circuito hidráulico de máquinas de hemodiálise, particularmente nos setores de baixo fluxo, espaços mortos e ultrafiltros, com uma concentração microbiana na ordem de 1×10^3 a 1×10^6 células/cm² e nível de endotoxina na faixa de 1-10 EU/cm². Outro ponto de grande

relevância a ser citado é que a liberação de endotoxinas produzidas por esse microrganismo, constituintes da parede celular ou fragmentos de ADN no dialisato podem induzir a produção de citocinas integrantes da resposta autoimune (MONTANARI et al., 2009).

Como já explicitado nos parágrafos anteriores, muitas vezes conhecida como a “doença do doente”, a candidemia é conceituada como a infecção na corrente sanguínea causada por *Candida* sp., sendo responsável pela formação de micro abscessos renais hepatoesplênicos, endocardite, meningite, arite, osteomielite, dentre outros (BARBEDO; SGARBI, 2010; VALLE; RENDE; OKURA, 2010). Dessa maneira, a candidemia trata-se da maior causa de mortalidade de pacientes imunocomprometidos, entre eles os hemodialisados, os quais necessitam enormes quantidades de água potável para o funcionamento de “rins artificiais”, gerando uma grande quantidade de efluentes (ARRAES, 2012).

Diante desta conjuntura evidenciada, a completa retirada de microrganismos patogênicos do dialisato utilizado em sessões de hemodiálise é essencial para garantir o seu uso seguro. Para solucionar os problemas relacionados à presença de contaminantes biológicos tanto no dialisato quanto nos dispositivos médicos, usam-se os processos de desinfecção capazes de promover a inativação de microrganismos patogênicos.

Os processos químicos de desinfecção consistem na adição de agentes químicos como hipoclorito de sódio, dióxido de cloro, ozônio, peróxido de hidrogênio e permanganato de potássio em amostras de água. Dentre eles, o método mais convencional de desinfecção de água consiste no tratamento com hipoclorito de sódio e aplicação de radiação UV em questão. No caso de muitas estações de hemodiálise, este tratamento se dá com a administração de agentes a base de hipoclorito nos dispositivos empregados e aplicação de radiação UV na água a ser utilizada futuramente na diluição para dialisato. Contudo, tal atividade pode promover a formação de trihalometanos *in situ*, como por exemplo, o clorofórmio, apresentando alto risco à saúde humana por ser carcinogênico (SOUZA, 2015). Além disso, a administração dessas espécies está associada a um alto nível de resistência microbiana (YOU et al., 2019).

Devido às desvantagens inerentes à administração de cloro ativo em água para eliminação de microrganismos, diferentes alternativas de desinfecção de águas estão sendo propostas. Dentre estas, destacam-se os tratamentos baseados na aplicação direta

de energia na forma de calor, radiação ultravioleta, radiação ionizante, microondas, ultrassom e fotocatalise (IBGE, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Podemos ressaltar que em decorrência do seu baixo custo, alta eficiência no tratamento e compatibilidade ambiental, a desinfecção por métodos oxidativos avançados emergiu como uma alternativa promissora para a desinfecção primária e residual (PARAMASIVAM et al., 2012).

1.3. O processo de hemodiálise e a geração de efluentes

A hemodiálise é conceituada como um método purificador extracorpóreo no qual pacientes com doença renal crônica (DRC) são submetidos, o qual tende a remover os resíduos metabólicos, que são constituídos principalmente por água, solutos e espécies orgânicas excretada pelo organismo normalmente na urina (MOLLAHOSSEINI; ABDELRASOUL; SHOKER, 2020). O processo utiliza membranas semipermeáveis com vários mecanismos de separação para realizar a purificação do sangue e remover as toxinas urêmicas. Com base nos dados revelados para 2010, o número de pacientes com serviços de hemodiálise atingiu mais de 2 milhões de pessoas em todo o mundo e, de acordo com os modelos preditivos, esse número pode chegar a 4 milhões em 2030 (WALKER; HOWARD; MORTON, 2017).

Durante o processo de hemodiálise, o paciente é submetido ao tratamento utilizando a mistura das duas soluções uma ácida e outra básica, cuja composição está explicitada na Tabela 1 que são continuamente aspiradas, constituindo o banho de diálise e com pH resultante na faixa de 6,8 a 7,3.(SOUZA et al., 2019). Todo o processo é impulsionado por uma bomba de diálise presente no interior da máquina de diálise, a qual direciona o sangue ao dialisador, região onde esse é exposto ao dialisato separado por meio de uma membrana semipermeável de constituição polimérica, permitindo desta forma as trocas de substâncias entre o sangue e a solução de diálise, como pode ser visto na Figura 2.

Após ser retirado do paciente e passado pelo dialisador, o sangue é então devolvido ao paciente pelo acesso vascular. Desta maneira, cada paciente é exposto a volumes de água que variam de dezoito mil a trinta e seis mil litros de água por ano (MONTANARI et al., 2009). Portanto, se a água não for corretamente tratada, vários

contaminantes químicos e bacteriológicos possivelmente tóxicos poderão ser transferidos para o paciente, causando danos ao mesmo (SILVA, 2012).

Conforme verificado na Tabela 1, o dialisato é constituído por até 99% da água tratada em sistema de osmose reversa e adição posterior de produtos químicos, tais como sais de cloreto e carbonato (PIRES et al., 2016). Uma unidade de diálise de tamanho médio produz mais de um milhão de litros de efluente da hemodiálise como resíduo por ano. Em escala mundial, a produção de líquido de diálise é por volta de vinte e cinco milhões de litros, tornando este um dos maiores produtos por volume utilizado na medicina (NYSTRAND, 2008).

Tabela 1: Composição e concentração dos sais utilizados em uma máquina de hemodiálise.

Componentes	Solução básica (pH 7.5 a 8.2)	
	Concentração (mEq/L)	Quantidade (g/L)
NaCl	20	23.6
NaHCO ₃	39	65.9
H ₂ O		QS 1L
Solução ácida (pH 1.7 a 2.6)		
NaCl	80	172.20
KCl	02	5.50
CaCl ₂ .2H ₂ O	2.5	8.00
MgCl ₂ .2H ₂ O	1.0	3.72
H ₂ O		QS 1L

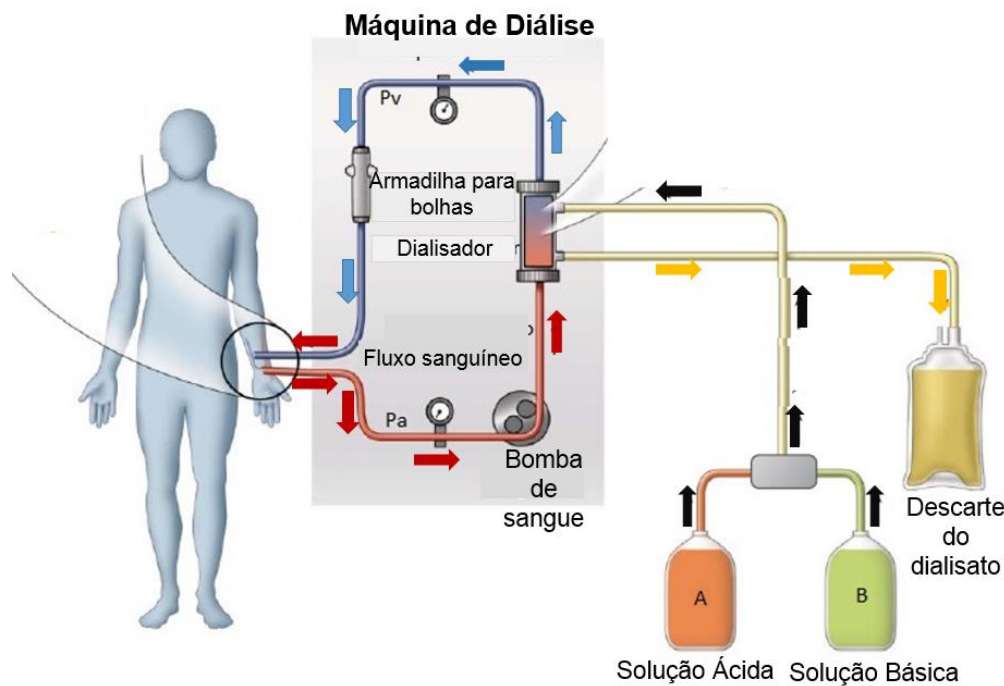
Fonte: Souza et al., 2017.

De maneira sucinta, pode-se dizer que o processo de hemodiálise contribui para a geração de dois problemas que carecem de atenção. O primeiro, já salientado, está associado à qualidade do fluido utilizado para a produção do dialisato. O segundo problema, nem sempre muito questionado, relaciona-se com a geração de um efluente complexo (GRANADO et al., 2011).

No ano de 2012, foi realizada uma extrapolação de dados com a finalidade de fazer uma breve estimativa em relação aos gastos de água em um processo de hemodiálise em uma escala mundial. Levando em conta uma população de 2 milhões de pacientes hemodialisados em todo o mundo, concluiu-se que aproximadamente 156 bilhões de litros de água são utilizados em todos os centros de serviços de diálise do mundo por ano e que aproximadamente um terço desse volume é descartado após o processo de hemodiálise (AGAR et al., 2008). Isto é um problema de grandes proporções se considerarmos que a água contendo o dialisato troca toxinas com o sangue por meio de uma membrana, podendo conter diversos tipos de contaminações oriundas dos resíduos biológicos.

Além disso, os efluentes líquidos gerados por hemodiálise possuem um significativo impacto sobre o meio ambiente devido à sua elevada condutividade e salinidade. No entanto, o risco resultante do seu descarte em corpos de água permanece ainda é um desafio. É evidente que a poluição pode ser substancialmente reduzida por meio da reciclagem de água. Além disso, a limitação do descarte pode indiretamente ajudar na manutenção da qualidade da água (TARRASS; BENJELLOUN; BENJELLOUN, 2008).

Figura 2: Ilustração do processo de hemodiálise



Fonte: Adaptado de <http://www.medicinanet.com.br/> acessado em 07/02/015.

A contaminação dos corpos hídricos pode suceder através de diferentes fontes de contaminação destes, um dos tipos de contaminação pode ser atribuído ao descarte de efluentes com alto poder poluidor, os quais são descartados diretamente sem nenhum tipo de tratamento preliminar em rios ou sistema de tratamento de esgotos sem a capacidade adequada para o tratamento deste tipo de efluente (PETRIE; BARDEN; KASPRZYK-HORDERN, 2014)

A maioria dos hospitais e centro de hemodiálises no Brasil não possuem espaços físicos disponíveis ou recursos financeiros para investir na implantação de estruturas que possam tratar os efluentes líquidos gerados durante a prestação dos serviços hospitalares. De forma que os hospitais possam atender os padrões aceitáveis, minimizando os impactos sobre as redes de drenagem superficial e subterrânea, os órgãos reguladores, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), decidiram transferir essa responsabilidade e adiar as medidas que solucionariam este problema (VECCHIA et al., 2012). Diante os fatos salientados até então, é de grande relevância conhecer as características físico-químicas e toxicológicas

do dialisato antes e após o processo de hemodiálise, bem como buscar novas soluções para o tratamento do dialisato utilizado no processo de hemodiálise bem como dos efluentes produzidos após o processo.

1.4. Processos oxidativos avançados aplicados em tratamentos de desinfecção

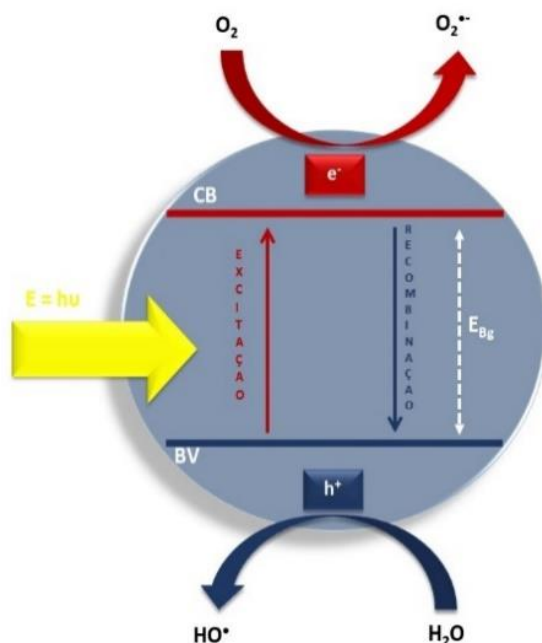
No trabalho realizado por GLAZE; KANG; CHAPIN, (1987), os processos oxidativos avançados (POAs) foram inicialmente propostos para o tratamento de água potável, sendo assim definidos como “processos de tratamento de água à temperatura sob pressão ambiente que envolvem a geração de radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$) em quantidade suficiente para realizar a purificação da água “. O conceito foi posteriormente estendido à oxidação envolvendo outras espécies radicalares como exemplo: radicais sulfato também (GAUTAM; KUMAR; LOKHANDWALA, 2019)

Os POAs usam fortes agentes de oxidação, como radical hidroxila, ozônio (O_3), radical superóxido (O_2^-) com a finalidade de degradar poluentes orgânicos (CARDOSO; BESSEGATO; ZANONI, 2016; CHANG et al., 2009; NOGUEIRA; JARDIM, 1998; SHAH, 2020). De acordo com as diferentes formas usadas para produzir agentes de oxidação, os POAs podem ser classificados em oxidação de Fenton, oxidação fotocatalítica, oxidação eletroquímica e assim por diante (GAUTAM; KUMAR; LOKHANDWALA, 2019).

O fundamento básico dos métodos POAs consiste na geração de radicais hidroxilas via reações catalisadas pela ação da luz ou substâncias químicas presentes no meio reacional. Em consequência da alta reatividade ($E^\circ = 2,8 \text{ V}$ contra o eletrodo padrão de hidrogênio/ENH), o radical hidroxila pode promover a oxidação de uma infinidade de compostos orgânicos e culminar a morte de microrganismos (BESSEGATO et al., 2015; PIRES et al., 2016). Sendo assim, a geração de radicais hidroxila é um passo crucial para a eficiência dos processos oxidativos avançados (KECSENOVITY et al., 2016; NOGUEIRA, R. F. P.; JARDIM, 1998). Estas espécies podem ser formadas, por exemplo, através da oxidação da água na sobre a superfície de, um semicondutor fotoexcitado, como mostrado na Figura 3.

O princípio básico da fotocatalise heterogênea (Figura 3) é a ativação de um material semiconductor, como por exemplo, TiO_2 ou WO_3 por irradiação de luz. Um semiconductor é um material que possui propriedades de condução elétrica intermediárias entre aquelas inerentes a um material condutor e isolante. Bandas de valência (BV) e bandas de condução (BC) são características de materiais semicondutores e a região localizada entre essas bandas é denominada como “*band gap*” (E_{Bg}). Segundo a teoria de bandas, em um material semiconductor, os orbitais atômicos estão tão próximos ao ponto que suas sobreposições geram regiões contínuas de energia, formando assim as conhecidas bandas eletrônicas de energia (FINKLEA, 1988).

Figura 3: Representação esquemática de um semiconductor fotoexcitado.



Fonte: Próprio autor.

A fotocatalise heterogênea pode ser caracterizada como uma tecnologia verde baseada em processos avançados de oxidação (AOPs) e vem chamando a atenção devido às suas possíveis aplicações no contexto ambiental (NOSAKA; NOSAKA, 2017). Nesse processo, os materiais fotocatalíticos são submetidos a foto-excitação por luz UV, visível ou infravermelha, os elétrons (e^-) na banda de valência (BV) do semiconductor são então excitados para a banda de condução (BC), gerando buracos (h^+) na banda de valência. Os

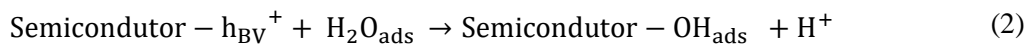
pares elétron/buraco formados participam dos processos redox em cascata, levando a mineralização da matéria orgânica (MARTÍNEZ-HUITLE; BRILLAS, 2009).

Com base no princípio da fotocatalise, o buraco gerado na superfície do fotocatalisador realiza a oxidação de espécies orgânicas adsorvidas na superfície do semicondutor e/ou a oxidação de água, sendo a adsorção desta última responsável pela formação de radical hidroxila, o qual pode atuar na degradação do material orgânico presente. Sendo assim, diferentes mecanismos podem ser propostos:

- i) A matéria orgânica (MO), como a parede celular de um microrganismo, por exemplo, adsorve na superfície do fotocatalisador, sendo oxidada pelo buraco formado na banda de valência (h^+), formando um cátion o qual pode reagir rapidamente com o oxigênio (ANDREOZZI et al., 1999):



- ii) A depender de algumas variáveis do sistema como o semicondutor escolhido, pH do sistema, a água adsorvida sobre a superfície é oxidada a radicais hidroxila através do buraco formado na banda de valência (ANDREOZZI et al., 1999). Como mencionado anteriormente, o radical hidroxila tem um alto poder de oxidação e pode promover a oxidação das espécies presentes no sistema, subsequentemente;



- iii) Outras espécies de radicais de oxigênio podem ser formadas no meio reacional devido à captura de elétrons fotogerados no cátodo, originando um processo de oxidação secundário (LINSEBIGLER; LU; YATES, 1995):





A formação dos buracos na banda de valência, bem como a formação das espécies radicalares são importantes na inativação de uma ampla gama de micróbios transmitidos pela água através de um simples mecanismo redox fotocatalítico (LÓPEZ; GÓMEZ, 2012).

MATSUNAGA et al., (1985) foram os pioneiros a utilizar fotocátalise empregando eletrodos de TiO_2 para a inativação de *Escherichia coli*, *Lactobacillus acidophilus* e *Saccharomyces cerevisiae*. Eles comunicaram à sociedade científica um novo conceito para esterilização fotoquímica utilizando partículas de platina suportadas sobre dióxido de titânio, TiO_2/Pt . De acordo com o autor, a Co-enzima A presente nas células é oxidada pelos radicais formados, promovendo a inibição da atividade respiratória do microrganismo e consequente a morte celular. Diante desta premissa, suspensões de *Saccharomices cerevisiae*, *Lactobacilus acidophilus* e *Escherichia coli* foram incubadas em um reator fotoquímico juntamente com as partículas de TiO_2/Pt e Co-A, resultando em uma diminuição da concentração de Co-A concomitantemente à inativação dos microrganismos. Desde então, vários fotocatalisadores foram avaliados para atividades antimicrobianas contra bactérias, vírus, fungos, algas e protozoários. (LIOU; CHANG, 2012).

O trabalho divulgado por CHO et al. (2004) avalia a presença de uma correlação linear entre a concentração do radicais $\bullet\text{OH}$ e inativação de *E. coli* sob tratamento por fotocátalise usando eletrodos de TiO_2 . Sabe-se que as espécies reativas de oxigênio (EROs) e radicais $\bullet\text{OH}$ são os radicais livres que desempenham o papel de promover as reações radicalares subsequentes, culminando na degradação da matriz orgânica presente no meio reacional. Todavia, há alguma controvérsia sobre a atuação dos principais fotooxidantes (buraco ou radical hidroxila). No entanto, a maioria dos trabalhos sugere que os radicais hidroxilas formados pela oxidação da água são as espécies oxidantes primárias responsáveis pela inativação de *E. coli* no processo de fotocátalise (SOUZA, 2015).

Recentes esforços na pesquisa envolvendo fotocátalise e desinfecção concentraram-se na fotocátalise usando co-catalisadores a base de nitreto de carbono ($\text{g-C}_3\text{N}_4$), fulerenos, nanotubos de carbono e óxido de grafeno, que aumentam a área superficial específica e favorece a maior mobilidade de espécies transportadoras de carga

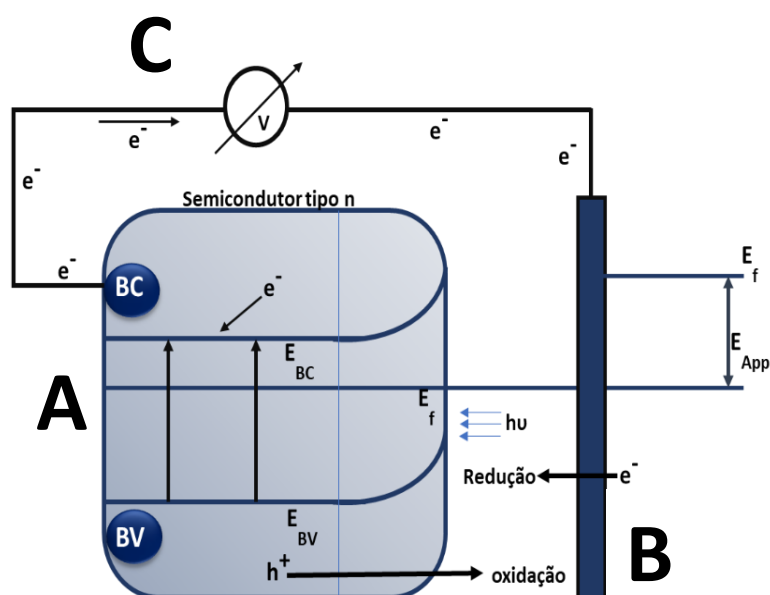
(MOKHTAR MOHAMED; OSMAN; KHAIROU, 2015). O uso de fotocatalisadores hibridizados com um sistema π conjugado foi estabelecido como um meio eficaz para aumentar a eficiência fotocatalítica do semiconductor. O g-C₃N₄ é isento de metais e robusto, possui um intervalo de banda moderado de 2,7 eV, podendo até ser fotoexcitado na região do visível, adicionando vantagens como não toxicidade, boa fotoestabilidade e melhoramento nas propriedades estruturais do sistema, além do baixo custo. Ultimamente, um grande interesse foi focado na formação de heterojunções de g-C₃N₄ com TiO₂, estendendo a banda de absorção do material para a região do visível. Por exemplo, LI e colegas de trabalho (2015) estabeleceram que o híbrido g-C₃N₄/TiO₂, formado por microesferas de TiO₂ recobertas com g-C₃N₄ lamelar, apresentou excelente eficiência fotocatalítica para a inativação de *E. coli*, devido à absorção aprimorada de luz visível e melhoramento na separação de carga (LI e colaboradores, 2015).

De acordo com os exemplos anteriores, a oxidação fotocatalítica é uma boa opção para a desinfecção de água. Contudo, o seu desempenho é muito limitado justamente pela rápida recombinação do par elétron-buraco (e/h^+), resultando na liberação de calor. Dessa maneira, a velocidade de fotodegradação pode ser afetada e conseqüentemente diminuída por adsorções superficiais, baixa transferência de carga, baixo transporte de reagente ou produto gerado na superfície do semiconductor e recombinação das cargas fotogeradas em sistema onde o catalisador está suportado em um substrato. Tal limitação corrobora com uma pequena eficiência quântica para a geração de radicais na superfície do semiconductor, que em torno de aproximadamente 4%. Como uma primeira aproximação, a origem do baixo rendimento quântico é a velocidade de recombinação entre elétrons e buracos em relação à transferência de carga a aceptores em solução (BRUGNERA, 2013; SOUZA et al., 2017).

Para atender a necessidade de melhorar a eficiência do processo fotocatalítico, diversas metodologias são adotadas tais como: uso de dopantes, agentes de sacrifício e fotoeletrocatalise (FEC). Esta última consiste na introdução de um potencial de polarização no ânodo revestido com o fotocatalisador (BYRNE; EGGINS, 1998; WALDNER et al., 2003). A fotoeletrocatalise (FEC) é um processo que envolve a formação de radicais hidroxila e consiste na introdução de um potencial de polarização no ânodo, revestido com o fotocatalisador. A Figura 4 resume graficamente um reator

fotoeletroquímico. Isto é, quando o semiconductor é submetido a um gradiente de potencial simultaneamente à fotoradiação, há um entortamento de bandas na interface semiconductor/eletrólito e os buracos são direcionados prioritariamente para a superfície, paralelamente ao direcionamento do fluxo de elétrons gerados pela irradiação de luz para o cátodo, promovendo a minimização da combinação entre os buracos (h^+) originados na banda de valência e os elétrons presentes na banda de condução do semiconductor em questão (BESSEGATO et al., 2015). A oxidação da água pelos buracos gerados pode formar radicais hidroxilas ($\cdot OH$) com alto poder oxidante (FINKLEA, 1988) e atua preponderantemente na destruição da parede celular dos microorganismos. Dentro deste contexto, investigar a potencialidade da fotoeletrocatalise como alternativa para a inativação de microrganismos (BRUGNERA et al., 2012; KIM et al., 2019; SOUZA et al., 2017), principalmente o reino fungo pode ser altamente relevante, principalmente em sistemas para tratamento de agua de hemodiálise.

Figura 4: Representação esquemática de um reator fotoeletrocatalítico usando um semiconductor tipo n sob irradiação de luz. principais constituintes são: (A) fotoânodo, (B) cátodo e (C) potenciostato.



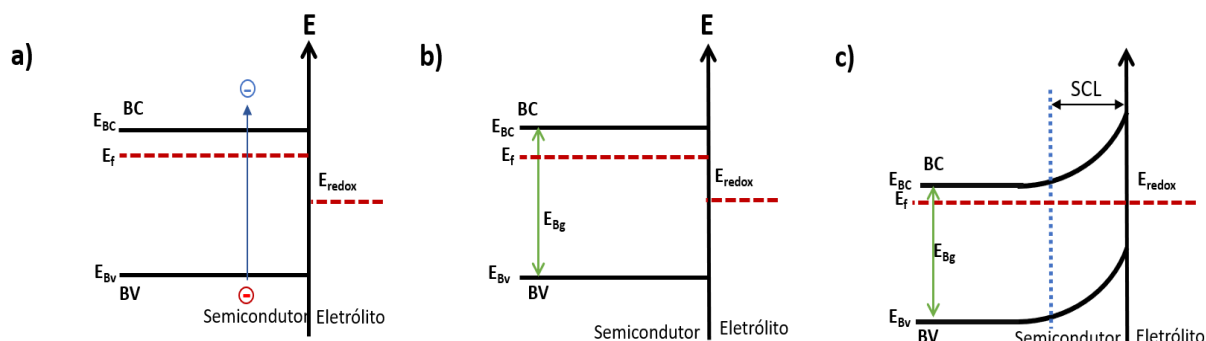
Fonte: Próprio autor.

Para entender um processo fotoeletrocatalítico, é importante rever os conceitos relacionados a um semicondutor. Uma propriedade importante em um material semicondutor é a posição do nível de Fermi, que pode ser descrito termodinamicamente como o potencial eletroquímico de elétrons em uma fase física em especial. Estatisticamente, o nível de Fermi trata-se da energia na qual a probabilidade de se encontrar um elétron é 0,5. Dessa maneira, para um semicondutor se tornar condutor, é necessário realizar a formação de portadores de carga nesse material através de algum tipo de excitação, como a fotoexcitação, por exemplo. Ao ser excitado com uma luz de conteúdo energético superior ao *band gap* ($h\nu \geq E_{Bg}$), promove-se a geração do par elétron/buraco devido a passagem do elétron da BV para BC, como descrito na Equação 5 (BESSEGATO, 2017).



Nesta condição na interface do semicondutor/eletrólito há a formação de uma junção, conhecida como junção de Schottky. Para estabelecer o equilíbrio entre essas duas fases, os potenciais eletroquímicos das espécies envolvidas tendem a se igualar e neste processo, haverá um movimento de cargas entre as duas fases existentes. O potencial eletroquímico do eletrólito é determinado pelo potencial redox da solução eletrolítica e o potencial eletroquímico do semicondutor é designado pelo seu nível de Fermi. Em circuito aberto, um eletrodo do tipo n apresenta o nível de Fermi é geralmente mais elevado que o potencial redox da solução eletrolítica, criando-se um acúmulo de carga positiva na região denominada carga espacial, refletindo em um entortamento de banda para cima na região de interface. A dimensão desse entortamento depende da diferença entre os valores do nível de Fermi do semicondutor e potencial redox do eletrólito (BESSEGATO et al., 2015; RAJESHWAR, 2007), como pode ser visto na Figura 5c.

Figura 5: Representação esquemática do diagrama de energia em um semicondutor do tipo n. Em (a) encontra-se o mecanismo de geração de carregadores de carga por fotoexcitação; (b) e (c) evidenciam as bandas energéticas antes e após contato com um eletrólito redox



Fonte: Próprio autor.

A região onde ocorre esse entortamento de bandas na superfície do material semicondutor é denominada de camada de depleção ou camada de carga espacial (do inglês *space charge layer* (SCL)), conhecida pelo esgotamento dos portadores de cargas majoritárias (BESSEGATO, 2017).

O uso de materiais semicondutores em reações químicas é bastante limitada em decorrência da baixa eficiência fotônica ocasionada pela considerável taxa de recombinação dos pares elétron/buraco formados, como evidenciado na Equação 6 (BESSEGATO, 2017; LINSEBIGLER; LU; YATES, 1995; RAJESHWAR, 2007):

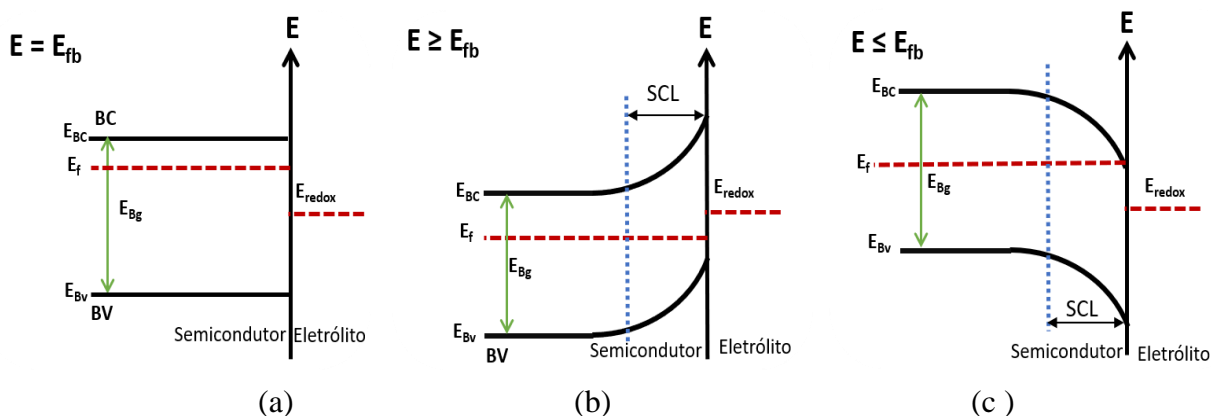


Na fotoeletrocatalise o material semicondutor é ancorado em uma superfície condutora (substrato), sendo constituído assim o fotoeletrodo, onde além da fotoexcitação pela luz é possível concomitante a aplicação do potencial externo. Ambos atuam no entortamento de bandas, aumentando assim a separação das cargas na interface (camada de depleção,) culminando na maior concentração dos agentes oxidantes na superfície do eletrodo. A magnitude do entortamento de bandas na interface dependerá do potencial aplicado e do tipo de semicondutor utilizado.

Assim, para um eletrodo do tipo n, como o WO_3 deve-se levar em consideração três eventuais situações descritas na Figura 6.

- i) Figura 5a o potencial aplicado é igual ao potencial de circuito aberto (OCP). O potencial (E_{fb}) é a condição chamada de banda plana ou *flat band* onde não há transferência de cargas;
- ii) Figura 5 b, o potencial aplicado é maior que o potencial de banda plana, promovendo um aumento no entortamento de bandas, sendo os elétrons esgotados e os buracos disponíveis na superfície do semiconductor;
- iii) Figura 5c, sob potenciais mais negativos que o E_{fb} , haverá um excesso de portadores de carga majoritários, sendo a SCL denominada de camada de depleção.

Figura 6: Comportamento de um semiconductor do tipo n quando submetido a potencial de: (a) $E = E_{fb}$; (b) $E > E_{fb}$ (formação da camada de depleção); e (c) $E < E_{fb}$ (formação da camada de acumulação).



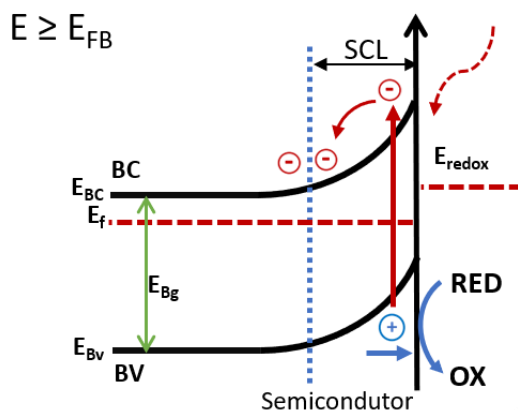
Fonte: Próprio autor.

Em reações deste caráter conduzidas no escuro, a capacidade de transferência de carga do semiconductor vai estar unicamente relacionada com a formação da camada de depleção ou acumulação originada. Na situação descrita em iii anteriormente, culminando na formação da camada de acumulação, o comportamento do semiconductor será

equivalente a um eletrodo metálico, uma vez que haverá um excesso dos portadores de carga majoritários disponíveis para transferência de carga. Em contrapartida, em uma situação descrita pelo item ii, ter-se-á o surgimento da camada de depleção, com uma baixa quantidade de portadores de carga, dificultando a cinética do processo envolvido. Porventura, se o eletrodo é exposto a uma radiação eletromagnética suficiente para promover a fotoexcitação dos elétrons presentes da camada de valência, estes serão fotoexcitados para a banda de condução. Se este processo sucede no interior do semicondutor, a recombinação elétron/buraco é predominante, concomitantemente com a produção de calor. Todavia, se ocorrer na região de carga espacial, o campo elétrico gerado promoverá a separação de cargas, sendo os buracos direcionados para a interface semicondutor/eletrólito. Tais buracos fotogerados são altamente reativos, atuando de modo a promover a oxidação de moléculas passíveis de sofrer oxidação, situação explicitada na Figura 7 (BESSEGATO et al., 2015). Isto é, a oxidação preferencial da água pode ocorrer neste processo e haverá aumento da disponibilidade de radicais $\bullet\text{OH}$ na superfície do fotoânodo, radicais esses que são capazes de promover a degradação de uma matriz orgânica, como por exemplo a parede celular de um fungo (BRUGNERA, 2013; SOUZA et al., 2017).

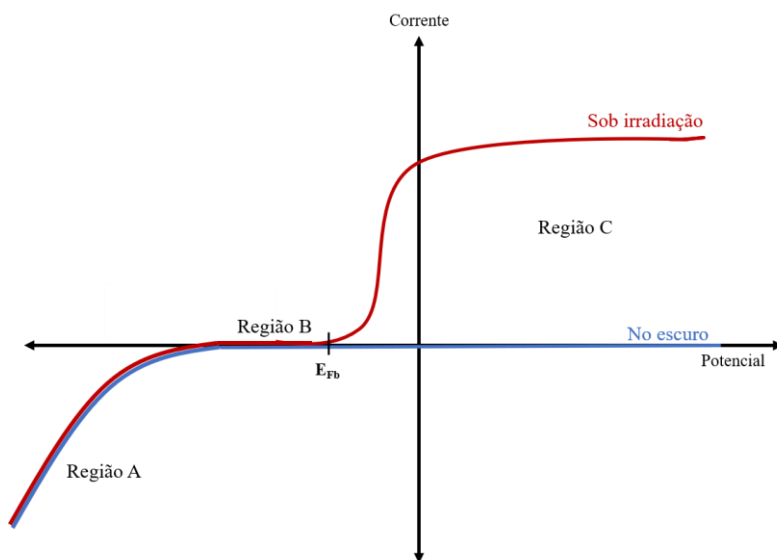
A Figura 8 ilustra uma curva típica de corrente vs potencial, na incidência e ausência de luz em um semicondutor tipo n. Em valores de potenciais mais negativos em relação ao de banda plana (Região A), há a presença de uma camada de acumulação, referente ao esquema visto na Figura 6c. Dessa maneira, o eletrodo pode atuar como cátodo, realizando processos de redução na presença ou ausência de luz. No valor referente ao potencial de banda plana aplicado (Região B), não há presença de campo elétrico para propiciar a separação dos portadores de cargas no sistema e consequentemente ausência de corrente. Já em valores superiores ao potencial de *flat band*, ter-se-á a formação da camada de depleção (Figura 6c), e por isso, não haverá corrente anódica no escuro. Entretanto, na presença de radiação e, por conseguinte, fotoexcitação do material, uma fotocorrente pode ser verificada em valores de potencial superiores ao potencial de *flat band* (BESSEGATO, 2017; BESSEGATO et al., 2015; EGERTON, 2011; RAJESHWAR, 2007).

Figura 7: Ilustração das bandas em um eletrodo tipo n ao ser fotoexcitado com radiação superior ao potencial *flat band* (E_{fb}).



Fonte: Próprio autor.

Figura 8: Curva típica de fotocorrente vs potencial aplicado a um eletrodo com semicondutor do tipo n na ausência e presença de luz.



Fonte: Próprio autor.

O primeiro relato na literatura envolvendo fotoeletrocatalise aplicada à desinfecção de águas ocorreu em 1997 com a divulgação do trabalho realizado por

BUTTERFIELD et al. onde os autores descrevem a desinfecção de soluções contaminadas por *E. coli* e esporos de *C. perfringens* utilizando eletrodos com filme imobilizado de TiO_2 . Após 25 minutos de tratamento, houve total inativação dos microrganismos, abrindo perspectiva para a realização de novos estudos.

Outro trabalho pioneiro e de grande relevância foi realizado por (CHRISTENSEN et al., 2003). Neste trabalho, eletrodos de TiO_2 obtidos por via térmica e método sol-gel foram aplicados na inativação de 10^6 UFC mL^{-1} de *Escherichia. Coli*, alcançando a inativação de 100% e 95%, respectivamente, após 25 minutos. Estes estudos demonstram que a fotoeletrocatalise pode ser uma técnica aplicada satisfatoriamente no tratamento destes microrganismos. Adicionalmente, foi avaliada a influência do íon carbamato no meio reacional e observou-se que a presença desse íon dificultava a eficiência do processo. O trabalho realizado por EGERTON; KOSA; CHRISTENSEN, (2006) evidencia o uso de um reator do tipo fotoeletrocatalítico visando a oxidação das soluções de nitrofenol na presença de *E. coli*. Com o uso de um eletrodo de TiO_2 , obteve-se uma degradação de 80% do nitrofenol presente e total morte das bactérias após 25 minutos de tratamento.

BRUGNERA et al., (2012) reportam a inativação de *Mycobacterium smegmatis* após 30 minutos de tratamento através da irradiação na região do visível ao semicondutor composto por $\text{Ti/TiO}_2\text{-Ag}$. O método proposto também foi aplicado para uma população em torno de 5×10^8 UFC mL^{-1} de *Mycobacterium kansasii* e *Mycobacterium avium*, para estes dois últimos microrganismos, obteve-se uma mineralização de aproximadamente 99,99% do material orgânico após 240 minutos de tratamento e inativação de 3 minutos para estas micobactérias a uma concentração de $7,5 \times 10^4$ UFC mL^{-1} . No ano de 2014, BRUGNERA et al. também evidenciam a inativação após 3 minutos de tratamento fotoeletrocatalítico dos patógenos *Mycobaterium fortuitum*, *M. chelonae*, e *M. abscessos*, utilizando eletrodos de Ti/TiO_2 . Os metabólitos liberados durante lise celular também foram degradados após 240 minutos e verificou-se uma mineralização superior a 70%.

O objetivo do trabalho de PABLOS et al. (2017) foi demonstrar a possibilidade de usar fotoânodos em escala reduzida para inativar bactérias e oxidar compostos orgânicos como tratamento terciário de desinfecção de águas residuais. O fotoânodo de titânio foi imobilizado em vidro condutor revestido por imersão. A fotoeletrocatalise levou a uma taxa de desinfecção mais alta em comparação à fotocatalise em todos os

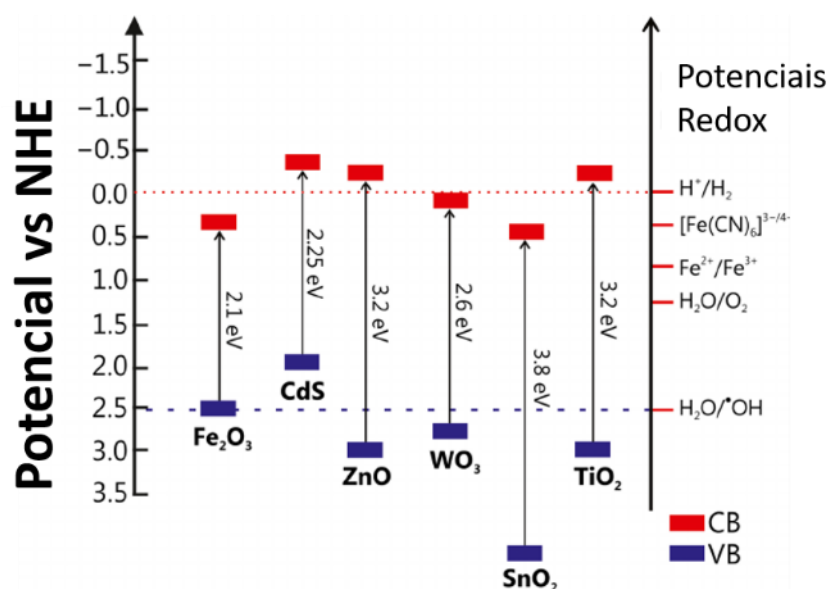
experimentos, dando origem a um aumento nos valores da constante cinética de inativação bacteriana. Recentemente o trabalho realizado por KIM et al. (2019) reporta a combinação eficiente de fotoeletrocatalise e ozonização para tratar a água da piscina simulada e real contaminada com *C. parapsilosis*. Neste trabalho, a benzofenona-3 foi usada como modelo de filtro solar comercial nocivo para testar a eficiência do reator. Os resultados mostraram que o tratamento à base do acoplamento de ambas as técnicas promoveu a oxidação eficiente da benzofenona e inativação total do microrganismo após 20 minutos de tratamento, mostrando que a fotoeletrocatalise pode ser acoplada a outras técnicas visando a melhoria da sua performance.

A maioria dos trabalhos envolve o uso de TiO_2 como semicondutor e o microrganismo mais estudado é a *E. coli*. Dentre os trabalhos que não usam TiO_2 como semicondutor, pode-se destacar aquele divulgado por RATHER e LO (2020). De acordo com os autores o tratamento fotoeletroquímico de esgoto de Hong Kong pode concomitantemente contribuir para a produção de H_2 no compartimento catódico. Para isto foi estudado a degradação de poluentes emergentes simultaneamente a desinfecção de *E. coli* em eletrodos de $\text{g-C}_3\text{N}_4/\text{Ag}$ e $\text{AgCl}/\text{BiVO}_4$. Para este fotoânodo, a densidade de fotocorrente alcançada foi de $0,1\text{--}0,2 \text{ mA cm}^{-2}$ sob potencial de $1,23\text{V vs. ENH}$, exibindo a maior eficiência de degradação de fotoeletrocatalise ($11,15\% \text{ h}^{-1} \text{ cm}^{-2}$) em comparação com outros materiais básicos como $\text{g-C}_3\text{N}_4 / \text{BiVO}_4$ ou $\text{Ag} / \text{AgCl} / \text{BiVO}_4$. O sistema gerou cerca de $118\mu\text{mol}$ de gás H_2 e uma eficiência faradáica de $69,4\%$.

O uso de eletrodos compostos de TiO_2 aplicados na desinfecção de águas está bem consolidado na literatura (BRUGNERA et al., 2012, 2013, 2014; PIRES et al., 2016). Todavia, é de notório conhecimento que este material apresenta energia de *band gap* em torno de $3,2 \text{ eV}$, conforme mostra a Figura 9. Isto mostra que o semicondutor apresenta como limitação a necessidade de fotoexcitação em região do ultravioleta ($\leq 380\text{nm}$).

Deste modo, uma alternativa promissora ao uso de TiO_2 é o trióxido de tungstênio (WO_3) que apresenta energia de *band gap* menor ($2,4\text{--}2,8 \text{ eV}$), podendo ser fotoexcitado sob radiação eletromagnética na região do visível e com potencial suficiente para a geração de radicais hidroxila no meio reacional, como demonstrado na Figura 9. (FRAGA et al., 2017; FRAGA; ZANONI, 2011).

Figura 9: Representação esquemática da posição das Ebg valores (em eV), posição de BC e BV para semicondutores selecionados.



Fonte: Adaptado de BESSEGATO et al.2015.

1.5. O uso de trióxido de tungstênio (WO₃) em processos fotoeletrocatalíticos

Nas últimas décadas, muitos óxidos de metais de transição foram explorados em muitos campos desafiadores da ciência da informação, nano e microeletrônica, ciência da computação, energia, transporte, engenharia de segurança, tecnologias militares, dispositivos optoeletrônicos e eletrocromáticos. Entre os óxidos de metais de transição, devido ao fato de possuir uma grande variedade de estruturas de cristal e ter muitos atributos interessantes como eletrocromático, óptico-elétrico e propriedades supercondutoras, o WO₃ vem gradativamente atraindo atenção da comunidade. É interessante destacar que o tungstênio foi introduzido inicialmente por Peter Woulfe no século XVIII, e como ficou originalmente conhecido como wolframita, explicando a escolha de "W" por seu símbolo elementar. Posteriormente, em 1841, Robert Oxland realizou a primeira síntese do WO₃, averiguando que este óxido é um óxido metálico com

boa propriedade semicondutora para várias aplicações, incluindo materiais eletrocromáticos e sensores de gás (BUCH; CHAWLA; RAWAL, 2016).

O WO_3 é bem conhecido por suas propriedades não estequiométricas derivadas da presença de numerosas vagas de oxigênio que podem diminuir a diferença de banda (WANG; DI VALENTIN; PACCHIONI, 2011), vide Figura 10.

Dentre os semicondutores, o trióxido de tungstênio (WO_3) é um dos mais interessantes materiais exibindo uma ampla variedade de novas propriedades, particularmente na forma de filme fino, útil para aplicações tecnológicas avançadas (RAO, 2013). Dentro desse contexto, os filmes de WO_3 podem ser considerados como uma alternativa promissora a serem aplicados em células de múltiplas junções em sistemas híbridos de fotoeletrodos ($E_{\text{Bg}} = 2,5 - 2,7\text{eV}$), fornecendo uma interface óxido/eletrólito, onde reações de evolução do oxigênio ocorrem. No entanto, a resposta fotoeletroquímica do WO_3 ainda é pouco reportado na literatura, quando comparado às investigações de TiO_2 , por exemplo. Portanto, estudos direcionadas para a otimização da resposta foto eletroquímica dos filmes WO_3 constituem um fértil terreno para exploração técnica (AHN et al., 2007)

De acordo com a literatura, os trabalhos reportados na literatura envolvendo o emprego do WO_3 em reações fotoeletrocatalíticas para desinfecção são poucos. Destacamos por aplicação de eletrodos de W/WO_3 (FRAGA e ZANONI, (2011) formação de cloro ativo e degradação de microcistina produzida pela *M. aeruginosa*. Outro trabalho de relevância considerável foi o proposto por SOUZA et al. (2019), em que eletrodos nanoporosos de WO_3 foram reportados preliminarmente no tratamento de dialisato empregado na hemodiálise contaminado por *C. parapsilosis*. Os eletrodos se mostraram bastantes satisfatórios, matando 99,9% de microrganismo após 1 minuto de tratamento e elevada taxa de mineralização para as espécies orgânicas presentes no meio.

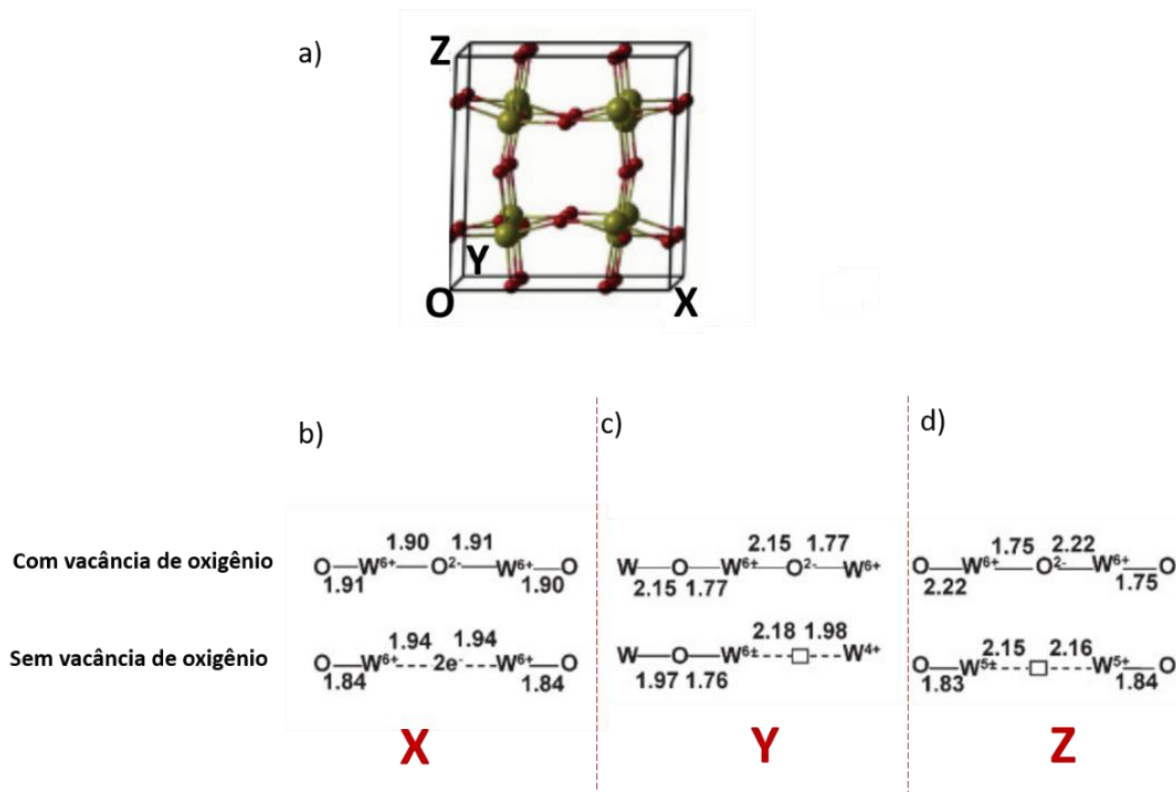
A obtenção de filmes de WO_3 por processo sol-gel (AHN et al., 2007), oxidação anódica (SOUZA, 2015), eletrodeposição (XU CHUN SONG, XIA WANG, 2013) e evaporação a vácuo (COLTON; GUZMAN; RABALAIS, 1978) são reportados na literatura. E o filme obtido em cada processo apresenta baixo custo, reprodutibilidade e diferentes características e eficiência quando aplicados em processos fotocatalítico/fotoeletrocatalítico. No entanto, a possibilidade de obtenção de uma

morfologia singular que resulte em maior área efetiva e maior velocidade de transferência eletrônica tem sido explorada.

GUARALDO et al. (2013) têm investigado a confecção de eletrodos de W/WO₃ pelo uso de *templates* ou moldes e os eletrodos obtidos indicaram melhor desempenho fotoeletrocatalítico em reações de degradação de corantes orgânicos. No entanto a construção de eletrodos de W/WO₃ por meio de *biotemplates* são escassos na literatura. Tal fato destaca a característica inovadora do presente trabalho.

Deste modo, o presente trabalho investiga a construção de eletrodos de WO₃ com nanoestruturas controladas através do uso de *biotemplates*, tendo como base para a modelagem os biofilmes construídos por microrganismos seguido de uma eletrodeposição. Este arranjo permitiria contribuir com uma alternativa inovadora para a construção de fotoeletrodos W/WO₃ com nanoestruturas controladas pelo uso de modelos biotecnológicos, utilizando biofilmes de *C. parapsilosis* seguidos de um método de eletrodeposição. Os biofilmes são um sistema dinâmico complexo que, de acordo com as condições microambientais (hidrodinâmica e bioquímica, espessura e outros), pode adquirir heterogeneidade espacial (canais e edifícios) e a morfologia peculiar pode conferir boa atratividade como fotocatalisador.

Figura 10: Representação de estrutura da célula unitária monoclinica de WO_3 . No modelo, bolas verdes e vermelhas representam os átomos de W e O, respectivamente. As direções x, y e z das cadeias -W-O-W- com e sem vacância de oxigênio são mostradas em (b), (c) e (d), respectivamente. As distâncias estão em Å



Fonte: Adaptado de WANG et al., 2011.

1.6. Materiais semicondutores bioinspirados

Os sistemas biológicos presentes na natureza são ótimos exemplos de auto-montagem na natureza. Exemplos de automontagem biológica podem ser encontrados em uma vasta hierarquia de escalas de comprimento, desde a montagem de proteínas e ácidos nucleicos que formam vírus em nanoescala até o desenvolvimento de anatomias complexas em animais multicelulares. Em contrapartida, a capacidade dos cientistas em geral, de projetar arquiteturas de montagem automática com precisão em várias escalas, permanece bastante limitada. Sendo assim, a possibilidade de projetar novos materiais funcionais com estruturas e funções resultantes, precisamente adaptadas em escala nanométrica, suscita um grande interesse na literatura (SELVAKUMAR et al., 2014).

A biomodelagem surgiu do interesse pelos sistemas de automontagem biológica encontrados na natureza e o desenvolvimento de materiais inorgânicos nanoestruturados com propriedades que excedem suas contrapartes volumosas. Uma grande variedade de sistemas biológicos direciona o crescimento de estruturas minerais inorgânicas hierárquicas complexas, cujas fases cristalinas e arquiteturas de múltiplas escalas são ditadas precisamente por um modelo subjacente inspirado em estruturas já presentes na natureza (KRAJINA et al., 2018).

Neste contexto, inspirando-se nos processos de biomineralização da natureza, diversos pesquisadores têm investigado a síntese biotecnológica de nanoestruturas inorgânicas com o intuito de construir biomoléculas automontadas com ênfase nas propriedades únicas de reconhecimento. Um exemplo é a construção de biofilmes. Estes podem ser definidos como uma massa microbiana proveniente da multiplicação e desenvolvimento de microrganismos, aderidos à superfície de sólidos, presa na matriz de polissacárideo extracelular, em ambiente aquoso (COSTERTON, J. W.; LAPPIN-SCOTT, 1995). Os biofilmes se desenvolvem por meio de uma associação comunitária constituindo uma cadeia alimentar (STOODLEY et al., 2002). Dessa maneira, compreende-se que o biofilme é um sistema dinâmico complexo que de acordo com as condições microambientais (hidrodinâmica e condições bioquímicas, espessura, tensão de cisalhamento) adquire uma heterogeneidade espacial (canais e edificações) e morfologia peculiar que são características do tipo de microrganismo envolvido.

A biomodelagem é, um dos campos da ciência que vem atraindo grande atenção da comunidade científica pela possibilidade de planejamento de novas morfologias usando recobrimento via uso do material biológico. Um exemplo é o emprego de biofilmes produzidos por microrganismos, seguido da calcinação com retirada total ou parcial deste material. O potencial uso destes materiais associado a sua morfologia complexa e não usual, possibilita o destaque desses materiais na química de materiais, com especial ênfase para os materiais estruturados a partir de DNA, bactérias e fungos (SELVAKUMAR et al., 2014). A boa reprodutibilidade, associada à elevada variedade de estruturas e ao alto controle morfológico, tornam esses materiais uma alternativa para suprir as limitações dos materiais convencionais. Dentre os microrganismos já conhecidos, há um notório destaque para as bactérias e fungos, cujas estruturas complexas

e bem definidas os torna atrativos para a utilização como moldes na preparação de materiais, quando comparado ao custo de outras tecnologias.

Dentre os trabalhos presentes na literatura, pode-se destacar o trabalho de BIGALL et al. (2008), onde foi evidenciada a habilidade de diversos fungos crescerem em um ambiente rico em citrato e sua afinidade por nanopartículas de ouro, prata, paládio e platina. O sistema híbrido fungo-platina exibiu a capacidade de catalisar a reação redox do hexacianoferrato (I). SUGUNAN et al. (2007) também reportaram a preparação de nanofios de ouro revestidos por *Aspergillus niger*. SELVAKUMAR et al. (2014) também reportam a construção de materiais bioinspirados usando o próprio microrganismo como molde, o que torna a proposta deste trabalho ainda mais desafiadora.

Assim, considerando o desafio de melhorar a eficiência de eletrodos de W/WO₃ aplicados na desinfecção de amostras de água de hemodiálise e dialisato seria de grande relevância buscar novos modos de construir os filmes de WO₃ a partir de biofilmes de *C. parapsilosis* a partir de arquiteturas capazes de funcionar tanto como material de reconhecimento do fungo como ampliar a sua área efetiva para as reações de degradação.

1.7. Crescimento de filmes semicondutores de W/WO₃ pelo uso de moldes sintéticos (*templates*)

A obtenção de materiais pelo método de molde ou “*template*” baseia-se na ideia inicial de que a construção de poros em um determinado material hospedeiro (*host*) podem ser uma excelente estratégia para ampliar a área superficial do material e orientar o crescimento do filme no substrato. POSSIN (1970) foi o pioneiro na síntese de materiais utilizando tal metodologia. Posteriormente, WILLIAMS e GIORDANO (1984) refinaram o método de síntese pela preparação de nanofios metálicos com a distribuição de poros em torno de 10 nm.

Os métodos de obtenção de membranas pelo método moldem usando técnicas eletroquímicas de recobrimento merecem destaque. Dentre eles, ressalta-se o desenvolvimento de membranas de alumina e membranas poliméricas modeladas (*track-etched*) (BARTLETT, 2004). Quando o método de obtenção via eletroquímica mostrou-se adequado garantindo ao material depositado com estrutura porosa de alta densidade e controle de poros de modo simples e versátil.

O princípio da eletrodeposição usando moldes em processos coloidais é usualmente iniciado pela disposição de partículas esféricas como camadas cristalinas coloidais no substrato (eletrodo condutor ou semiconductor). Na sequência, o material de interesse é então eletrodepositado preenchendo as lacunas entre as partículas do cristal coloidal. Após a eletrodeposição, o material utilizado como molde pode ser removido através da dissolução em um solvente ou por tratamento térmico, possibilitando a formação de um filme poroso com morfologia majoritariamente direcionada pelo molde utilizado (ZANONI; GUARALDO, 2013).

Sendo assim, visando comparar o efeito da morfologia na eficiência dos métodos fotoeletrocatalíticos foi investigado também a construção de filmes usando esferas de poliestireno como moldes e deposição eletroquímica de WO_3 no intuito de obter filmes nanoestruturados de W/WO_3 com dimensões controladas.

Portanto, o desenvolvimento de novos fotoânodos a base de WO_3 com diferentes morfologias (bioinspirados e pelo método de moldes) é de grande relevância para melhorar a eficiência do processo fotoeletrocatalítico, bem como contribuir para o desenvolvimento de métodos mais eficientes para a desinfecção do dialisato antes e após o processo de hemodiálise e melhorar a qualidade de vida do paciente imunocomprometido e da população de modo geral.

2. OBJETIVO

O objetivo desta parte do presente trabalho é investigar a potencialidade da técnica de fotoeletrocatalise como método de desinfecção do dialisato antes e após tratamento de hemodiálise contaminado por *Candida parapsilosis* e seus biofilmes no intuito de oferecer um método de tratamento mais eficiente para seu descarte.

Para isto, neste trabalho pretendeu-se desenvolver eletrodos com diferentes morfologias de W/WO₃, sintetizados pelo recobrimento de chapas de W pelo próprio fungo e moldes de poliestireno usando eletrodeposição. O desempenho destes eletrodos foi avaliado na inativação de *C. parapsilosis* em fluídos de hemodiálise e efluentes oriundos deste processo. Parâmetros tais como: potencial aplicado, irradiação ultravioleta e visível, concentração do fungo e tempo de tratamento foram investigados pela avaliação da eficiência usando contagem microbiana e remoção de carbono orgânico total.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais e reagentes mais utilizados

Os reagentes utilizados na preparação das soluções são de grau analítico, utilizando água destilada purificada através do sistema Milli-QM (18,2M Ω . cm⁻¹ Millipore) para o preparo das mesmas. O tungstênio em pó utilizado no preparo das soluções e o reagente N-dietil-p-fenilendiamina utilizado para medidas espectrofotométricas foram adquiridos da empresa Sigma Aldrich. O ácido clorídrico, o peróxido de hidrogênio, fluoreto de sódio e álcool etílico foram adquiridos da empresa Merck.

3.1.1. Obtenção do efluente e dialisato

O dialisato e o efluente provenientes do processo de hemodiálise foram gentilmente cedidos pelo Dr. José Luiz Saheb, diretor da Unidade de tratamento Dialítico da cidade de Araraquara – SP. Ambos foram caracterizados por meio de métodos analíticos, microbiológicos e físico químicos triviais como: Demanda química de oxigênio por meio da reação com dicromato de potássio em termoreator, turbidez, condutividade, pH e medida de carbono orgânico total antes e após tratamento fotoeletrocatalítico.

3.1.2. Obtenção das Cepas de *C. parapsilosis*

As leveduras usadas no trabalho foram cordialmente cedidas pela Dr^a. Maria José Soares Mendes Giannini (Faculdade de Ciências Farmacêuticas- UNESP, Araraquara). Inicialmente, estas foram previamente incubadas em meio YPD (Yest Peptome Dextrose: 1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de dextrose). Os microrganismos foram incubados e armazenados em tubos de vidro em meio de Ágar Saboroud e dextrose (Acumedia), à temperatura ambiente. O manutenção da viabilidade celular foi realizada

por inoculação do microrganismo objetivando a renovação das células foi feita sistematicamente todo o mês.

3.2. Procedimento experimental

Para o desenvolvimento do trabalho foi escolhido o substrato de W/WO₃, onde o filme de WO₃ foi construído previamente por meio de anodização, mostrando morfologia nanoporosa. A escolha de um substrato rugoso em detrimento de uma superfície metálica favorece a capacidade de adesão dos microrganismos em superfícies defeituosas em relação a superfícies lisas justamente devido à presença de sulcos, o que contribui para uma melhor adsorção do microrganismo. A seguir é apresentada a metodologia adotada para a construção de eletrodos por *moldes de poliestireno* e pelo método de bioformação dos filmes.

3.2.1. Preparo dos eletrodos Bioinspirados de W/WO₃

3.2.1.1. Preparo de eletrodo de W/WO₃ por eletrodeposição

No preparo dos eletrodos bioinspirados utilizou-se metodologia descrita na literatura (FRAGA et al., 2017; FRAGA; ZANONI, 2011; SOUZA, 2015). Uma placa com dimensões 1 x 1 cm² de tungstênio metálico (Alfa Aesar, 0,25 mm, 99,95%) foi polida mecanicamente com lixas de diferentes granulometrias (800, 1000, 1200, 1500, 2000). Após este tratamento, as placas foram lavadas em banho de ultrassom durante cinco minutos em presença de acetona seguida de isopropanol e água. Posteriormente, as placas foram submetidas a fluxo de ar comprimido com a finalidade de secagem. Para realizar a anodização, foi utilizada uma célula eletroquímica composta por dois eletrodos, sendo a placa de tungstênio o eletrodo de trabalho e a rede de platina utilizada como contra eletrodo. A placa de tungstênio foi imersa em uma solução de fluoreto de sódio de concentração 0,15 mol L⁻¹, usado como eletrólito suporte, sendo aplicada uma rampa de potencial de 0,2 V por segundo, até ser atingido o potencial equivalente a 60V, mantido durante duas horas. Após o término da anodização, os eletrodos foram cuidadosamente lavados pela imersão em água deionizada, seguido da secagem por fluxo de ar

comprimido. Para finalizar, aspirando promover a formação da fase cristalina, estes foram submetidos a um processo de calcinação a 450°C por duas horas.

3.2.1.2. *Biofilmes de C. parapsilosis*

O crescimento dos biofilmes de *C. parapsilosis* na superfície de W foram obtidos pela incubação do eletrodo previamente preparado a uma suspensão contendo $1,0 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ de *C. parapsilosis* em tampão PBS (8,0 g NaCl, 0,20 g KCl; 14,4 g Na₂HPO₄; 0,24 g KH₂PO₄, água destilada q.s.p. 1,0 L, de acordo com metodologia adaptada de MARCELINO (2018). Para isto, foram adicionados os eletrodos de W previamente esterilizados e 5 mL da suspensão preparada depositada em placa com 6 poços. Esse sistema foi incubado e mantido em incubadora BOD – TECNAL TE-371 (demanda biológica de oxigênio) por um período de 2 horas, sob temperatura de 37 °C, em agitação constante de 80 rpm, buscando realizar a pré-adesão das células na superfície desejada. Em seguida, a suspensão foi removida e a ela foi adicionado 5 mL de RPMI. Por fim, o material foi incubado e mantido em incubadora BOD por 48 horas a 37 °C e sob agitação de 80 rpm para a formação dos biofilmes para a formação do biofilme sobre o eletrodo de W.

3.2.1.3. *Eletrodeposição dos filmes de WO₃ nos eletrodos com biofilme de C. parapsilosis*

Após a formação dos biofilmes de *C. parapsilosis*, estes foram submetidos à eletrodeposição de filmes finos de WO₃ aplicando potencial de -0,45V durante quarenta e cinco minutos, de acordo com metodologia adaptada (GUARALDO et al., 2013). Para isto, utilizou-se uma solução precursora de tungstênio previamente preparada pela dissolução do pó de tungstênio metálico de elevada pureza (99,96%) em 10 mL de peróxido de hidrogênio (30 volumes). Após a dissolução total, a solução preparada foi diluída em 250 mL de água deionizada, pH= 1,5. A seguir a fase cristalina foi obtida pela total remoção da matéria orgânica após processo de calcinação a 450°C por duas horas.

O eletrodo obtido foi aplicado nesta forma, ou submetido a deposição de Ag como descrito a seguir.

3.2.1.4. *Modificação dos eletrodos de W/WO₃ com Ag*

A incorporação de nanopartículas de prata ao eletrodo bioinspirado de W/WO₃ foi realizada por meio do recobrimento prévio com dopamina como agente ancorante (TRIPATHY et al., 2016). A incorporação de prata foi realizada usando solução de 3 mg mL⁻¹ de AgNO₃, com o depósito prévio de dopamina de acordo com procedimento otimizado pelo nosso grupo de pesquisa (PERINI et al., 2019). Para isto o eletrodo de W/WO₃ previamente construído com o *template* de biofilmes de *C. parapsilosis* foi imerso em uma solução de 13 mmol. L⁻¹ de dopamina em tampão Tris (pH 8,5) mantido sob agitação durante 8 h. A seguir, o eletrodo foi lavado em água deionizada e imerso em uma nova solução de 3 mg mL⁻¹ de AgNO₃ durante 8h (XU et al., 2017). Após lavagem e secagem a temperatura ambiente o eletrodo ficou pronto para uso.

3.2.2. *Preparo dos eletrodos de W/WO₃ por moldes sintéticos*

As placas de W (Alfa Aesar, 0,25 mm, 99,95%) com dimensões de 1 x 1 cm² foram polidas, lavadas e anodizadas, conforme metodologia apresentada no item 4.2.1.1. A seguir, estes eletrodos foram recobertos com uma camada de esferas de poliestireno, depositada através do uso de suspensões aquosas de esferas de poliestireno monodispersas diluídas a 0,5 % m/v (Thermo Scientific) contendo o surfactante Triton X-100. Esta suspensão foi previamente mantida em banho de ultrassom por dois minutos e a amostra a seguir foi mantida em câmara úmida (10cmx10cmx5cm) para permitir uma lenta evaporação durante 24 h. Posteriormente, outra alíquota da suspensão foi aplicada e o eletrodo foi novamente mantido na câmara úmida por mais 24 h. Após evaporação, o substrato (com as partículas de poliestireno) foi submetido a um tratamento térmico por uma hora em estufa (SOLAB – SL 100) à 100 °C, para a evaporação de água. Posteriormente, sobre este substrato, foi eletrodepositado filmes de WO₃ de acordo com procedimento descrito no item 4.2.1.3. Por fim, os *templates* de poliestireno foram retirados da superfície através da imersão por uma hora em tetrahidrofurano (THF). Após

lavagem o eletrodo foi submetido a um processo de calcinação a 450°C por duas horas em mufla MODELO, com rampa de temperatura de 2°C/s.

3.2.2. Determinação da concentração de prata

A concentração de prata incorporada na superfície do eletrodo de W/WO₃ durante a modificação e lixiviada durante o uso do eletrodo em medidas de fotoeletrocatalise foi determinada pelo método de voltametria de redissolução anódica, de acordo com método proposto por KUMAR e MUSTEDT (2005). Para isto utilizou-se uma célula convencional de 25 mL e sistema eletroquímico convencional de três eletrodos: eletrodo de carbono vítreo (ECV) como eletrodo de trabalho, eletrodo de Ag/AgCl como referência e um fio de Pt como eletrodo auxiliar (BRUGNERA 2013). A esta célula convencional foi introduzido uma alíquota de 10,0 mL de eletrólito suporte, KNO₃+ HNO₃ 0,10 mol L⁻¹ e concentrações pré-definidas do analito. A solução foi então agitada magneticamente a velocidade constante e submetida a análises voltamétricas. Após otimização das melhores condições experimentais obteve-se um pico bem definido em potencial de 0,15 V correspondente a reoxidação de Ag/Ag⁺ previamente depositada sob potencial de -0,7 V, tempo de acúmulo de 800 s e velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹.

Uma curva analítica foi construída no intervalo de 1,0 x 10⁻¹⁰ a 1,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹, segundo a equação $I_p(\mu A) = 3,72 + 7,45 \times 10^9 [Ag]$, com sensibilidade de 7,45 x 10⁹ μL mol⁻¹. Calculando-se o limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) para a curva utilizando-se o método estatístico: (3xSD/b) e (10xSD/b), em que SD representa o desvio padrão de dez medidas do branco obtidas no mesmo potencial de oxidação da Ag⁺ e b a inclinação da reta obtida para a curva analítica. Os valores obtidos foram LD = 8,74 x 10⁻¹¹ mol L⁻¹ e LQ = 5,10 x 10⁻¹⁰ mol L⁻¹. Após as análises de fotoeletrocatalise a água tratada foi submetida ao método proposto e usado para avaliação da concentração de prata no eletrodo e a quantidade liberada pelo eletrodo W/WO₃-Ag em função do tempo durante as reações fotoeletrocatalíticas usando a curva analítica.

3.2.3. Caracterização dos eletrodos

As propriedades morfológico-estruturais dos filmes foram investigadas por análise de microscopia eletrônica de alta resolução (FEG-SEM) e difração de Raios-X (DRX). As medidas de microscopia eletrônica de varredura foram obtidas em um microscópio eletrônico de varredura FEG-SEM de alta resolução, com fonte de elétrons por emissão de campo, da marca JOEL, modelo JSM - 7500-F e também pelo modelo JSM-7401-F. Medidas de difração de Raios X foram obtidas em um equipamento Rigaku RINT 1500 usando radiação Cu K na região de 10-70°. Espectros de Reflectância Difusa na região do UV-vis foram obtidos em um espectrofotômetro da marca Perkin Elmer Lambda 35. Os valores de *band gap* foram estimados por gráficos de Tauc (função de Kubelka – Munk vs energia do fóton).

3.2.4. Medidas fotoeletrocatalíticas, fotocatalíticas e fotolíticas

3.2.4.1. Preparo das suspensões e crescimento dos Biofilmes de *C. parapsilosis* para degradação fotoeletrocatalítica

Inicialmente, as cepas ATCC 22019 das leveduras de trabalho foram incubadas em meio Ágar Saboraud Dextrose, ideal para o cultivo de leveduras. Após o crescimento do microrganismo, foi preparada uma suspensão deste na solução de NaCl 0,1 mol L⁻¹. Posteriormente, o microrganismo foi quantificado pelo auxílio de um microscópio óptico, da marca Olympus e modelo CH30, em uma câmara de Neubauer (Neubauer Improved KASVI, resolução de 0,0025mm² e profundidade de 0,100mm) e transferido para o reator fotoeletroquímico e diluído para as concentrações de interesse.

Para a obtenção dos biofilmes de *C. parapsilosis*, as leveduras foram incubadas em 20,0 mL de meio YPD (Yeast Peptone Dextrose: 1,0 % de extrato de levedura, 2,0 % de peptona, 2,0 % de dextrose) em tubos cônicos tipo Falcon com capacidade de 50,0 mL, em agitador orbital (150-180 rpm) a 30 °C por 24h. Em seguida, procedeu-se à lavagem das células em solução salina tamponada com tampão fosfato de PBS. A suspensão foi diluída 1:10 (v/v) e o valor ajustado para pH = 7,4. Em seguida, os microrganismos foram suspensos em tampão PBS e, a concentração ajustada para 1,0 x 10⁶ UFC mL⁻¹ em RPMI com 2% de glicose. Nesta etapa fez-se quantificação com auxílio de um microscópio

óptico e uma câmara de Neubauer. Lamínulas de vidro circulares de 13 mm de diâmetro (Boeco, Hamburg, Germany) foram previamente lavadas, esterilizadas e secas. Após esta etapa, as mesmas foram postas no fundo de cada um dos 24 poços de placas de microtitulação e posteriormente inoculados com 300 µL da suspensão de *C. parapsilosis*. Posteriormente, o sistema foi incubado por 24 horas a 37°C, para formação do biofilme.

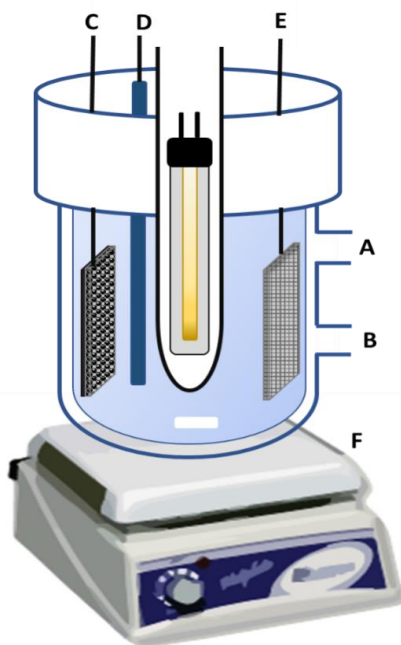
3.2.4.2. O reator fotoeletrocatalítico

Os experimentos de fotoeletrocatalise, fotocatalise e fotólise foram realizados em um reator fotoeletrocatalítico de vidro separado em dois compartimentos concêntricos de 250 mL. No compartimento anódico foi introduzido o eletrodo de trabalho (4cm x 4cm), um eletrodo platina como eletrodo auxiliar e um eletrodo de Ag/AgCl como eletrodo de referência, e tubo de quartzo de 2,5 cm de diâmetro e 15 cm de profundidade. O reator possui um sistema de resfriamento dos dois compartimentos e a temperatura mantida a 19 °C por um meio de um banho termostático HAAKE DC 30. Para iluminação do fotoânodo foi utilizado uma lâmpada de vapor de mercúrio Philips de 125 W de potência ($I=9,23 \text{ W m}^{-2}$) sem o bulbo inserida em tubo de quartzo no compartimento anódico. Para medidas com radiação preponderante na região do visível, foi utilizado um tubo de vidro para filtrar a radiação UV/Vis. O sistema foi submetido a agitação usando uma barra magnética de 3 cm de comprimento e agitador magnético (FISATOM 720)

As medidas de fotocorrente vs potencial para os eletrodos foram realizadas em uma célula eletroquímica de um compartimento contendo três eletrodos, uma rede de Pt, como eletrodo auxiliar, eletrodo de Ag/AgCl, KCl saturado como eletrodo de referência e eletrodo bioinspirado de W/WO₃, eletrodo de W/WO₃-Ag ou eletrodo de W/WO₃ feito por template como eletrodo de trabalho. Como fonte de iluminação utilizou-se uma lâmpada de Hg 125 W ($I=9,23 \text{ W m}^{-2}$) sem bulbo conforme descrito previamente. Um potenciostato/galvanostato AUTOLAB® modelo PGSTAT 305 acoplado a um microcomputador e gerenciado pelo software NOVA 2.1.2 para aquisição dos dados, foi utilizado nos experimentos de voltametria linear do semicondutor. As medidas de fotocorrente foram obtidas utilizando-se como eletrólito suporte o próprio dialisato e o efluente oriundo do processo de hemodiálise e velocidade de varredura de 10 mV s⁻¹.

Antes de iniciar os experimentos todo material foi autoclavado, a fim de evitar contaminações provenientes de outras espécies. Todas as medidas eletroquímicas e fotoeletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato AUTOLAB® modelo PGSTAT 302 com potencial controlado pelo software NOVA 2.1.2. Todos os experimentos foram realizados em capela de fluxo laminar e os resíduos tratados adequadamente.

Figura 11: Esquema de reator fotoeletrocatalítico: (A) saída de água, (B) entrada de água, (C) eletrodo de trabalho, (D) eletrodo de referência, (E) eletrodo auxiliar, (F) Agitador magnético.



Fonte: Próprio autor.

3.2.5. Avaliação da eficiência dos métodos de tratamento

Todas as soluções tratadas pelos diferentes métodos foram analisadas por contagem de leveduras, medidas de condutividade, demanda química de oxigênio e turbidez. Adicionalmente, foram feitas medidas de carbono orgânico total, investigação da formação de cloro ativo por meio de medidas espectrofotométricas e avaliação da

formação de espécies cloradas por cromatografia gasosa acoplada a espectrofotômetro de massas, como desciras a seguir.

3.2.5.1. Contagem microbiana

Amostras das soluções contaminadas propositalmente com *C. parapsilosis* foram submetidas à desinfecção usando tratamento fotoeletrocatalítico e removidas após 0, 1, 3, 5, 10, 30, 60 e 120 minutos. Em cada análise de contagem microbiana removeu-se 100 µL de cada amostra, inoculada e posteriormente adicionada em Ágar Saboroud Dextrose e diluídas sucessivamente em água para 1/10 v/v e 1/100 v/v, em uma placa de Petri e submetidas a incubação à T=37 °C por períodos de 3 a 30 dias. A partir destas realizou-se a contagem de colônias visualmente. Foi padronizada a contagem de colônia após 48 h de incubação.

3.2.5.2. Carbono orgânico total (COT)

A mineralização da matéria orgânica proveniente da lise celular de *C. parapsilosis* durante o processo de desinfecção foi monitorada pela análise de carbono orgânico total (COT) das amostras removidas, em um Analisador de Carbono Orgânico Total Shimadzu, modelo TOC-V CPN. Para a determinação de carbono total (CT), a amostra injetada foi carregada para um tubo de combustão contendo Pt suportada em alumina a 680 °C. Posteriormente a amostra sofreu oxidação catalítica a CO₂. Para a determinação de carbono inorgânico (CI) a amostra injetada reage com o reagente CI (ácido clorídrico 25%), onde todo carbono inorgânico foi convertido a CO₂ e detectado por absorção no infravermelho não dispersivo. O COT foi obtido pela subtração de CT e CI. Padrões de CI e CT foram preparados e armazenados conforme instruções do manual do equipamento e posteriormente diluídos para concentrações necessárias para a construção das curvas analíticas, assim amostras de leveduras foram submetidas à análise antes e após as reações de desinfecção.

3.2.5.3. *Formação de cloroativo*

O monitoramento da possível formação de cloro ativo nas amostras tratadas por fotoeletrocatalise foram realizadas em vista das amostras de dialisato e efluente da hemodiálise (dialisado) conter alta concentração de cloreto, e sob condições de potenciais anódicos poder gerar cloro ativo por oxidação (ZANONI, MARIA VALNICE B.; SENE, J.; SELCUK, H.; ANDERSON, 2004). A possível formação de cloro ativo foi investigada realizando-se utilizando o método espectrofotométrico na região do visível em espectrofotômetro UV-VIS de arranjo linear de diodo da Hewlett Packard, modelo 8453, interfaciado a um programa UV-visible Chemstation Software, da Hewlett Packard modelo HP-854X. Todas as medidas foram realizadas utilizando-se cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. O teste foi realizado por meio da reação da solução tratada por fotoeletrocatalise, com solução 1,0 mol L⁻¹ de N, N-p-fenilenodiamina em tampão fosfato pH 7. Na presença de cloro ativo há a formação de um produto colorido com máxima absorção em ($\lambda=514$ nm).

3.2.5.4. *Formação de espécies organocloradas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas*

Por considerar que na presença de cloreto pode haver a formação de espécies organoclorada durante a oxidação de compostos orgânicos provenientes da lise da parede celular em meio de cloreto, o produto gerado no tratamento fotoeletrocatalítico foi submetido a análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. As amostras foram analisadas em um cromatógrafo gasoso modelo Agilent CG / MS 7890B equipado com uma coluna capilar HP-5MS (5% de fenilpolimetilsiloxano). Como gás de arraste foi utilizado gás hélio com fluxo de 1 mL min⁻¹. A injeção de amostra de 1 μ L foi realizada no modo “*splitless*”. A temperatura do forno da coluna foi mantida a 40 ° C por 4 min e depois programada até 280 °C com a rampa de 16 ° C min⁻¹, que foi mantida por 5 minutos. As temperaturas da entrada de injeção e do detector foram de 250 e 280 ° C, respectivamente. O espectrômetro de massa foi operado com resolução de 1000 no modo de ionização positiva por impacto eletrônico (EI +), energia eletrônica 70 eV. A análise

qualitativa por GC-MS foi realizada através da detecção do composto-alvo pelo monitoramento de íons simples.

3.2.5.5. Medidas de pH, condutividade, turbidez e demanda química de oxigênio (DQO)

Os valores de pH foram medidos em um pHmêtro (Íon PHB 500). As medidas de condutividade da amostra antes e após tratamento foram realizadas em um turbidímetro da Quimis. As medidas da demanda química de oxigênio foram realizadas usando um kit Nano color 1500 (Macharey-Nagel, Düren, Deutschland). A variação de turbidez foi realizada em um turbidímetro previamente calibrado modelo 0-1000 FTU Fast Tracker EPA Ref. HI98703-02, da Hanna, São Paulo, Brasil

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização morfológica e eletroquímica dos eletrodos de W/WO₃

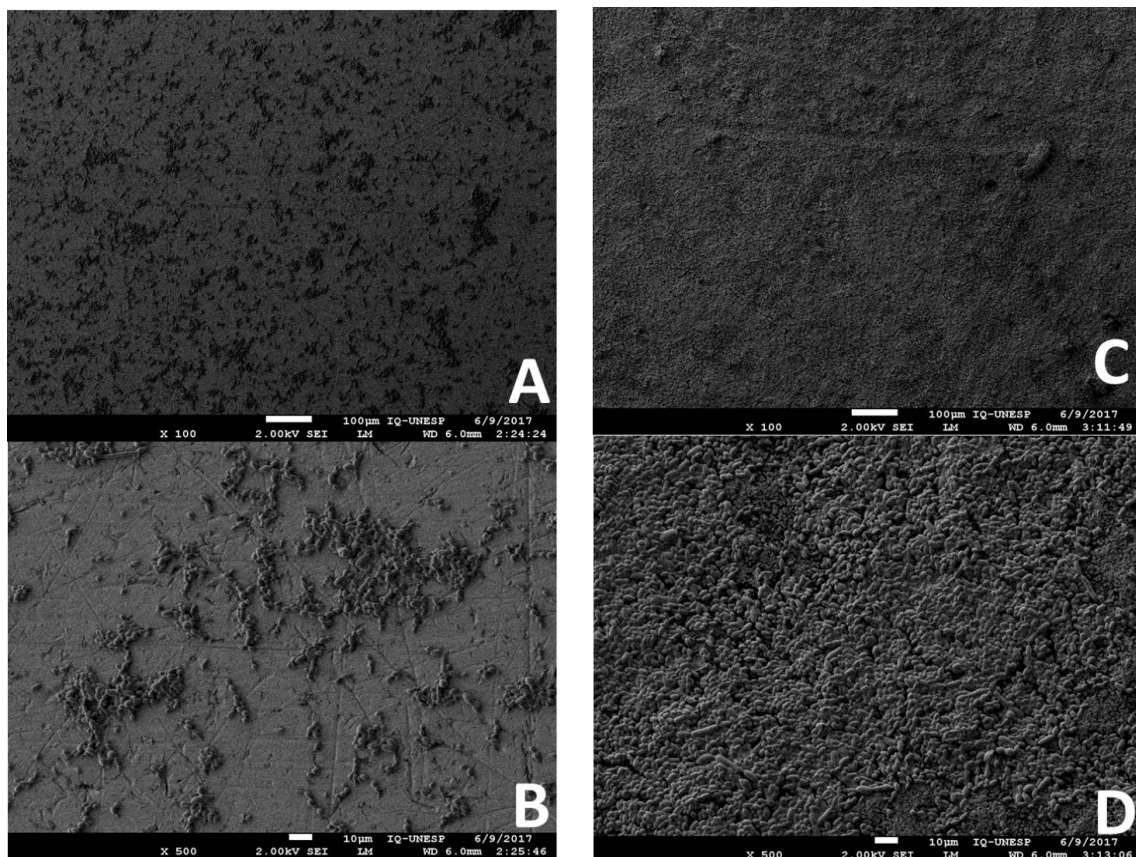
Nos tópicos a seguir serão comparadas as morfologias dos eletrodos preparados por diferentes metodologias, bioinspirados de W/WO₃, W/WO₃-Ag e para os eletrodos de W/WO₃ feitos por *templates* sintéticos de poliestireno.

4.1.1. Eletrodos Bioinspirados de W/WO₃

A formação de biofilmes sobre chapas de W foi testada usando diferentes metodologias. Após otimização observou-se que o crescimento do biofilme microbiano sobre os eletrodos ocorre de forma preferencial sobre trióxido tungstênio em detrimento do tungstênio metálico riscado mecanicamente. A Figura 12 mostra as imagens de FEG-MEV obtidas para a formação dos biofilmes sobre W e W/WO₃. Nesta figura, constata-se que há forte adesão dos microorganismos à superfície nanoporosa de WO₃, distribuídos de maneira uniforme na região. Dentre os diversos parâmetros investigados, observa-se que a velocidade de formação do biofilme depende de algumas condições hidrodinâmicas do meio, pH do sistema e rugosidade. Sendo assim, as melhores condições obtidas foram aquelas usando a rugosidade da superfície, pH 7,1 e agitação de 80 rpm, com melhor adsorção e proliferação das células na superfície (CHAMBERLAIN, 1992). De acordo com a literatura (BOZORG; GATES; SEN, 2015), o depósito do biofilme sobre a superfície nanoporosa de W/WO₃ ocorre interação eletrostática entre a superfície do semicondutor e a parede celular do fungo de estudo. Levando em consideração que o trióxido de tungstênio e as estruturas que compõem a parede celular fúngica (glucano e quitina) são espécies polares, verifica-se que há a possibilidade de ocorrer interações de Van der Waals principalmente do tipo dipolo-dipolo, tipo de interação inexistente no sistema com apenas tungstênio, contribuindo assim para uma maior adsorção das células fúngicas na superfície oxidada (BOZORG; GATES; SEN, 2015; ZHANG et al., 2020).

A literatura relata que a formação *in vitro* do biofilme de *Candida* spp. envolve três estágios bem consolidados. O primeiro estágio consiste na adsorção das células no substrato de trabalho seguida da proliferação destas formando uma camada basal e por fim a formação de hifas ou pseudo-hifas, a depender da espécie, simultaneamente a produção de matriz celular (MARCELINO, 2018).

Figura 12: Microscopia eletrônica de alta resolução (FEG-MEV) dos biofilmes microbianos obtidos na superfície metálica de tungstênio (A) e (B) e biofilmes microbianos obtidos na superfície nanoporosa do trióxido de tungstênio (C) e (D).

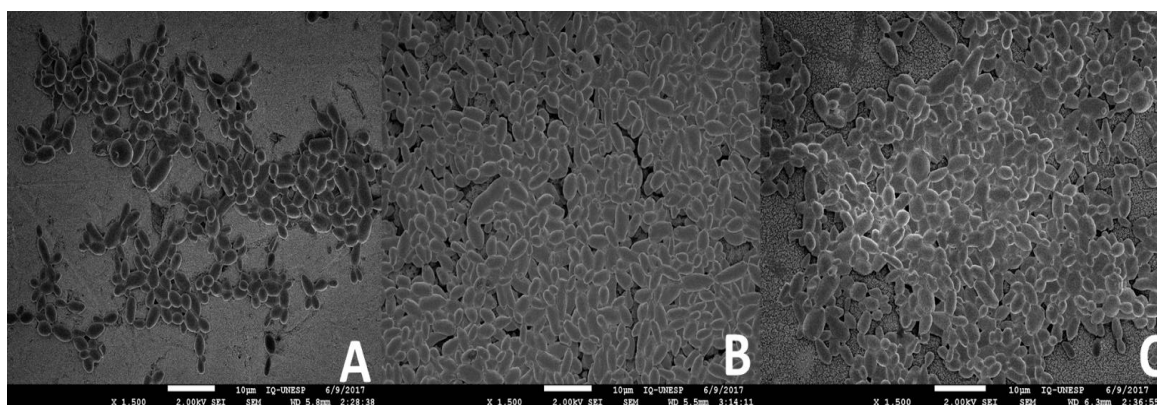


Fonte: Próprio autor.

A seguir foi investigado o efeito do tempo de crescimento sobre o recobrimento da superfície, para isto foi investigado tempos entre 24 h, 48 h e 72 h, cujas imagens de FEG-MEV são apresentadas na Figura 13. Analisando-se as superfícies, observou-se que a melhor formação de biofilme de *C. parapsilosis* ocorre em 48 h. Em 24 horas não há tempo suficiente para que ocorra total adesão primária e proliferação das células. O

decréscimo de células presentes após 72 h pode ser atribuído ao fato que a última etapa do crescimento do biofilme envolve a disseminação da progênie das células do biofilme (sésseis) com características diferentes (transcrição de genes de resistência) de suas homólogas (CHAMBERLAIN, 1992; STOODLEY et al., 2002). Dessa maneira, a célula é liberada na sua forma planctônica para promover o crescimento de biofilme em uma outra região. Portanto, o tempo equivalente a 48h otimizado como tempo hábil para proporcionar a melhor morfologia do filme do material semiconductor.

Figura 13: Microscopia eletrônica de alta resolução (FEG-MEV) dos biofilmes microbianos obtidos com 24 (A), 48 (B) e 72 h de crescimento (C).



Fonte: Próprio autor.

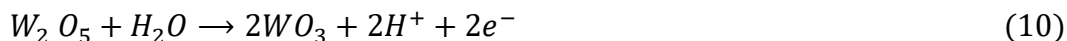
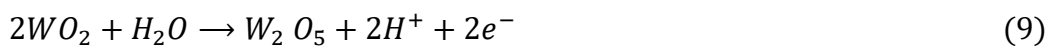
A Figura 14, compara a morfologia dos eletrodos obtidos após otimização das condições experimentais para formação dos eletrodos nanoporos de W/WO_3 após a anodização da placa de W ($1,0 \text{ cm}^2$) em meio de NaF $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$ sob potencial controlado de 60 V e subsequente eletrodeposição em solução precursora de W por 45 min a $-0,45 \text{ V}$ (Imagens A-C) na presença do biofilme microbiano. As imagens D-F mostram o eletrodo bioinspirado com recobrimento pelo filme de WO_3 com a morfologia bioinspirada (Imagens D-F), usando as condições otimizadas anteriormente. Nesta Figura, observa-se que após a calcinação os eletrodos bioinspirados apresentam uma estrutura onde o WO_3 crescido sobre o fungo manteve a estrutura do molde (fungo), mesmo após a calcinação a $450 \text{ }^\circ\text{C}$ e retirada do material biológico. Desta forma temos um eletrodo com a morfologia inspirada na estrutura do microrganismo previamente aderido na superfície, com um recobrimento homogêneo e uniforme.

Em ambos os processos para a formação de filmes nanoporoso ou bioinspirado, depósitos de WO_3 foram obtidos pelo processo de crescimento eletroquímico do filme de WO_3 em meio aquoso conforme descrito previamente na literatura (LAI, W., 2014; ZHU et al. em 2014). Inicialmente há uma etapa de oxidação anódica do tungstênio resultando na formação de mistura de óxidos como WO_2 , W_2O_5 e WO_3 , sendo as espécies contendo tungstênio com estado de oxidação W^{6+} predominantes no sistema, como pode ser visto através da análise das Equações de 7 a 10

a) Reações que ocorrem no cátodo

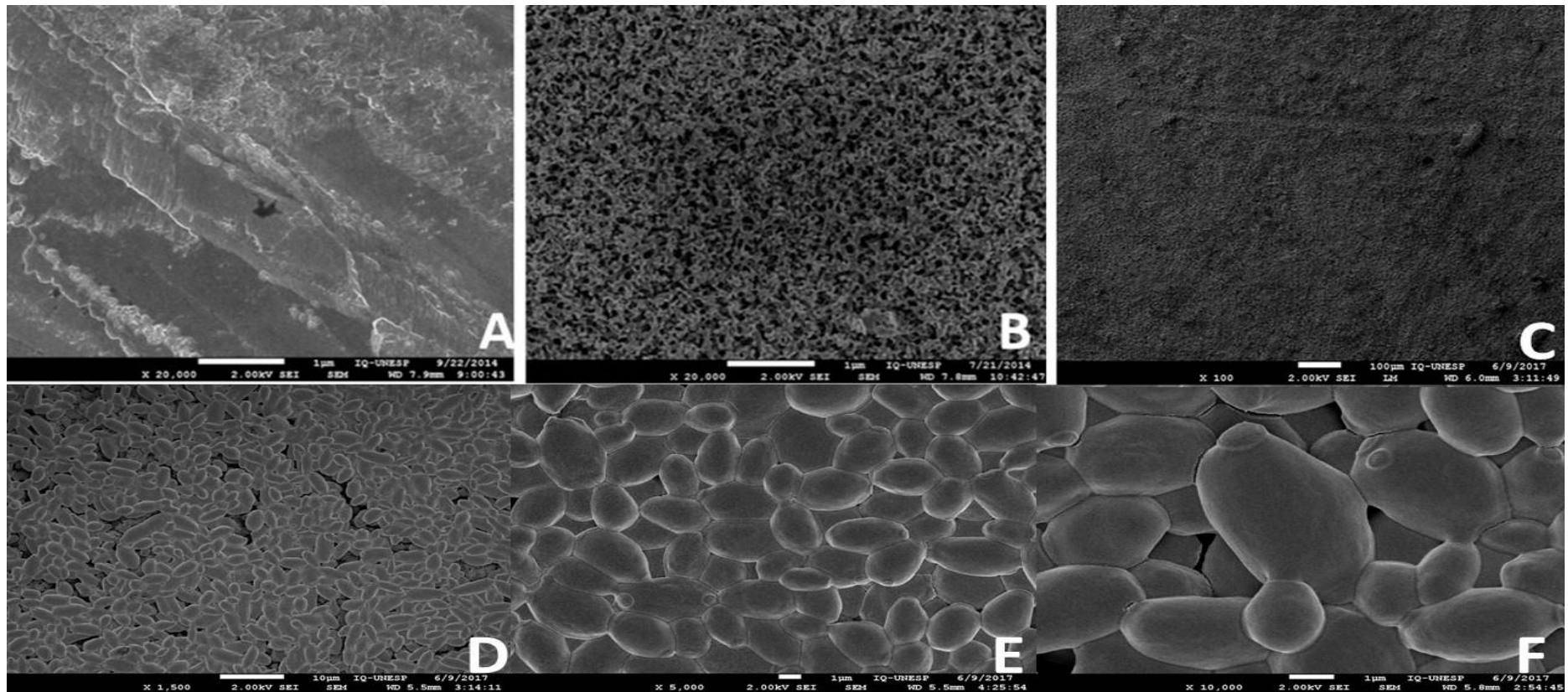


b) Reações que ocorrem no ânodo



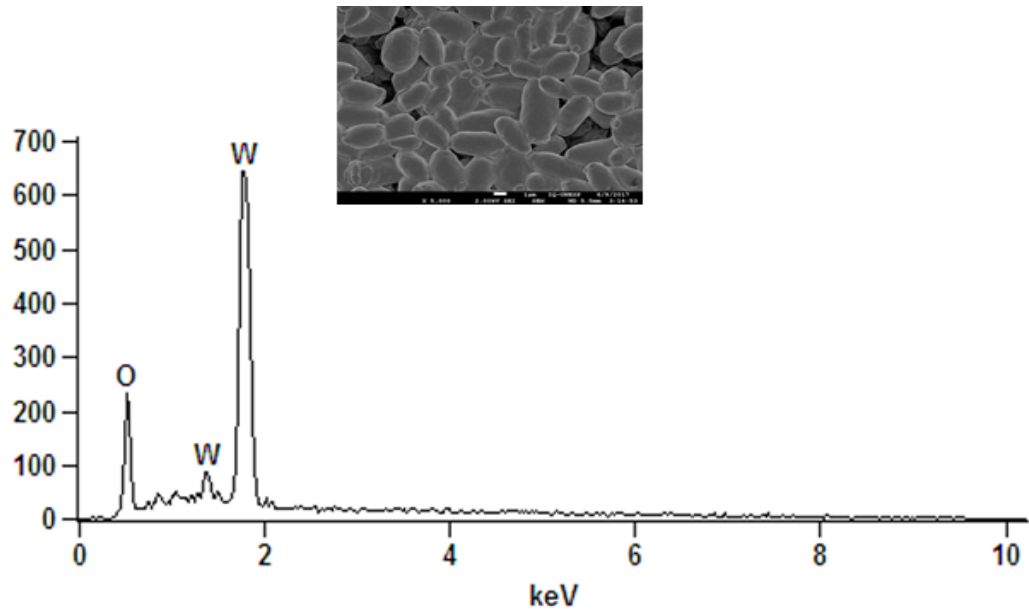
A Figura 15 apresenta o espectro de EDS (Energy-dispersive X-ray spectroscopy) para os elerodos bioinspirados de W/WO_3 . O espectro mostra a presença de tungstênio e oxigênio, sugerindo a formação do óxidos de tungstênio. Para a obtenção deste dado, foi utilizada uma voltagem de aceleração de 10 KV e amplificação de 5.000 vezes.

Figura 14: Imagens de microscopia eletrônica de alta resolução (FEG-MEV) de (A) folha de W, (B) eletrodos de W/WO₃ após a anodização em NaF 0,15 mol.L⁻¹, 60 V, 2h e após o crescimento do biofilme (C) seguido da eletrodeposição eletroquímica por 45 min a -0,45 V e calcinação a 450°C por 2h (D), (E) e (F).



Fonte: Próprio autor.

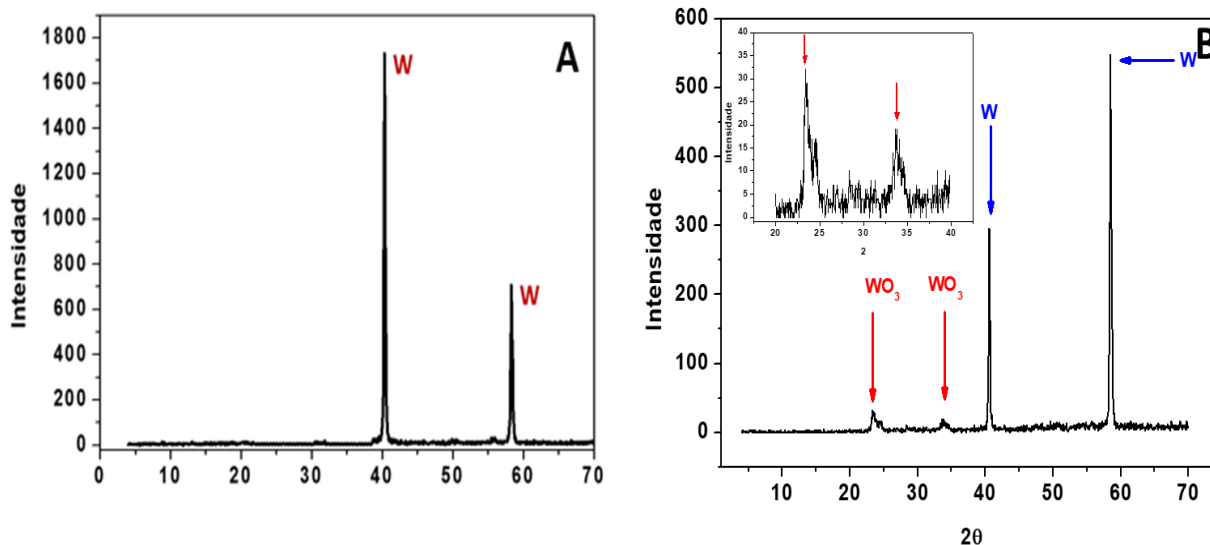
Figura 15: Imagem de microscopia eletrônica de alta eficiência dos eletrodos bioinspirados de WO_3 com o respectivo resultado das análises de EDS da região escolhida.



Fonte: Próprio autor.

A Figura 16 ilustra os difratogramas de raios-X da folha de tungstênio sem modificação (A) e após todas as etapas para a construção do eletrodo bioinspirado de W/WO_3 (B). Neste observa-se que a formação de WO_3 na sua forma monoclinica, forma mais fotoativa deste óxido, pela presença dos picos em ($2\theta = 23,06$; $2\theta = 23,71$; $2\theta = 24,36$; $2\theta = 33,16$ $2\theta = 33,65$ e $2\theta = 34$). Os picos em $2\theta = 40$ e $2\theta = 58$ podem ser atribuídos ao do tungstênio metálico.

Figura 16: Difratogramas de Raios-X obtidos para a folha de tungstênio sem modificação (A) e anodizada em NaF 0,15 mol.L⁻¹ e eletrodepositada em solução de precursora a 0,45 V (B).

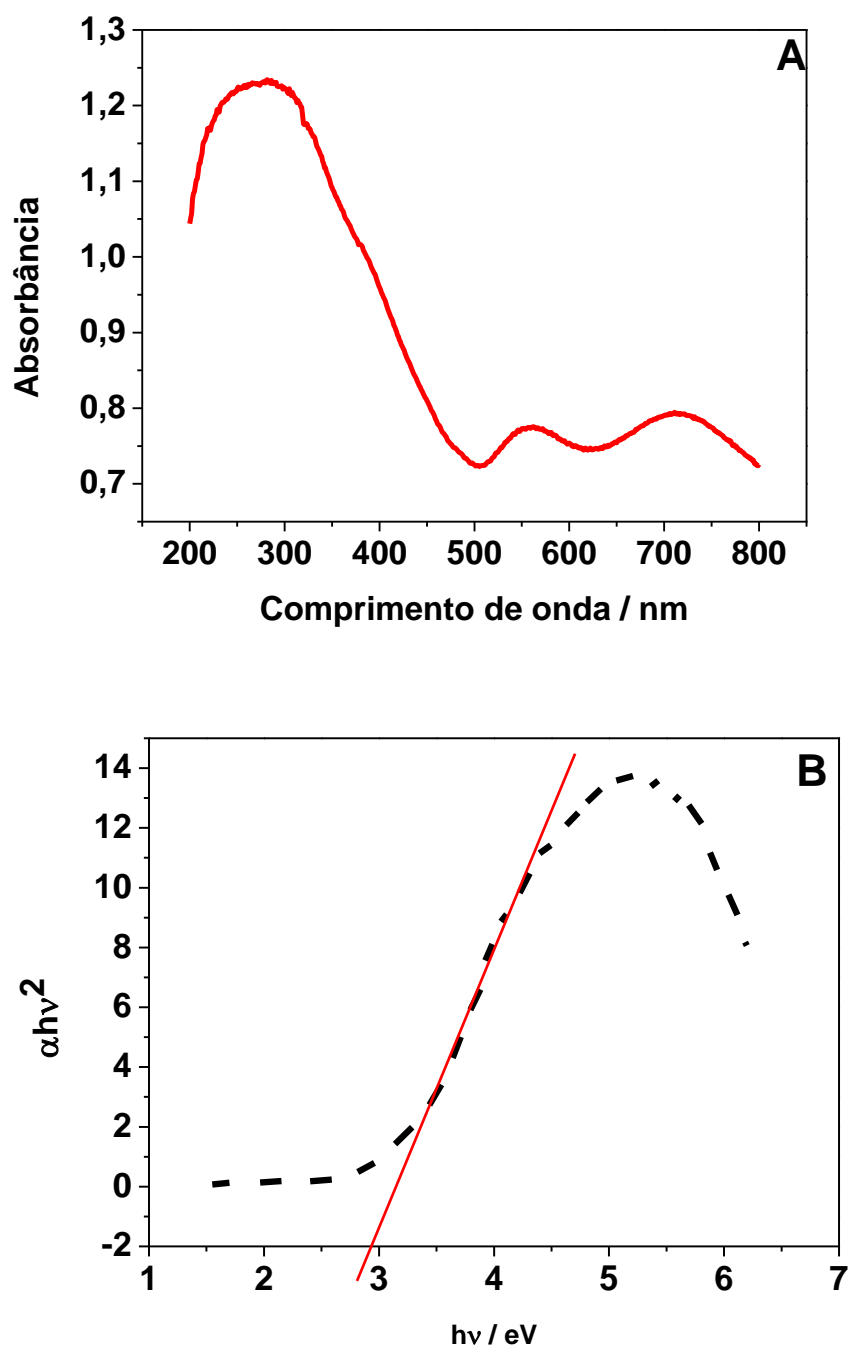


Fonte: Próprio autor.

Na Figura 17 pode-se observar uma curva típica de reflectância difusa (Curva A) obtida para o eletrodo bioinspirado de W/WO₃ e o gráfico proposto por Kubelka-Munk (Curva B), onde estimou-se os valores da energia de banda proibida (E_{bg}). A análise mostra que o material apresenta uma intensa banda de absorção na região do visível abaixo de 450nm de comprimento de onda sugerindo sua potencialização de fotoexcitação tanto na região do ultravioleta quanto na região do visível. A partir da construção do gráfico de Tauc foi calculado o band gap para o eletrodo bioinspirado de W/WO₃ mostrou E_{bg}= 2,9 eV, equivalente ao encontrado para o WO₃ na literatura (GONZÁLEZ-BORRERO et al., 2010; SOUZA et al., 2017).

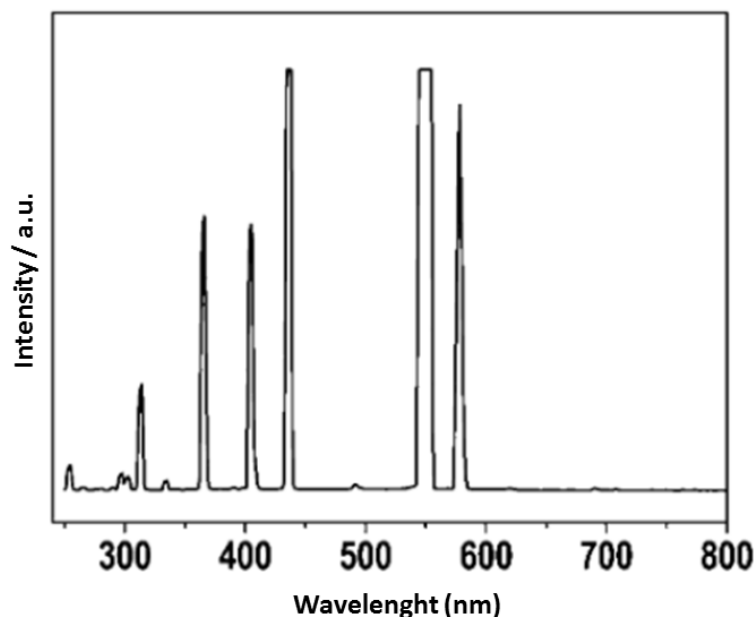
Estes resultados indicam que eletrodo bioinspirado de W/WO₃ ter um bom desempenho quando submetido à irradiação com lâmpada de vapor de mercúrio usada neste trabalho com emissões tanto no UV quanto no visível, como pode ser visto no espectro de emissão da lâmpada obtido na Figura 18, ou ser fotoexcitado na região do visível, melhorando economicamente o desempenho do sistema fotoeletroquímico.

Figura 17: Curva de reflectância difusa obtida para o eletrodo bioinspirado de W/WO₃ (A). Gráfico de Tauc construído para o cálculo do *band gap* do eletrodo de W/WO₃ obtido (B).



Fonte: Próprio autor.

Figura 18: Espectro da lâmpada de Vapor de Mercúrio (125W) utilizada na fotoexcitação do semicondutor construído.



Fonte: BESSEGATO et al., 2014.

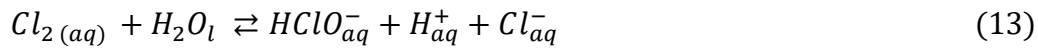
A Figura 19 apresenta as curvas de fotocorrentes *vs* potencial obtidas para o eletrodo bioinspirado de W/WO₃ em amostras de dialisato (Curva A) e efluente de hemodiálise coletado na Unidade de tratamento dialítico de Araraquara (Curva B) na ausência de luz e iluminado por uma lâmpada de 125W na região Visível, radiação filtrada com tudo de vidro - e UV-Vis. Os voltamogramas de varredura linear foram registrados sob velocidade de varredura de 10 mVs⁻¹, no intervalo de potencial entre -0,5 a 2,0V. Como previsto para um fotoânodo do tipo n (ver Figura 8), a fotocorrente é praticamente negligenciável na ausência de luz. No entanto, quando o eletrodo é exposto tanto à radiação UV quanto visível no dialisato, há um aumento pronunciado da fotocorrente para valores de potencial maior que 0V, mostrando que há separação de cargas fotogeradas a partir deste potencial.

O fotoânodo mostra que as cargas fotogeradas são formadas tanto sob radiação UV quanto sob luz visível, com decaimento de apenas 40% sob luz visível para fotocorrente tomada em potencial de +1.5V. Tal fenômeno observado pode ser atribuído à presença majoritária de cloreto de sódio no dialisato (Tabela 1) que quando adsorvido

no eletrodo pode gerar adicionalmente ao radical hidroxila - proveniente da oxidação da água, o radical cloro, como pode ser visto na Equação 5 (SOUZA, 2015). Este comportamento indica que o uso de NaCl como eletrólito suporte, embora presente em águas de hemodiálise, pode ser um agente complicador pela possibilidade de gerar radical cloro, que por sua vez pode ocasionar a formação de cloro ativo, conforme a seguinte equação:

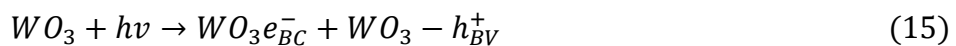


O cloro ativo corresponde ao somatório das espécies em meio aquoso em equilíbrio (PARRA, 2013; PASCHOAL; ANDERSON; ZANONI, 2009):



No entanto, os valores da fotocorrente decaem 50 % quando o mesmo eletrodo é exposto ao efluente proveniente da hemodiálise, provavelmente devido à complexidade da amostra por conta de uma alta matéria orgânica. Do mesmo modo, observa-se que embora o sistema responda à irradiação visível, há um decaimento de 80 % na fotocorrente tomada sob potencial de +1.5 V.

De acordo com a literatura, este comportamento indica que a geração de fotocorrente anódica corresponde à geração do par e-/h+ fotogerados, segundo a Equação 15. A separação de cargas propicia maior formação de buracos, que são responsáveis pela oxidação da água e geração de radicais hidroxilas na superfície do eletrodo (Equação 16). Reações que ocorrem no fotoânodo:



Capítulo 1: Resultados e Discussão

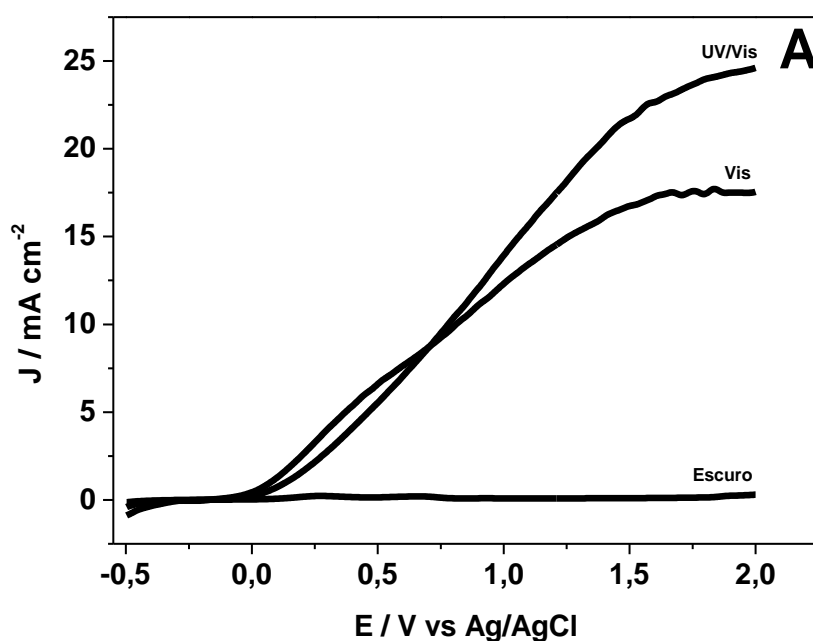
A amostra do efluente contém grande quantidade de espécies orgânicas na composição (Demanda química de oxigênio igual a 1200 mg mL^{-1} proporcionando menor condutividade para o efluente. A Tabela 2 mostra os valores de condutividade, carbono orgânico total (TOC) e demanda química de oxigênio (DQO) medidos para o dialisato e para a água de hemodiálise.

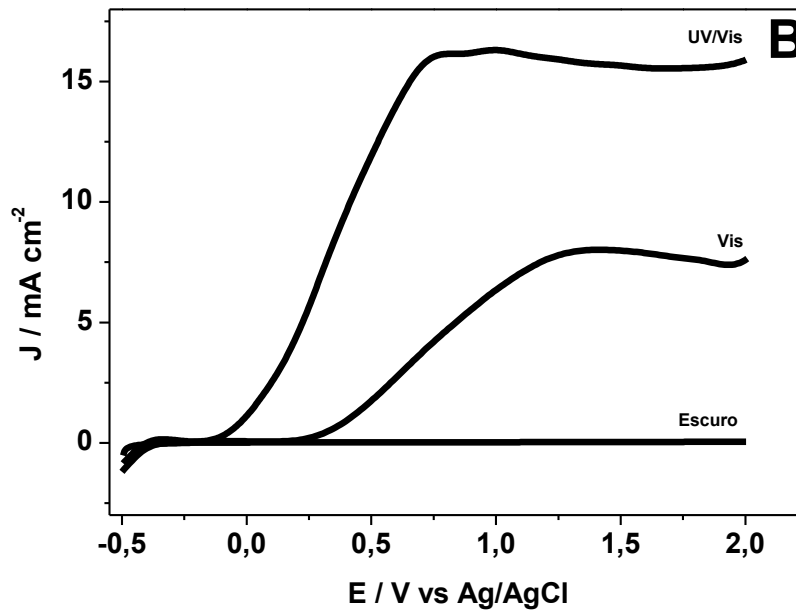
Tabela 2: Valores iniciais de TOC, DQO e condutividade e pH medidos para o dialisato e efluente

	pH	Condutividade	DQO
Dialisato	7,3	$16,6 \mu\text{S}$	-
Efluente	6,8	$14,3 \mu\text{S}$	1200 mg L^{-1}

Fonte: Próprio autor.

Figura 19: Curvas de fotocorrente vs potencial obtidas para o para o eletrodo bioinspirado de W/WO_3 na ausência de luz e iluminado por uma lâmpada de 125W na região UV/Vis e Vis em meio de dialisato (A) e dialisado (B). Variação de potencial de -0,5 a 2,0V, velocidade de varredura igual a 10 mVs^{-1} .





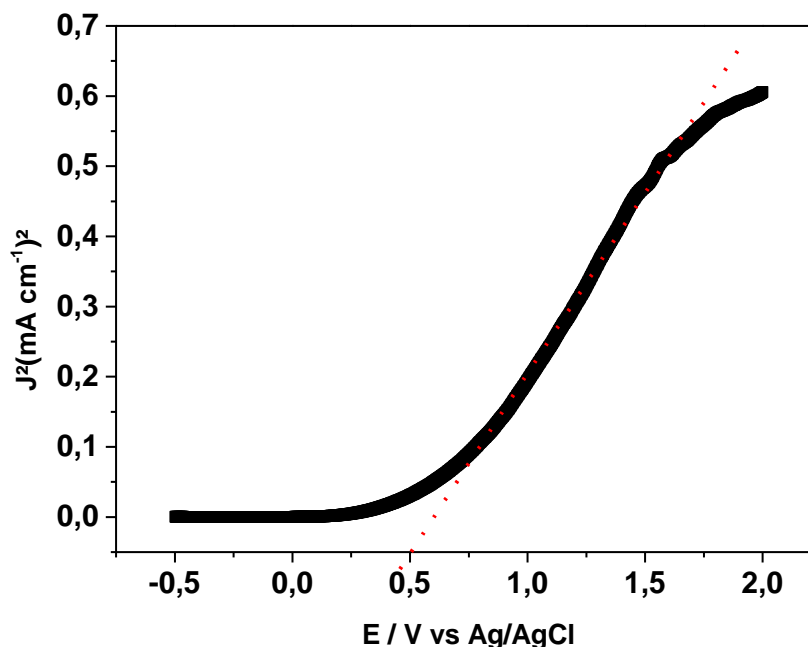
Fonte: Próprio autor.

Adicionalmente, foi calculado o potencial de banda plana (E_{fb}) para o fotoânodo em dialisato, utilizando-se a equação de Butler (BUTLER, 1977):

$$J_f^2 = \left(\frac{2q\varepsilon\varepsilon_0 I_0^2 \alpha^2}{N_d} \right) (E - E_{fb}) \quad (17)$$

Sendo J_f = densidade de fotocorrente, q = carga do elétron, ξ = constante dielétrica, ξ_0 = permeabilidade no vácuo, I_0 = fluxo fotônico, α = coeficiente de absorção, N_d = densidade efetiva de estados na banda de condução, E = potencial aplicado e E_{fb} = potencial de banda plana.

Figura 20: Quadrado da densidade de fotocorrente vs. potencial aplicado para eletrodo de W/WO₃ em dialisato sob irradiação UV, sendo a área dos eletrodos 1 cm².



Fonte: Próprio autor.

O gráfico do quadrado da fotocorrente vs. potencial resulta em uma reta, cujo intercepto corresponde ao E_{fb}. A Figura 20 ilustra o potencial de banda plana calculado para o eletrodo bioinspirado de W/WO₃ irradiado com energia na região do UV-Vis na presença do dialisato como eletrólito suporte. Para este eletrodo, sob essas condições, foi encontrado um valor de aproximadamente 0,5 V vs. Ag/AgCl, corroborando com valores encontrados na literatura (FRAGA; ZANONI, 2011).

4.1.2. Eletrodos bioinspirados W/WO₃-Ag

Visando melhorar a eficiência fotoeletrocatalítica do material produzido, a construção dos eletrodos de bioinspirados W/WO₃-Ag foi investigada utilizando a deposição química de nanopartículas de prata usando polidopamina (PDA) como agente ancorante. Tal metodologia é baseada na reação de polimerização da dopamina na

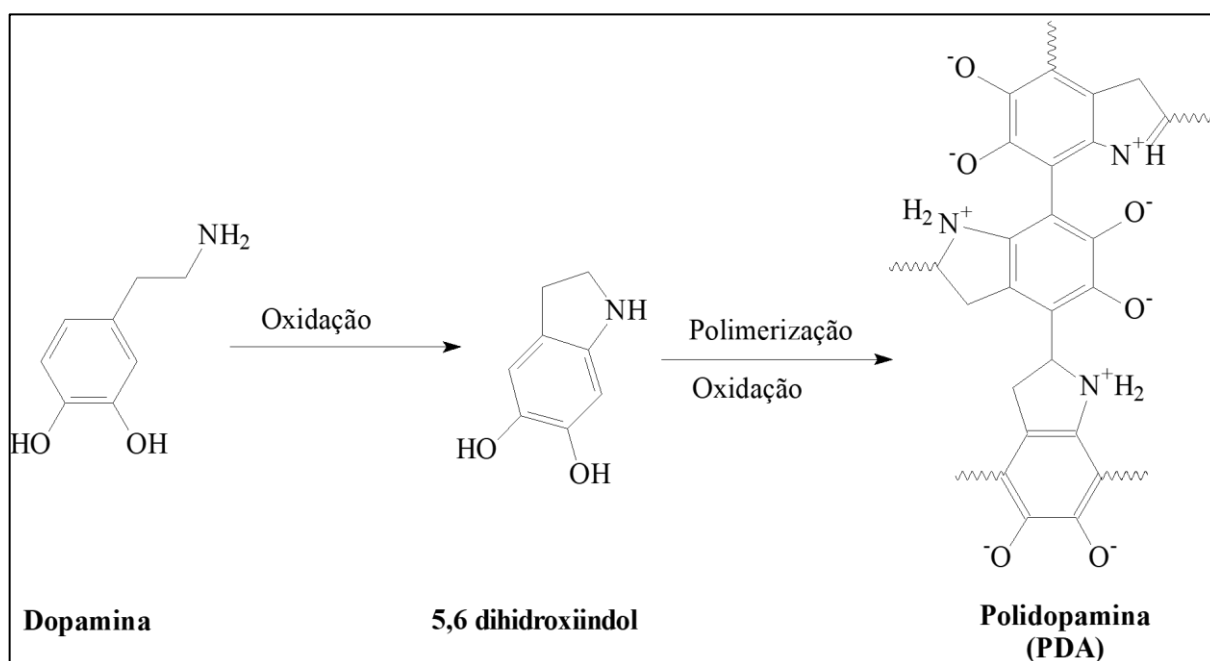
superfície do substrato, formando a PDA *in situ* (TRIPATHY et al., 2016; XU et al., 2017), conforme o mecanismo presente na Figura 21.

Trabalhos recentes na literatura reportam a atuação da polidopamina como um excelente agente redutor de metais devido à presença do seu grupo catecol, formando o complexo dopamina-metal (XU et al., 2017). Partindo desse princípio, o eletrodo foi modificado conforme descrito procedimento experimental no item 3.2.4.1.

PDA é um polímero, capaz de aderir a quase todos os substratos simplesmente através da imersão do substrato em uma solução de dopamina previamente preparada, de acordo com estudos publicados recentemente (GAN et al., 2020). Trabalhos recentes na literatura reportam a atuação da polidopamina como um excelente agente redutor de metais devido à presença do seu grupo catecol, formando o complexo dopamina-metal. Partindo desse princípio, o eletrodo foi modificado conforme descrito procedimento experimental no item 3.2.1.4

Por causa da sua alta biocompatibilidade e ótimas propriedades optoeletrônicas, a PDA vem sendo utilizada para uma ampla gama de aplicações em tratamento de efluentes, síntese de material de revestimento, liberação controlada de fármacos e sensores (YE; ZHOU; LIU, 2011).

Figura 21: Rota de reação para a polimerização da dopamina



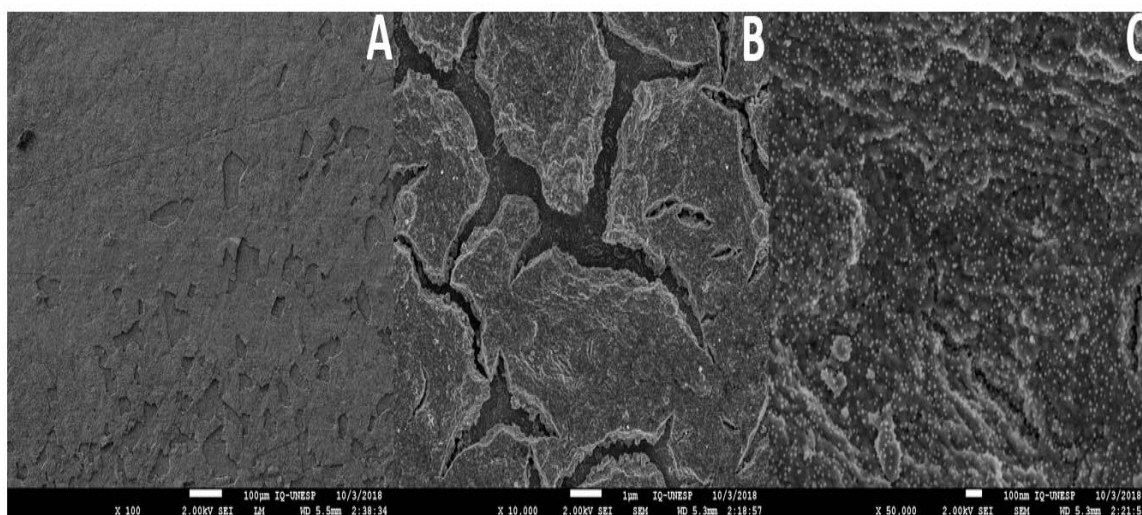
Fonte: Adaptado de QI YAWEI et al., 2019

A Figura 22 mostra a imagem de microscopia eletrônica de alta resolução obtida para o eletrodo em questão.

Dessa maneira, pode-se verificar que a modificação ocasionou na perda da morfologia inicial dos eletrodos bioinspirados. Apesar de se observar a presença das nanopartículas de prata no sistema (imagem C), a PDA formou um filme bastante espesso na superfície do eletrodo, contribuindo para a perda da morfologia inicial. Embora a morfologia inicial tenha sido perdida, os eletrodos foram aplicados em medidas fotoeletrocatalíticas.

É de grande relevância salientar que a modificação com Ag foi proposta devido basicamente às propriedades antimicrobianas atribuídas a esse material e pelo fato da prata também ser bastante utilizada como segundo metal na preparação de eletrodos bimetálicos por apresentar uma significativa atividades catalítica (BRUGNERA, 2013; MOKHTAR MOHAMED; OSMAN; KHAIROU, 2015).

Figura 22: Microscopia eletrônica de alta resolução (FEG-MEV) dos eletrodos bioinspirados de W/WO₃ modificados com Ag pela deposição química de PDA com diferentes escalas.

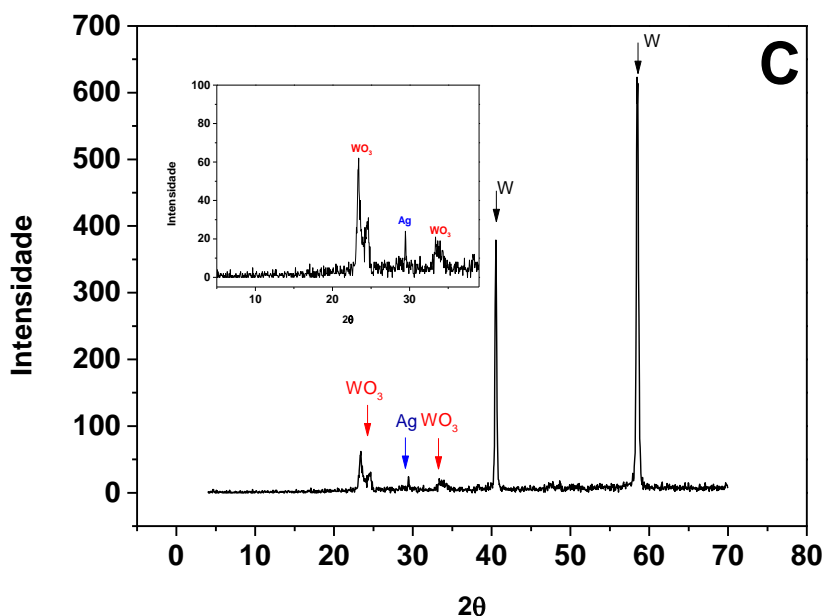


Fonte: Próprio autor.

A Figura 23 mostra os resultados provenientes da análise da difração de Raios-X a qual confirma a presença de prata na superfície do material. Apesar de apresentar um

resultado inferior quando comparado ao eletrodo bioinspirado de W/WO₃ estes também foram aplicados em reações fotoeletrocatalíticas.

Figura 23: Difratograma de Raios-X obtidos para o eletrodo bioinspirado W/WO₃-Ag.



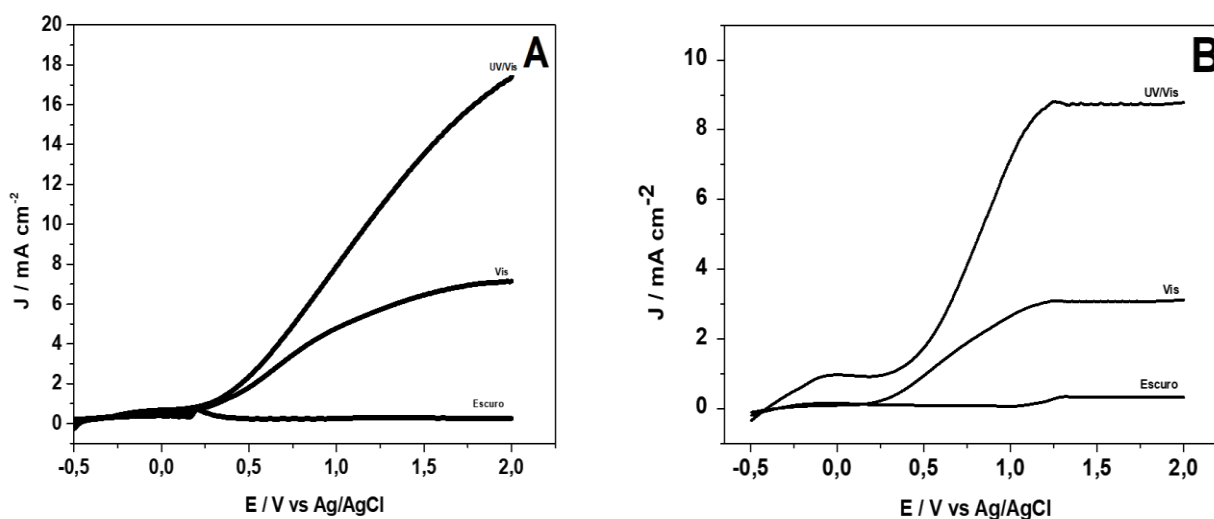
Fonte: Próprio autor.

A Figura 24 apresenta as curvas de fotocorrentes *vs* potencial obtidas para o eletrodo bioinspirado de W/WO₃-Ag em amostras de dialisato de hemodiálise (A) quanto efluente (B) coletados na Unidade de tratamento dialítico de Araraquara na ausência de luz e iluminado por uma lâmpada de 125W na região Visível e UV-Vis . Os voltamogramas de varredura linear foram registrados sob velocidade de varredura de 10 mVs⁻¹, no intervalo de potencial entre -0,5 a 2,0V. Como previsto para um fotoânodo do tipo n e semelhante ao eletrodo bioinspirado de W/WO₃, a fotocorrente é praticamente negligenciável na ausência de luz. No entanto, quando o eletrodo é exposto tanto à radiação UV quanto visível no dialisato, há um aumento significativo da fotocorrente para valores de potencial mais positivo que 0V, mostrando que há separação de cargas fotogeradas a partir deste potencial. O fotoânodo mostra que as cargas fotogeradas são

Capítulo 1: Resultados e Discussão

formadas tanto sob irradiação UV quanto sob luz visível, com decaimento de apenas 61% sob luz visível para fotocorrente tomada em potencial de +2.0V.

Figura 24: Figura 24: Curvas de fotocorrente vs potencial obtidas para o para o eletrodo bioinspirado de W/WO₃-Ag na ausência de luz e iluminado por uma lâmpada de 125W na região UV/Vis e Vis em meio de dialisato (A) e Efluente (B). Variação de potencial de -0, de -0,5 a 2,0V, velocidade de varedura igual a 10 mVs⁻¹.

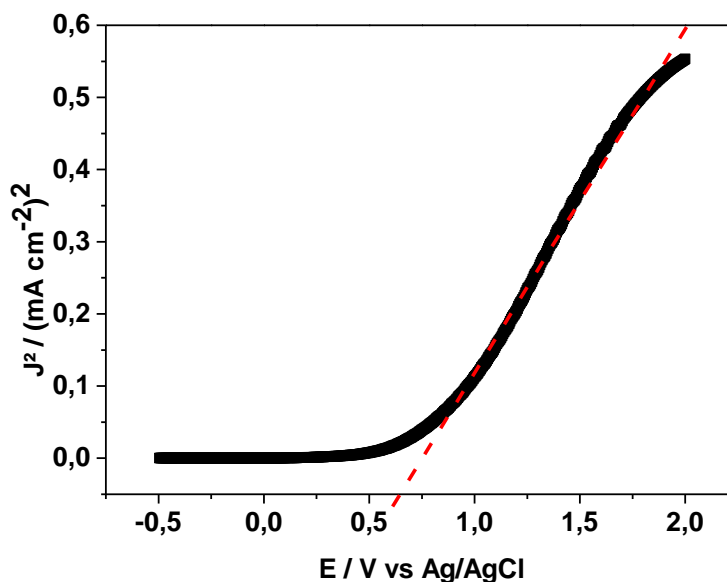


Fonte: Próprio autor.

Como já esperado, as fotocorrentes medidas utilizando o efluente como eletrólito suporte foram menores quando comparadas apenas ao dialisato devido ao fato da complexidade dessa matriz, rica em material orgânico. Entretanto, ainda foi observada uma fotocorrente de aproximadamente 9 mA cm⁻², mostrando a viabilidade do uso do presente eletrodo neste meio. Ademais, quando se compara o eletrodo modificado com prata em relação ao eletrodo sem modificação, verifica-se que este último apresentou melhores valores de fotocorrente o que corrobora com os valores de *band gap* e *flat band* previamente calculados.

Na Figura 25 encontra-se o gráfico de densidade de corrente utilizado para o cálculo de potencial de flat band para o eletrodo de W/WO₃-Ag através da Equação de Butler. O potencial obtido foi de 0,6 V, superior ao eletrodo bioinspirado de W/WO₃.

Figura 25: Quadrado da densidade de fotocorrente vs. potencial aplicado para eletrodo de W/WO₃ - Ag em dialisato sob irradiação UV, sendo a área dos eletrodos 1 cm².

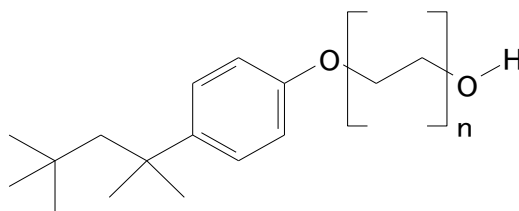


Fonte: Próprio autor.

4.1.3. Eletrodo de W/WO₃ feito por template sintéticos de poliestireno

O processo de produção do eletrodo W/WO₃ construído por moldes sintéticos utilizou processo de eletrodeposição após recobrimento prévio da superfície com esferas de poliestireno. Neste trabalho utilizou-se o método “*casting*”, que consiste na deposição de um volume fixo da suspensão de esferas com uma pipeta (GUARALDO et al., 2016). A primeira etapa de otimização, foi a investigação da adição do surfactante Triton X-100, vide Figura 26, o qual é uma molécula de caráter anfífilico (aniônico) que promove melhor adsorção de poliestireno sobre a superfície metálica, permitindo a distribuição homogênea das partículas. O caráter hidrofílico/hidrofóbico dos substratos irá também determinar a concentração de surfactante ideal de Triton X-100 (BESSEGATO; GUARALDO; ZANONI, 2014; GUARALDO et al., 2016).

Figura 26: Estrutura molecular do Triton X-100



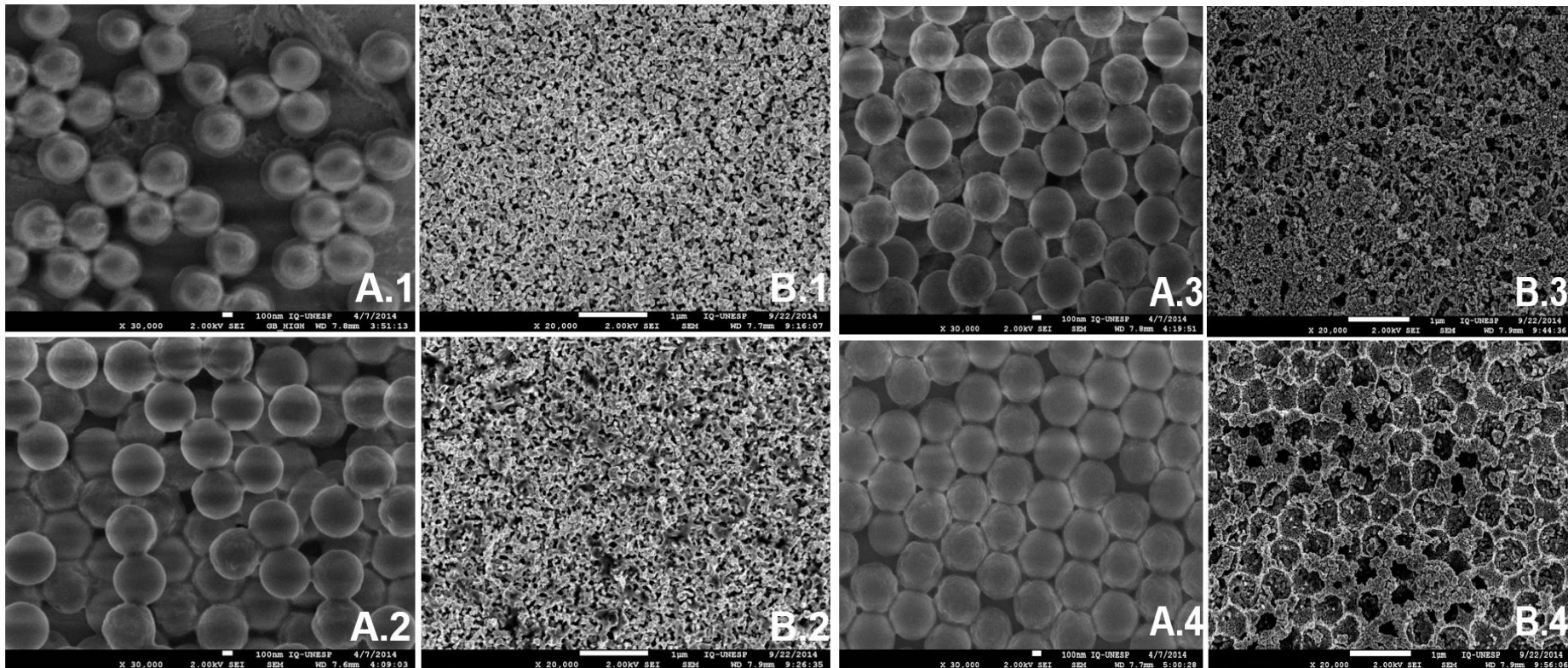
Fonte: Próprio autor.

A influência da concentração de Triton X-100 foi investigada no intervalo de $1,0 \times 10^{-7}$ a $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, adicionando-se um volume fixo de $70 \mu\text{L}$ de suspensão sobre a superfície do eletrodo. Imagens FEG-SEM destes depósitos são mostrados na Figura 27 (Imagens A.1 a A.4). Os resultados obtidos para os eletrodos recobertos com esferas de poliestireno monodispersas (500nm) em surfactante Triton X-100 após recobrimento pelos filmes de WO_3 crescidos na superfície por eletrodeposição (Imagens B.1 a B.4).

As imagens identificadas como A mostram total recobrimento da superfície, com ligeira diferença apenas nas concentrações mais baixas do surfactante. A organização das esferas sobre a superfície do substrato aumenta com o aumento da concentração de Triton X-100 em todas as imagens. Além disto, observa-se que a distribuição das esferas pelo substrato difere ligeiramente no centro e nas extremidades. No centro, as esferas tendem a se separar e nas extremidades observa-se uma maior concentração das esferas, formando uma camada mais espessa. Este comportamento é conhecido como efeito “*coffee ring*” que ocorre devido ao ângulo de contato entre a gota depositada e o substrato, que faz com que as esferas se separem no centro e se juntem nas extremidades. Tal fenômeno observado ocorre devido à diferença de hidrofobicidade/hidrofilicidade do material que forma o substrato (GUARALDO et al., 2013).

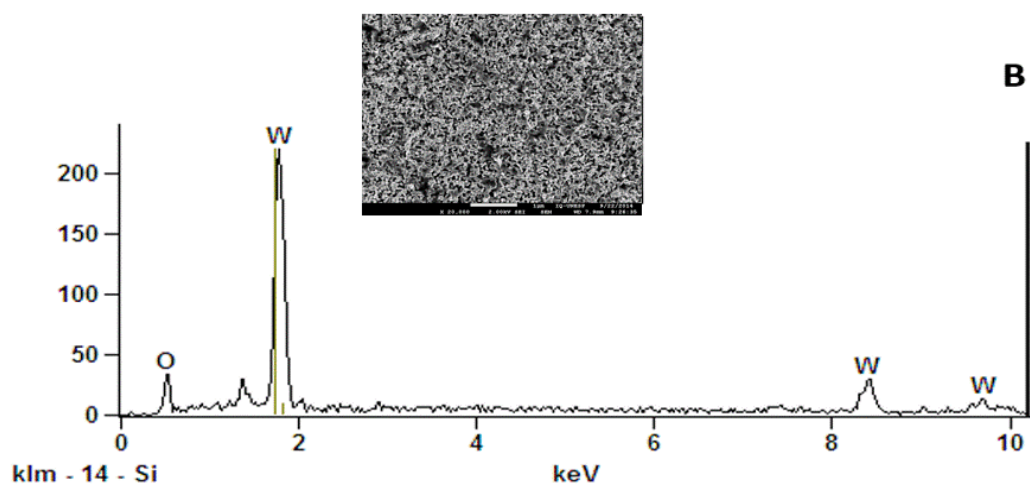
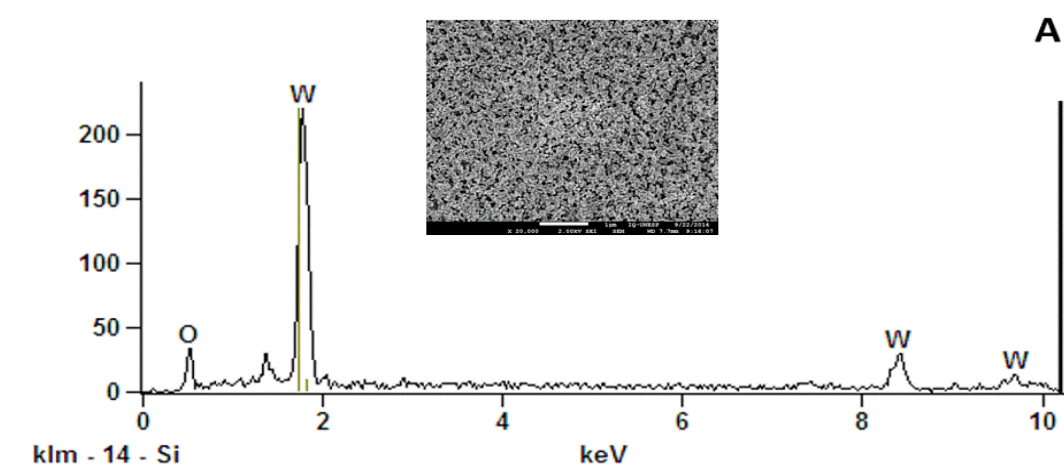
Quando são analisadas as imagens B das figuras apresentadas, verifica-se que o filme eletrodepositado não se formou adequadamente, exceto na concentração mais alta de Triton-X. Os demais apresentam uma morfologia nanoporosa. Sendo assim concentração de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ foi adotada. A composição do filme eletrodepositado nessa condição foi confirmada por EDS, como mostrado na Figura 28.

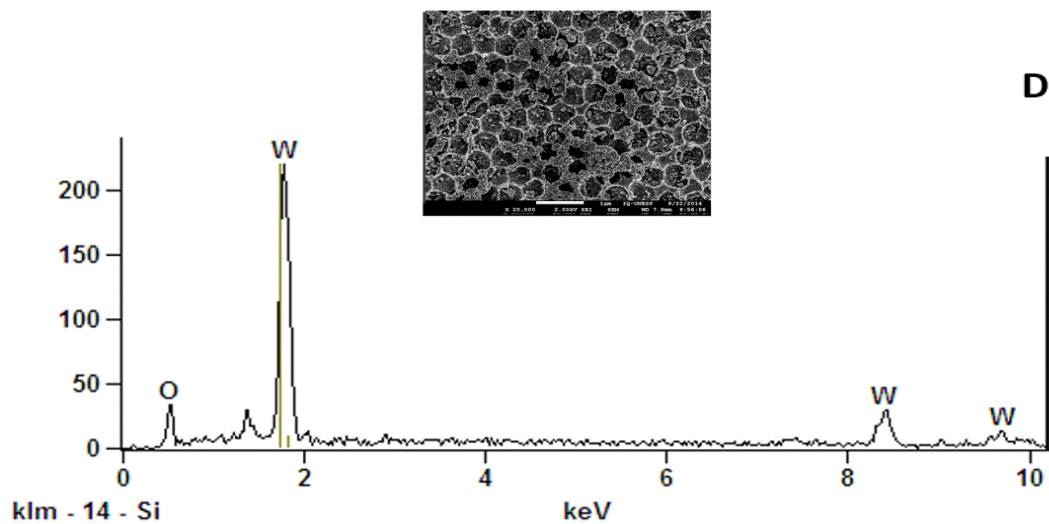
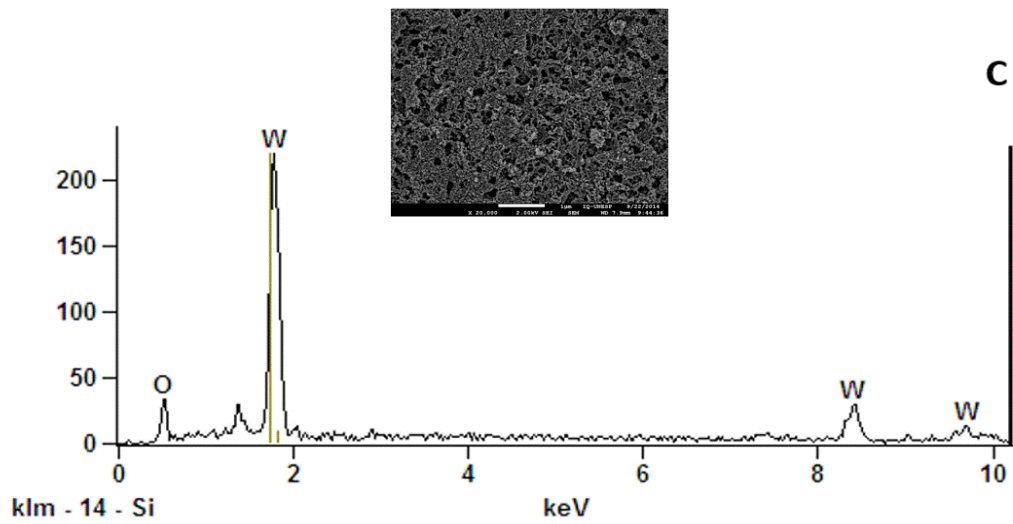
Figura 27: Microscopia eletrônica de alta resolução (FE-SEM) dos eletrodos de W/WO₃ recobertos por nanoesferas de poliestireno a uma concentração de Triton X-100 de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ (A) e depois do filme eletrodepositado (B) para as concentrações de 1×10^{-7} (1), $1,0 \times 10^{-6}$ (2), $1,0 \times 10^{-5}$ (3) e $1,0 \times 10^{-4}$ (4) mol L⁻¹



Fonte: Próprio autor.

Figura 28: Imagens de microscopia eletrônica de alta eficiência dos eletrodos de WO_3 com o respectivo resultado das análises de EDS da região escolhida para as concentrações de $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ (A), $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ (B), $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (C) e $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (D).





Fonte: Próprio autor.

Com base nos dados obtidos, verifica-se qualitativamente a presença de tungstênio e oxigênio no eletrodo construído. Em seguida, investigou-se o efeito do volume das esferas no filme formado. A Figura 29 ilustra os difratogramas de raios-X da folha de tungstênio sem modificação (A) e para os eletrodos construídos por *templates* em

diferentes concentrações de Triton X-100. $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ (B), $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (C), $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (D) e $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (E).

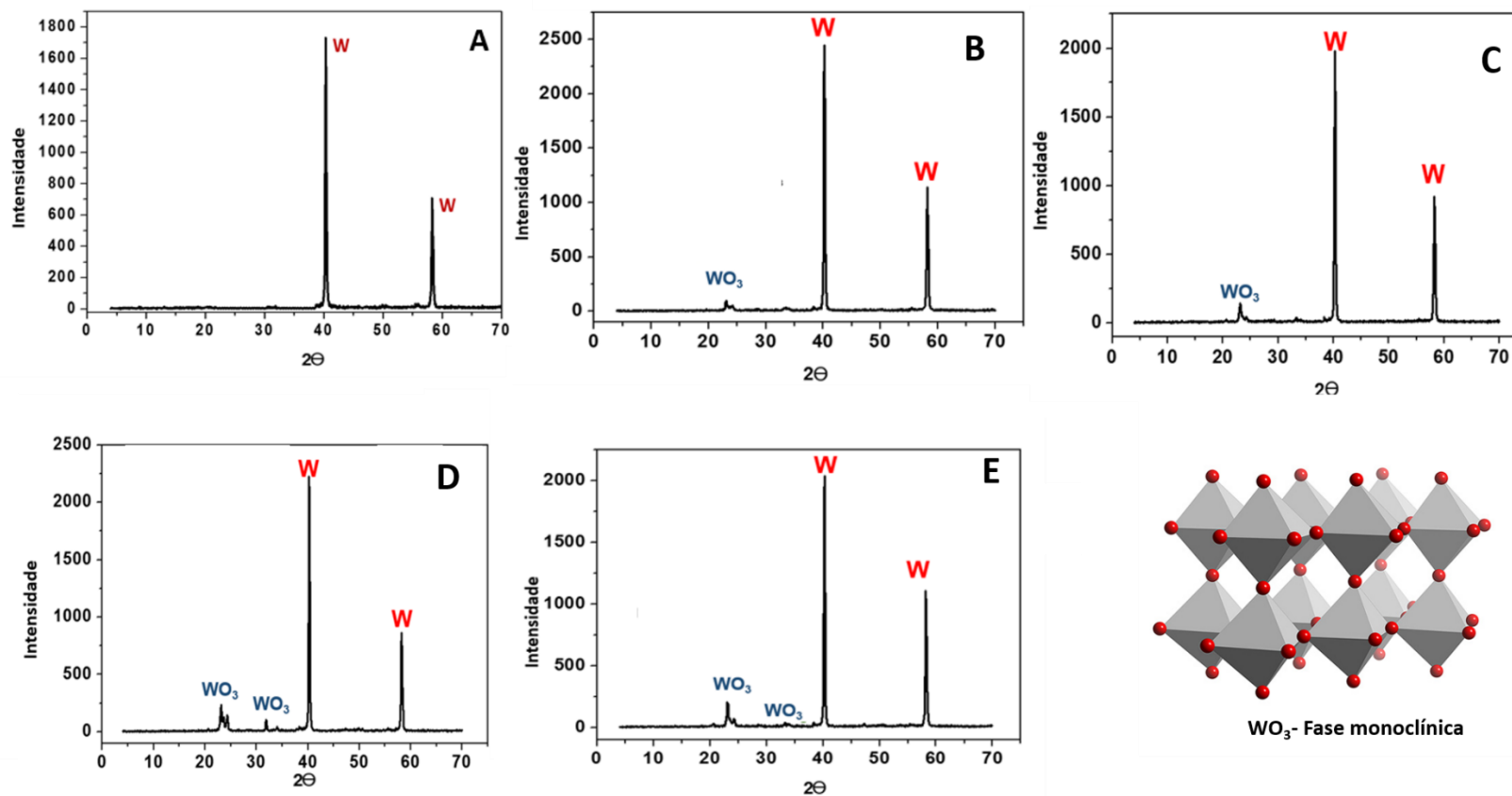
Observa-se claramente que houve uma alteração da placa de W após a anodização devido à formação de WO_3 na sua forma monoclinica, forma mais fotoativa deste óxido, pela presença dos picos em ($2\theta = 23,06$; $2\theta = 23,71$; $2\theta = 24,36$; $2\theta = 33,16$ $2\theta = 33,65$ e $2\theta = 34$). Os picos em $2\theta=40$ e $2\theta=58$ são provenientes do tungstênio metálico (FRAGA et al., 2009).

Diante dos resultados obtidos, otimizou-se a concentração do surfactante empregado para $1 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, uma vez que esta propiciou uma melhor formação do filme nanoestruturado e de acordo com os espectros de DRX, maior intensidade dos picos correspondente à fase monoclinica do WO_3 , o que corrobora com os valores de fotocorrentes medidos e encontrados na Tabela 3.

Uma vez otimizado a concentração de Triton X-100, a próxima etapa de otimização foi a determinação do volume de suspensão das esferas monodispersas de poliestireno sobre a superfície do eletrodo de W, o qual tem influência direta na qualidade da deposição e por consequência, na formação do filme que será eletrodepositado posteriormente. Para isto, estudou-se o efeito da adição de 50, 70 e 90 μL da suspensão de esferas monodispersas (500 nm) em Triton X-100 $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Análises de microscopia eletrônica de alta eficiência (FEG-SEM) foram realizadas e os resultados são apresentados na Figura 30.

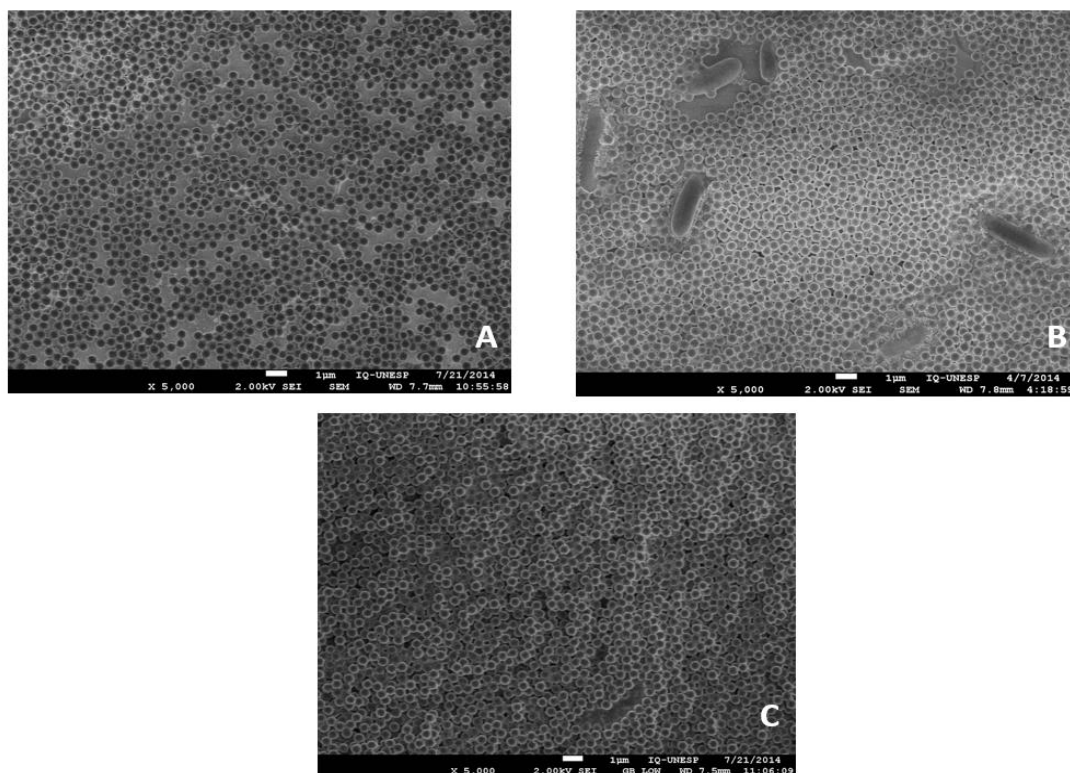
A análise da Figura 30 revela que o aumento do volume de suspensão depositado ocasiona em um melhor preenchimento da superfície de tungstênio pelas esferas. O volume de 50 μL (Figura 30 A) não foi suficiente para o total recobrimento da superfície e o volume de 70 μL (Figura 30 B) de *templates* demonstrou um melhor recobrimento que o anterior, entretanto ainda assim apresentou falhas no preenchimento da superfície. Os melhores resultados foram obtidos com a utilização de um volume de 90 μL da suspensão precursora de *templates* que demonstrou um preenchimento mais homogêneo, sem grandes regiões expostas do substrato.

Figura 29: Difratogramas de Raios-X obtidos para a folha de tungstênio sem modificação (A) e para os eletrodos construídos por *templates* em diferentes concentrações de Triton X-100. $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (D), $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (E), $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (F) e $10^{-7} \text{ mol. L}^{-1}$



Fonte: Próprio autor

Figura 30: Microscopia eletrônica de alta resolução (FE-SEM) dos eletrodos de W recobertos por nanoesferas de poliestireno a uma concentração de Triton X-100 de $1,0 \times 10^{-4}$ com diferentes volumes: 50 μL (A), 70 μL (B) e 90 μL (C).



Fonte: Próprio autor.

A seguir avaliou-se a fotoatividade dos eletrodos de W/WO_3 construídos por moldes de poliestireno usando diferentes concentrações de Triton X-100.

A Tabela 3 mostra os valores de fotocorrente obtidos dos voltamogramas lineares registrados para o eletrodo de W/WO_3 construído por anodização seguido de eletrodeposição com moldes sintéticos. Os eletrodos foram denominados de eletrodo 1, 2, 3 e 4 de acordo com a concentração de surfactante utilizada. As voltametrias lineares foram em meio de dialisato e efluente de processo de hemodiálise, sendo os fotoânodos irradiados com radiação UV/VIS e VIS. A maior fotocorrente obtida foi observada para o eletrodo produzido com a maior quantidade de surfactante (eletrodo 4) corroborando com os dados anteriores que indicam melhor recobrimento, maior uniformidade e crescimento dos filmes obtidos por eletrodeposição no *template* e foi utilizado nas medidas posteriores de fotoeletrocatalise do dialisato e da água de hemodiálise. Para este

Capítulo 1: Resultados e Discussão

eletrodo foi calculado o potencial de banda pelo Equação de Butler e foi obtido um valor equivalente a 0,28 V.

Tabela 3: Efeito do eletrodo sobre os valores de fotocorrente observados para diferentes concentrações de Triton X-100 em meio de dialisato efluente utilizando radiação UV/Vis e Vis. Eletrodos 1) 1×10^{-7} mol L⁻¹, 2) 1×10^{-6} mol L⁻¹ 3) 1×10^{-5} mol L⁻¹ e 1×10^{-4} mol L⁻¹, 90 µL de suspensão.

Radiação UV\VIS			
Eletrodo	Triton-X 100 Mol L ⁻¹	Fotocorrente (mA) Efluente	Fotocorrente (mA) Dialisato
1	1×10^{-7}	4	9
2	1×10^{-6}	5	11
3	1×10^{-5}	5	10
4	1×10^{-4}	11	19

Radiação Vis			
Eletrodo	Triton-X 100 Mol L ⁻¹	Fotocorrente (mA) Efluente	Fotocorrente (mA) Dialisato
1	1×10^{-7}	1	7
2	1×10^{-6}	1	10
3	1×10^{-5}	2	5
4	1×10^{-4}	5	8

Fonte: Próprio autor.

4.2. Medidas fotolíticas, fotocatalíticas e fotoeletrocatalíticas

Nos tópicos a seguir estão descritas as análises referentes às medidas de desinfecção realizadas para *C. parapsilosis* na sua forma livre (planctônica) e de biofilme em meio de dialisato e efluente utilizando os três eletrodos produzidos. As medidas foram conduzidas utilizando o reator presente na Figura 11 e monitoradas com as técnicas relatadas anteriormente.

4.2.3. Aplicação dos eletrodos bioinspirados de W/WO_3

4.2.3.1. Reações fotoeletrocatalíticas realizadas utilizando dialisato como suporte e microrganismo na sua forma planctônica

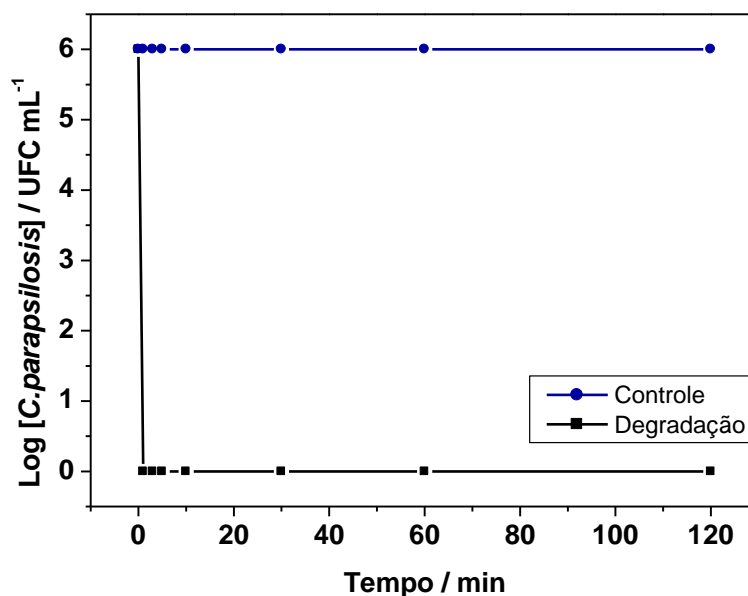
Os eletrodos bioinspirados produzidos foram aplicados em sistemas fotoeletrocatalíticos, conforme a Figura 31.

Objetivando realizar a desinfecção do dialisato e do efluente provenientes da hemodiálise. Para esta etapa, foram utilizados eletrodos com dimensões de 4 x 4 cm² e ambos os dialisatos foram fortificados propositalmente com $1,0 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ de *C. parapsilosis*.

A Figura 31 mostra a curva do decréscimo da contagem microbiana durante 120 min de tratamento. Adicionalmente, uma suspensão de *C. parapsilosis* foi preparada e mantida sem nenhum tratamento por duas horas e usada como controle.

Os resultados indicam que há total inativação após 1 min de tratamento, mostrando promissora aplicação da metodologia. A seguir foram investigados alguns parâmetros que poderiam afetar o sucesso da aplicação da metodologia em amostras de água residuais de hemodiálise, para isto utilizou-se o dialisato como modelo.

Figura 31: Curva de contagem microbiana obtida durante 120 min de tratamento fotoeletrocatalítico para o dialisato (pH 7,2) fortificado com $1,0 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ de *C. parapsilosis*, E = + 1,5 V sob irradiação UV/Vis.



Fonte: Próprio autor.

4.2.3.1.1. Otimização de parâmetros para um melhor desempenho fotoeletrocatalítico

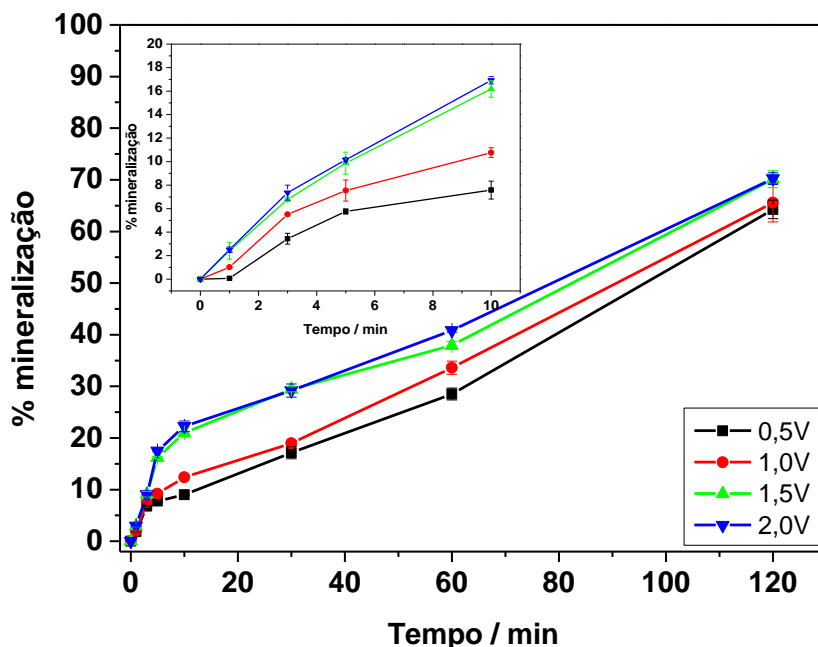
4.2.3.1.1.1. Efeito do potencial aplicado

A influência do potencial externo aplicado no fotoanodo bioinspirado de W/WO₃ sobre a eficiência do processo foi testada em dialisato fortificado com $1,0 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ de *C. parapsilosis*, no intervalo de 0,5 a 2,0 V vs e irradiação UV-VIS. Alíquotas do tratamento foram retiradas e submetidas à contagem microbiana durante 120 minutos de reação. Para a contagem microbiana, observa-se que há total remoção da *C. parapsilosis* após 1 min de tratamento em qualquer dos potenciais testados entre 0,5 e 2V, possivelmente porque estes potenciais são superiores ao potencial de banda plana do semiconductor (0 V) mostrando que é possível promover a separação de

cargas mesmo em potencial ao redor de 0,30V, corroborando com o valor *band gap* calculado.

A Figura 32 mostra a variação de carbono orgânico total dissolvido durante as fotoeletrocatalises conduzidas para o dialisato fortificado com $1,0 \times 10^6$ UFC mL^{-1} de *C. parapsilosis* durante os 120 min de tratamento fotoeletrocatalítico. Embora tenha ocorrido a morte das leveduras após um minuto de tratamento para todos os valores de potenciais estudados, as porcentagens de mineralização obtidas após 120 minutos de tratamento apresentaram cinéticas de remoção de COT diferenciadas, principalmente para os 10 minutos iniciais de reação, como pode ser visto no gráfico inserido na Figura 32.

Figura 32: Remoção de carbono orgânico total (COT inicial = 60 mg mL^{-1}) de acordo com o potencial aplicado. Condições: $1,0 \times 10^6$ UFC mL^{-1} de *C. parapsilosis* em dialisato, pH =7,2. $E_{\text{app}} = +1,5 \text{ V}$ tempo de reação de 120 min. Radiação UV/Vis.

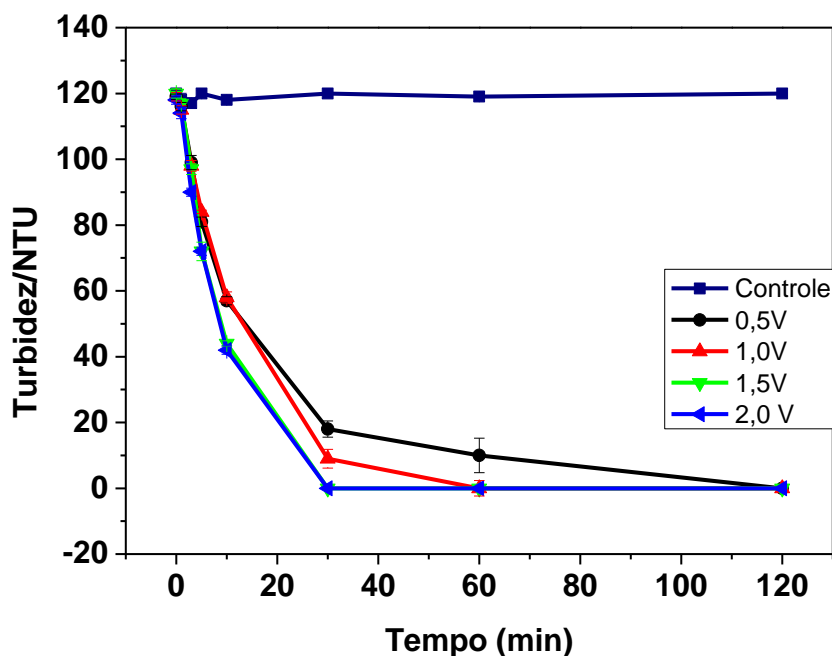


Fonte: Próprio autor.

A seguir, na Figura 33 está evidenciado o decréscimo da turbidez do sistema medido durante os tratamentos fotoeletrocatalíticos nas mesmas condições experimentais. A redução de carbono orgânico dissolvido sugere que a técnica propicia a degradação do

material orgânico lixiviado pela ruptura da parede celular do fungo, alcançando-se 70% de degradação da matéria orgânica após 120 min de tratamento sob potencial aplicado em +1,5V, por exemplo. Do mesmo modo, os resultados envolvendo a turbidez do sistema mostra que após a reação os resultados são bastante condizentes. Considerando que a diminuição da turbidez provavelmente comprova que a técnica remove também o material orgânico lixiviado durante a lise celular. Dessa maneira, por apresentar uma boa taxa de mineralização e remoção de turbidez do sistema com menor gasto energético, optou-se por adotar $E = +1.5 \text{ V}$ como potencial de trabalho para as futuras medidas fotoeletrocatalíticas.

Figura 33: Efeito do potencial aplicado na variação da turbidez da solução durante 120min de tratamento fotoeletrocatalítico. Condições: $1,0 \times 10^6 \text{ UFC mL}^{-1}$ de *C. parapsilosis* em dialisato, $\text{pH} = 7,2$. $E_{\text{app}} = +1,5 \text{ V}$. Radiação UV/Vis.



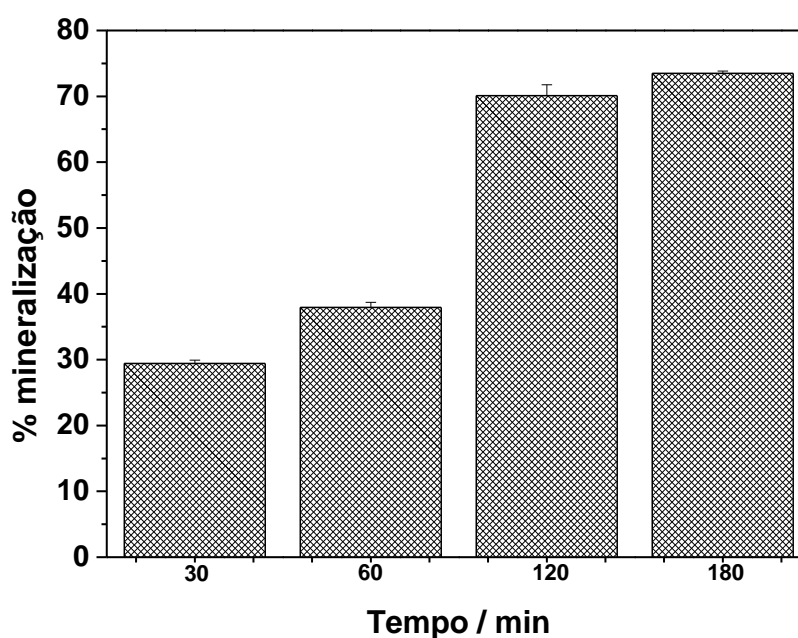
Fonte: Próprio autor.

4.2.3.1.1.2. Efeito do tempo de tratamento fotoeletrocatalítico

O efeito do tempo de tratamento fotoeletrocatalítico sobre a remoção de carbono orgânico total foi investigado para amostras do dialisato fortificado com $1,0 \times 10^6 \text{ UFC}$

mL^{-1} de *C. parapsilosis* em dialisato sob potencial de + 1,5 V e irradiação UV/Vis e pH 7,3. Como pode ser visto na Figura 34, os tempos de 120 e 180 minutos apresentaram 70 e 73% de remoção de carbono orgânico total. Dessa maneira, por conferir uma boa porcentagem de mineralização e requerer menos tempo de reação, otimizou-se o tempo de 2 horas de tratamento.

Figura 34: Variação da porcentagem de remoção de carbono orgânico total dissolvido em função do tempo de fotoeletrocatalise. Condições: $1,0 \times 10^6$ UFC mL^{-1} de *C. parapsilosis* em dialisato, pH = 7,2. $E_{\text{app}} = +1,5$ V. Radiação UV/Vis



Fonte: Próprio autor.

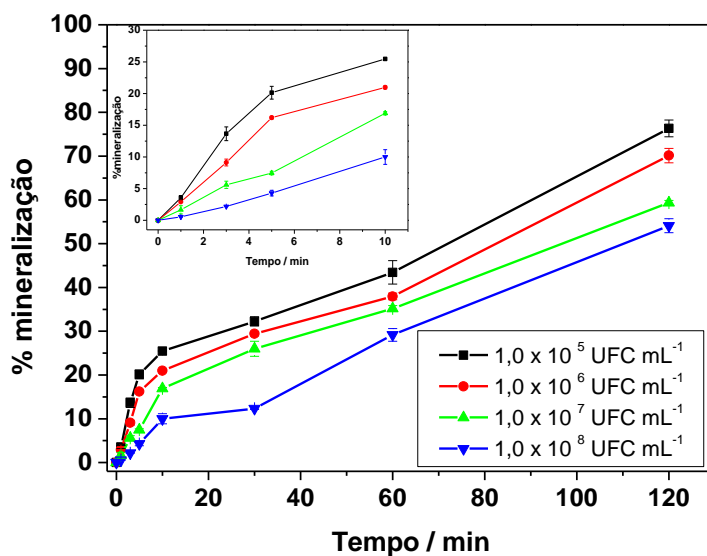
4.2.3.1.1.3. Influência da concentração de *C. parapsilosis* no processo de desinfecção fotoeletrocatalítica

Um outro parâmetro que pode ser investigado de modo a não interferir na composição do dialisato é a concentração da levedura utilizada no processo. Sendo assim, investigou-se o intervalo de concentração de *C. parapsilosis* aplicada na degradação. Para

isto, testou-se o efeito da concentração de *C. parapsilosis* no intervalo de $1,0 \times 10^5$ a $1,0 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ em dialisato, pH 7,3, E= +1,5 V e irradiação UV-Vis 125 W. O intervalo de concentração estudado foi em virtude da concentração mínima de unidades formadoras de colônia para promover a formação de biofilmes ($1,0 \times 10^6$ UFC mL⁻¹).

Após a realização do experimento, observou-se que após um minuto de tratamento ocorre a morte celular de todas as células presentes. Embora os resultados provenientes da contagem microbiana indicarem 99,9% da morte celular, é de grande relevância degradar as possíveis toxinas e os componentes liberados durante a lise celular, convertendo toda matéria orgânica a CO₂ e água. Desta forma, os resultados obtidos para medidas de carbono orgânico total no intervalo de duas horas de degradação para *C. parapsilosis* em diferentes concentrações são apresentados na Figura 35.

Figura 35: Efeito da concentração de *C. parapsilosis* na conversão da matéria orgânica a CO₂ durante 120 minutos de tratamento fotoeletrocatalítico conduzido no dialisato, pH 7,2, E= +1,5 V. Radiação UV/Vis

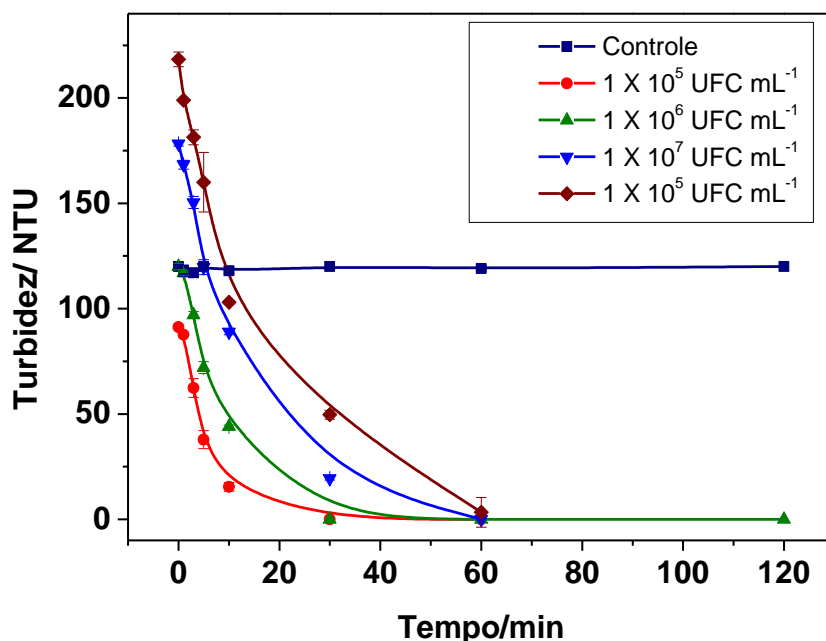


Fonte: Próprio autor.

Os resultados indicam que o aumento da concentração de *C. parapsilosis* interfere na velocidade do processo de remoção de carbono orgânico total, embora promova a inativação do fungo em apenas 1 minuto para qualquer concentração de *C. parapsilosis*.

O decréscimo no desempenho da fotoeletrocatalise pode ser atribuído pela turbidez adquirida pela solução em altas concentrações da levedura, o que dificulta a penetração da luz até a superfície do eletrodo e a alta presença de matéria orgânica. Estas conclusões são corroboradas pelos gráficos da variação da turbidez em função da concentração mostrado na Figura 36. Deste modo, o método mostrou-se eficiente mesmo em altas concentrações do fungo estudadas, requerendo um tempo maior de tratamento para uma maior mineralização para concentrações maiores. A Tabela 4, resume a seguir os principais parâmetros otimizados.

Figura 36: Variação de turbidez no tratamento fotoeletrocatalítico conduzido no dialisato pH 7,2. $E = +1,5$ V conforme o aumento da concentração de *C. parapsilosis* no meio. Tempo de tratamento: 120 min. Radiação UV/Vis



Fonte: Próprio autor.

Observando a mineralização da matriz orgânica para a condição otimizada, observa-se uma redução de carbono orgânico total equivalente a 65%. Estes resultados sugerem que o método é potencialmente eficaz para causar a mortalidade das leveduras e

promover a degradação dos produtos liberados após a clivagem celular e melhor desempenho em meio neutro.

Tabela 4: Parâmetros avaliados e otimizados para a desinfecção e degradação fotoeletrocatalítica de *C. parapsilosis* no dialisato utilizado na hemodiálise

Parâmetros observados	intervalo de estudo	Condição ótima
<i>Potencial aplicado</i>	0,5V – 2V	1,5V
<i>Tempo de reação</i>	30min – 180min	120 min
<i>Concentração de C. parapsilosis</i>	$1,0 \times 10^4$ UFC mL ⁻¹ – $1,0 \times 10^8$ UFC mL ⁻¹	$1,0 \times 10^6$ UFC mL ⁻¹

Fonte: Próprio autor.

4.2.3.1.2. Determinação da constante cinética de desinfecção microbiana conduzida com radiação UV/Vis

Como pode ser visto nos resultados obtidos até o presente momento, pode-se averiguar que para todas as condições realizadas, a morte microbiana ocorre com 1 minuto de tratamento. Portanto, uma investigação mais acurada da cinética de desinfecção microbiana é de extrema relevância para compreender o sistema estudado. Desta forma, realizou-se uma degradação fotoeletrocatalítica com 1 minuto de duração, sendo retiradas alíquotas a cada 10 segundos de reação. Os resultados são mostrados na Figura 37.

O gráfico sugere que 99,9% de morte do microrganismo ocorre com 30 segundos de reação. Em estudos preliminares realizados (SOUZA et al., 2017), foi observado que em pH ligeiramente alcalino há um decréscimo na eficiência da técnica, que requer aproximadamente 60 minutos para morte do fungo. Isto pode ser explicado de acordo com o potencial de carga zero do eletrodo que em valores altos de pH, a superfície estará altamente carregada com cargas negativas em $\text{pH} > 7$, permitindo uma menor adsorção das moléculas de água e do fungo (ANIK; CANSIZOGLU, 2006; SOUZA et al., 2017).

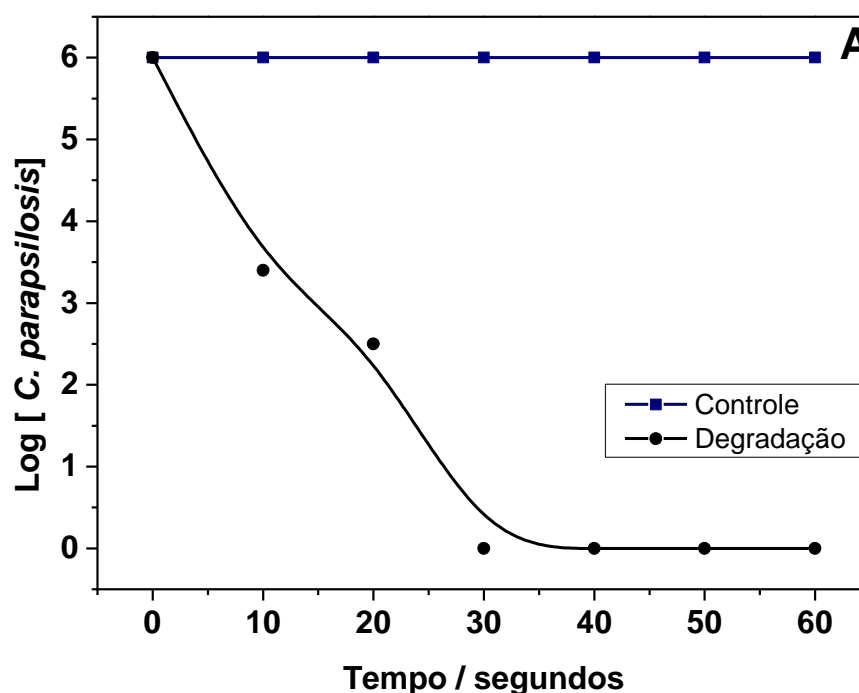
Capítulo 1: Resultados e Discussão

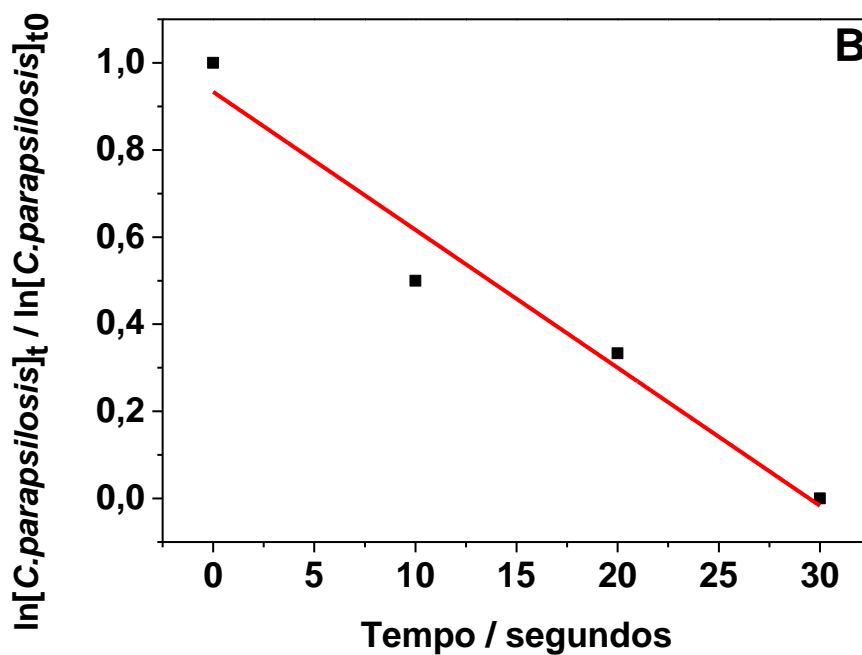
Utilizando a Equação 18, foi verificado um comportamento de pseudo primeira ordem, com constante cinética igual a $0,051 \text{ s}^{-1}$ para a reação conduzida nessas condições previamente otimizada. Uma vez que a relação entre $\ln [C. parapsilosis]_t/t$ apresentou comportamento linear nos 30 segundos iniciais de tratamento, demonstrando uma cinética de pseudo-primeira ordem.

$$\ln[C. parapsilosis]_t = -kt + \ln[C. parapsilosis]_{t_0} \quad (18)$$

Sendo que: $\ln [C. parapsilosis]_t$ é o logaritmo neperiano da concentração do microrganismo no determinado tempo, t é igual ao tempo de reação, $\ln [C. parapsilosis]_{t_0}$ é o logaritmo neperiano da concentração inicial do microrganismo e k a constante cinética de velocidade.

Figura 37: Contagem microbiana para os sessenta segundos iniciais da degradação de $1,0 \times 10^6 \text{ UFC mL}^{-1}$ de *C. parapsilosis* em dialisato, pH 7,2, $E= +1,5 \text{ V}$, Radiação UV/Vis (A) e $\ln[C. parapsilosis]_t/\ln[C. parapsilosis]_{t_0}$ vs tempo para os 30 primeiros segundos de reação para o cálculo da pseudoconstante cinética (B).





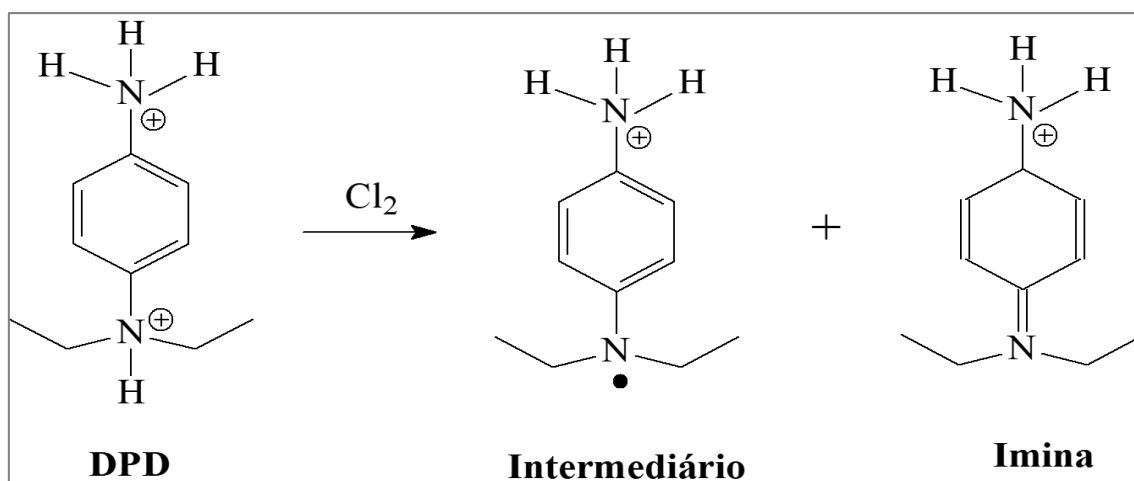
Fonte: Próprio autor.

4.2.3.1.3. Avaliação da formação de Cloro ativo pelo método DPD durante processo fotoeletrocatalítico

Considerando que a fotoeletrocatalise em meio de cloreto pode promover formação de cloro ativo (Cl_2 , HClO e ClO^-), construiu-se uma curva analítica para a determinação de cloro ativo, a ser usado para monitoramento do mesmo durante o tratamento empregado.

A quantificação de cloro ativo pelo método colorimétrico é baseada na reação instantânea com N, N-Dietil-p-fenilediamina (DPD) em meio tampão fosfato. O produto intermediário da reação entre DPD e cloro ativo, Figura 38, possui um produto de cor vermelha com espectros na região do visível típicos, e máxima absorvância em comprimento de onda de $\lambda = 515$ nm. O tempo de residência do intermediário colorido formado é muito baixo, ocorrendo em poucos segundos a minutos (ZANONI et al., 2004).

Figura 38: Formação do intermediário colorido proveniente da reação entre Cl_2 e DPD



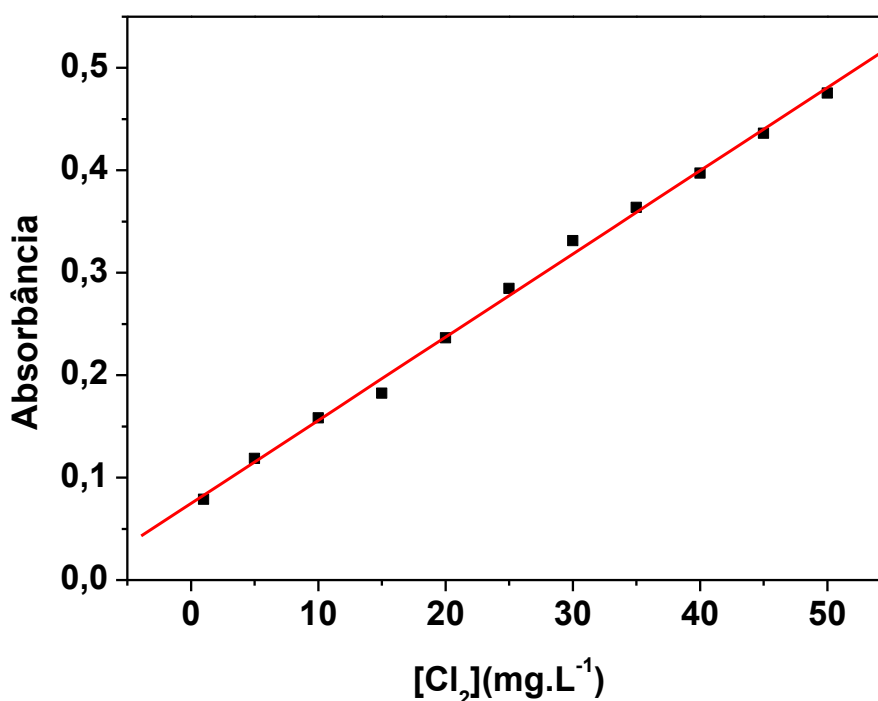
Fonte: Próprio autor.

A Figura 39 representa a curva analítica de acordo com os valores de máxima absorvância em 515 nm do espectro. A equação da reta é: $A = 0,0115[\text{Cl}_2] + 0,01108$, $r = 0,9998$ ($n = 11$) e limite de detecção igual a $23,36 \mu\text{gL}^{-1}$.

Dessa maneira, para a condição otimizada, foi feita a análise de cloro ativo e verificou-se a formação de aproximadamente $1,2 \text{ mg L}^{-1}$ de cloroativo, quantidade irrisória. A baixa formação de cloro ativo no meio pode ser atribuída ao pH neutro do sistema, pois, estudos anteriores comprovam que a formação de cloroativo do meio está intimamente ligada ao pH do sistema no qual a reação ocorre (FRAGA, 2008; SOUZA, 2016). A geração de cloro ativo pelo processo de fotoeletrocatalise ocorre prioritariamente em meio ácido pela adsorção do cloreto na superfície do eletrodo de trabalho carregado positivamente (FRAGA, 2008; SOUZA, 2015). As reações fotoeletrocatalíticas conduzidas em meio neutro poderiam ser uma grande vantagem nos

processos de desinfecção neste caso, visto que o dialisato contendo íons cloreto em sua constituição atuará apenas como eletrólito suporte, não sofrendo reações secundárias.

Figura 39: Curva analítica obtida para a determinação de cloro ativo. $A = 0,0115[\text{Cl}_2] + 0,01108$, 515 nm.



Fonte: Próprio autor.

4.2.3.2. Avaliação da formação de espécies organocloradas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM)

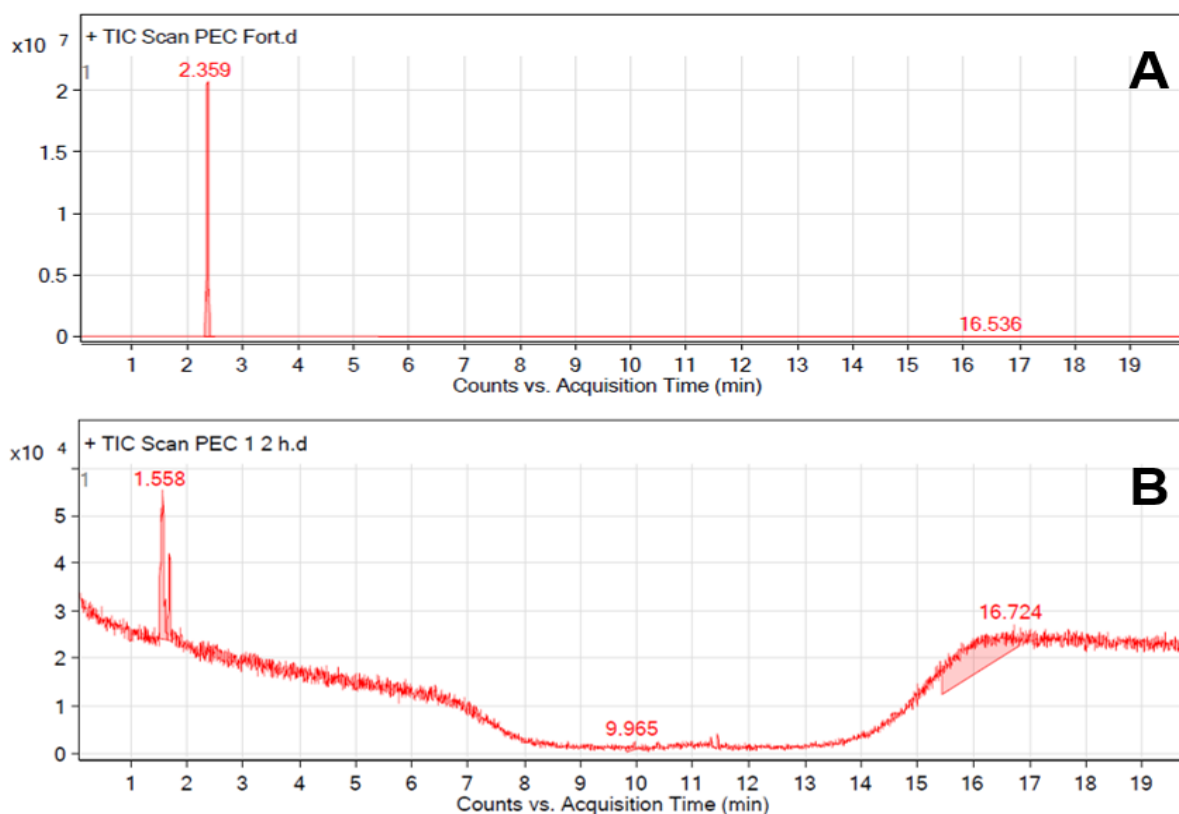
Adicionalmente, foi investigado a possibilidade da formação de espécie cloradas no meio. Para isso utilizou-se um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrofotômetro de massas como detector e extração por *head space*. Inicialmente, fez-se apenas uma exploração qualitativa para avaliar a presença ou não de uma espécie organoclorada no meio.

Para a condição devidamente otimizada, após os 120 minutos de reação, tomou-se duas alíquotas de 50 mL, onde uma foi fortificada com $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de clorofórmio, espécie organoclorada e um dos últimos subprodutos de degradação formado. A outra alíquota foi injetada sem nenhuma fortificação. O método utilizado foi de acordo com GIOIA et al. (2004).

A Figura 40 traz os cromatogramas obtidos. A análise destes permite constatar a não formação de clorofórmio e nenhuma outra espécie organoclorada no meio após as duas horas de reação, sugerindo que não há a existência de reações paralelas no meio. Uma vez que há a inexistência de um pico em torno de 2,1 minutos no cromatograma apresentado em B, pertencente ao clorofórmio. Desta maneira, os íons cloreto no meio estão atuando apenas como eletrólito suporte, sem formação de subprodutos indesejáveis. Ademais, estudos anteriores comprovaram a não formação de íons clorato e perclorato no meio (SOUZA et al., 2017), o que está de acordo com a não formação de espécies de cloroativo no meio, corroborando com resultado anteriores, comprovando a necessidade de um pH ácido no meio.

Capítulo 1: Resultados e Discussão

Figura 40: Cromatogramas obtidos para a alíquota proveniente da degradação fotoeletrocatalítica de 120 minutos de *C. parapsilosis* no dialisato fortificada com 0,1 mol L⁻¹ de clorofórmio (A) e alíquota sem fortificação. Condições: 1,0 x 10⁶ UFC mL⁻¹ de *C. parapsilosis* no dialisato fortificada com 0,1 mol L⁻¹ de clorofórmio (B) e alíquota sem fortificação. Condições: 1,0 x 10⁶ UFC mL⁻¹ em dialisato, pH 7,2, E= +1,5 V, Radiação UV/Vis.



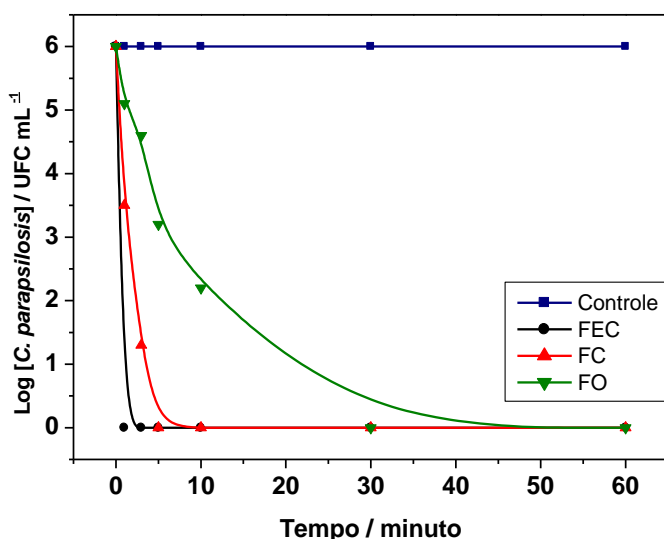
Fonte: Próprio autor.

4.2.3.3. Estudo da eficiência do processo fotolítico, fotocatalítico e fotoeletrocatalítico na degradação de *C. parapsilosis* sobre eletrodos bioinspirados de W/WO₃ e irradiação UV-Vis

A seguir comparou-se a eficiência da fotoeletrocatalise (E= +1,5 V e irradiação UV-Vis) utilizando eletrodo bioinspirado de W/WO₃ frente à outras técnicas como

fotocatálise (irradiação UV-Vis sobre eletrodo de W/WO₃) e fotólise (irradiação UV-Vis) usando dialisato fortificado com *C. parapsilosis* de $1,0 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ durante 120 min de tratamento. Os resultados para inativação do fungo são mostrados na Figura 41.

Figura 41: Contagem microbiana obtida para de fotólise., fotocatalise. e fotoeletrocatalise. Condições experimentais: $1,0 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ de *C. parapsilosis* em dialisato, pH 7,3 durante 120 min



Fonte: Próprio autor

Sob luz ultravioleta e potencial de + 1,5 V, observa-se 99,9% de morte do fungo após um minuto de tratamento utilizando radiação UV-Vis. A fotocatalise permitiu a morte microbiana total em torno de 5 minutos. No entanto, para a fotólise foram necessários 30 minutos para 99,9% de desinfecção. Nos três processos, não foi verificada a formação de organoclorados.

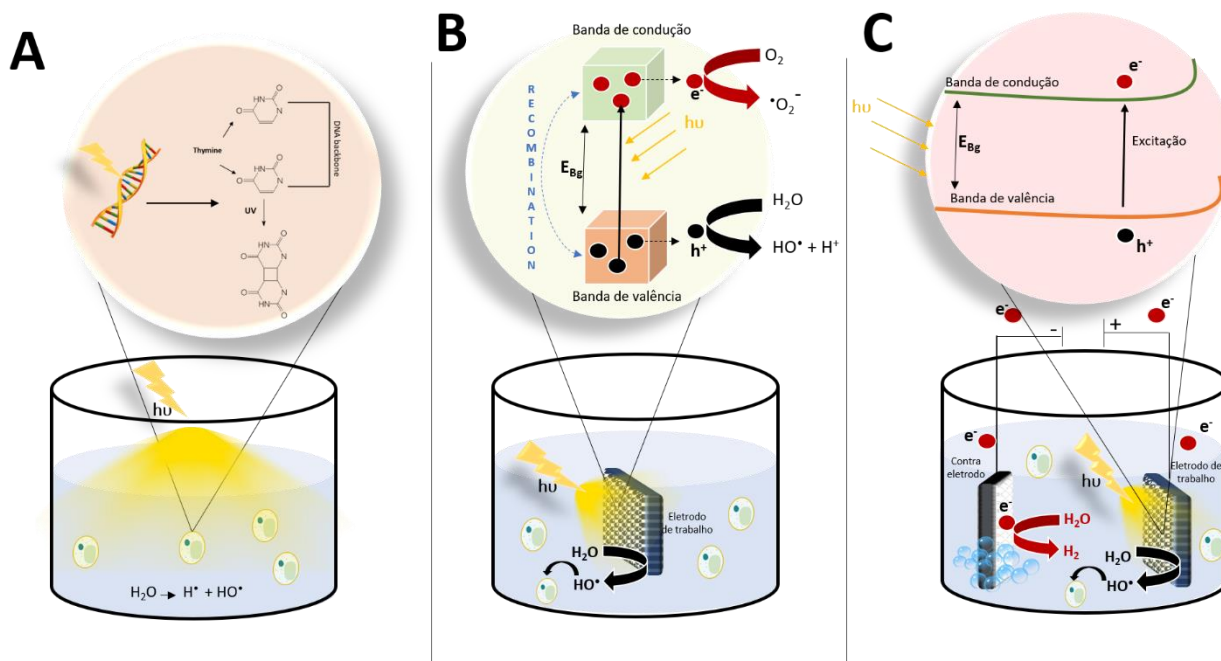
Com base nos resultados obtidos, pode-se sugerir que no processo fotoeletrocatalítico deve haver uma maior formação de radicais hidroxilas (BRUGNERA, 2013). A literatura relata que os radicais •OH são altamente letais para microrganismos e muito reativos para substâncias orgânicas, danificando os ácidos nucléicos e a parede celular (ÖZYILDIZ et al., 2010). Em acréscimo, devido à forte reatividade destes radicais

frente ao material orgânico pode ser responsável pela degradação dos produtos oxidados da lise celular durante o processo. Durante a fotólise, a formação de radicais hidroxilas é negligenciável e os danos causados podem ser atribuídos à luz UV que promove estresse oxidativo e formação de radicais de oxigênio dentro da célula (BOCK et al., 1998). Existem na literatura diferentes tipos de danos ao ADN, como, por exemplo, a ruptura da dupla fita e foto-modificação das bases nitrogenadas. Entretanto, estes tipos de danos podem ser reparados pelas células após determinado tempo, o que explica uma menor cinética de desinfecção observada. Se o estresse da célula excede determinado limite, a célula morre ou torna-se incapaz de futuras divisões. A extensão deste tipo de efeito depende do tipo de microrganismo e de sua fisiologia (fase de crescimento, estado de nutrição, condições de crescimento, entre outros). Deste modo, apenas a utilização da fotólise não é muito efetiva (BRUGNERA et al., 2013). Por outro lado, na fotocatalise há formação de radicais hidroxilas pela oxidação da água pelos buracos gerados durante a irradiação sob o semicondutor. Contudo, o processo é complicado pela recombinação de cargas que diminuiu a eficiência do processo (SOUZA et al., 2017). A Figura 42 resume graficamente os mecanismos envolvidos em cada técnica. A Tabela 5 traz os valores de constantes cinéticas de velocidade calculadas para as técnicas empregadas e redução de DQO e turbidez do sistema.

Tabela 5: Valores de constantes cinéticas obtidas para FEC, fotocatalise e fotólise realizadas com os eletrodos bioinspirados de W/WO₃ em meio de dialisato

	k (s⁻¹)
Fotoeletrocatalise	0,051
Fotocatalise	0,0037
Fotólise	0,00125

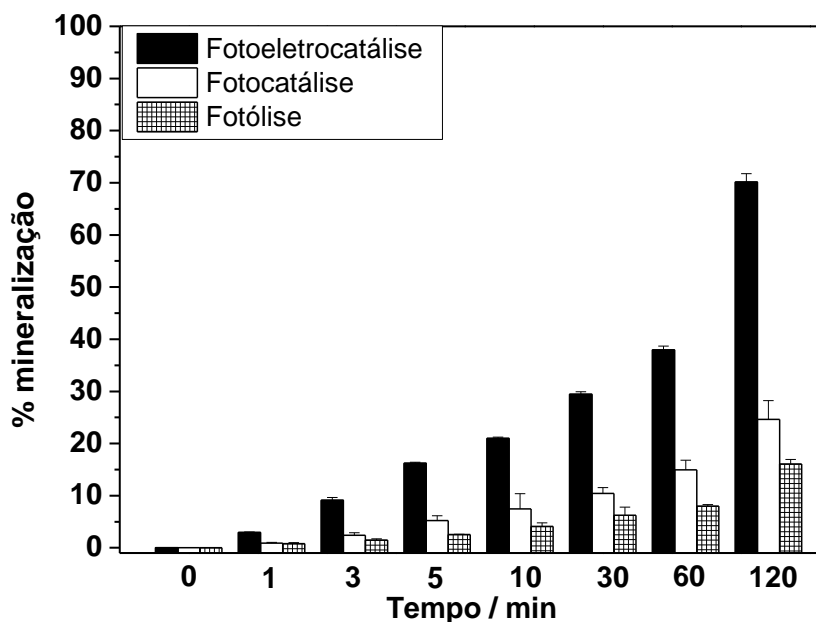
Figura 42: Diferentes mecanismos para fotólise (A), fotocatalise (B) e fotoeletrocatalise (C)



Fonte: Próprio autor.

A mineralização da matéria orgânica proveniente do tratamento do fungo foi comparada para as três técnicas e o resultado encontrado é mostrado na Figura 43. Os resultados mostram que 17% de mineralização é obtida para a fotólise (apenas a presença da luz). A fotocatalise permite uma mineralização de 26%, resultado inferior ao apresentado pela fotoeletrocatalise de 70%. A fotocatalise e fotoeletrocatalise trata-se de processos oxidativos avançados e possuem os mesmos princípios. Apesar disso, a aplicação de potencial diminui a possibilidade de recombinação do par elétron/buraco, possibilitando a obtenção de melhores resultados, fato este que pode explicar o resultado encontrado.

Figura 43: Gráfico de porcentagem de mineralização para fotoeletrocatalise realizada com luz na região do ultravioleta e visível, na região do visível sobre eletrodo W/WO₃ (E= +1,5 V vs. Ag/AgCl) obtido para desinfecção de *C. parapsilosis* 1,0 x 10⁶ UFC mL⁻¹ no intervalo de 120 minutos em dialisato pH 7, 2, fotocatalise e fotólise.



Fonte: Próprio autor

O trabalho realizado por KÜHN et al., (2003), reporta que a redução microbiana tem comportamento decrescente na seguinte ordem: *Escherichia coli* > *Pseudomonas aeruginosa* > *Staphylococcus aureus* > *Enterococcus faecium* > *Candida albicans*. Essa ordem está intimamente atrelada à complexidade e densidade da parede celular dos microrganismos em questão. Portanto, *E. coli* e *P. aeruginosa* possuem uma parede celular fina e fraca (gram-negativa), *S. aureus* e *E. faecium* parede celular mais espessa e densa (gram-positiva), e *C. albicans* tem uma parede celular e trata-se de um organismo eucarionte, portanto é necessário a ruptura da parede celular, membrana plasmática e membrana nuclear para causar algum dano ao ADN. A ordem de precedência apresentada aparece razoável considerando-se que o primeiro passo na decomposição fotoeletrocatalítica consiste no ataque de radicais •OH sobre a parede celular (KÜHN et al., 2003).

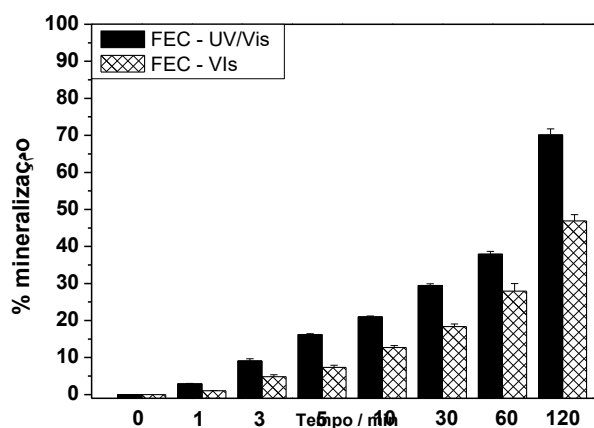
Assim, considerando-se a eficiência do método proposto para desinfecção de *C. parapsilosis*, que é um microrganismo pertencente ao gênero mais resistente aos processos de desinfecção, este método é uma excelente alternativa para desinfecção de águas contaminadas com microrganismos unicelulares de diferentes gêneros. Ademais, os resultados observados revelam que a fotoeletrocatalise é a técnica mais eficiente a ser empregada em detrimento das demais para a desinfecção de *C. parapsilosis* nas condições otimizadas.

4.2.3.4. Estudo da Influência da radiação visível na degradação de C. parapsilosis na sua forma livre em meio de dialisato

Devido ao fato que o trióxido de tungstênio também absorver na região de visível (Figura 17), podendo ser fotoexcitado por este tipo de radiação, investigou-se a eficiência da técnica de fotoeletrocatalise sob fotoexcitação do semicondutor construído com luz visível. Para promover a filtração da luz UV, utilizou-se um tubo de vidro. Na Figura 44 estão os resultados referente às medidas de carbono orgânico total.

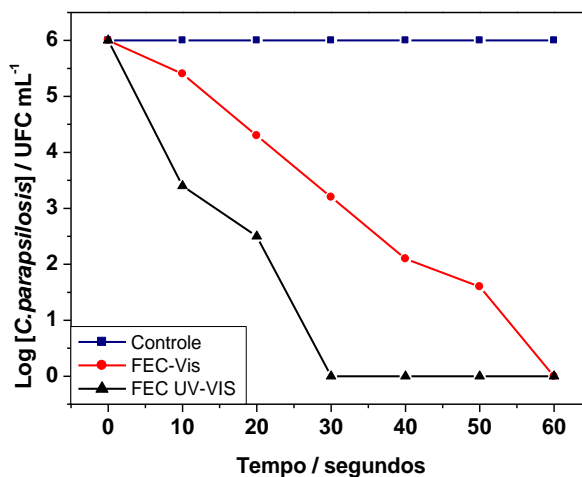
Pode-se observar que o semicondutor construído é facilmente fotoexcitado com auxílio de luz visível, o que corrobora com os resultados obtidos até então e com a literatura. O desempenho das fotoeletrocatalises realizadas sob luz UV-Vis e Visível é bastante similar, com porcentagem de mineralização de 70% e 56%, respectivamente. A diferença observada entre a FEC-UV-Vis e FEC-UV pode ser atribuída a uma melhor excitação do eletrodo por conta da contribuição da radiação na região do visível e violeta, visto que o tungstênio absorve em ambas as regiões, aumentando a geração de cargas na superfície do semicondutor, vide Figura 17. A curva de contagem microbiana para os primeiros 60 segundos de reação encontra-se na Figura 45. Observa-se que a fotoeletrocatalise realizada com a luz de maior conteúdo energético requer cerca de 30 segundos para a morte do microrganismo, o que pode ser atribuído a uma maior quantidade de radicais hidroxilas formados no meio reacional.

Figura 44: Gráfico de porcentagem de mineralização para fotoeletrocatalise realizada com luz na região do ultravioleta e visível, na região do visível sobre eletrodo W/WO₃ (E= +1,5 V vs. Ag/AgCl) obtido para desinfecção de *C. parapsilosis* 1,0 x 10⁶ UFC mL⁻¹ no intervalo de 120 minutos no dialisato (pH 7,2)



Fonte: Próprio autor.

Figura 45: Contagem microbiana para tratamento fotoeletrocatalítico de *C. parapsilosis* em pH 7,2, em dialisato, irradiação UV-Vis (125W), E =1,5 V para os 60 segundos iniciais.

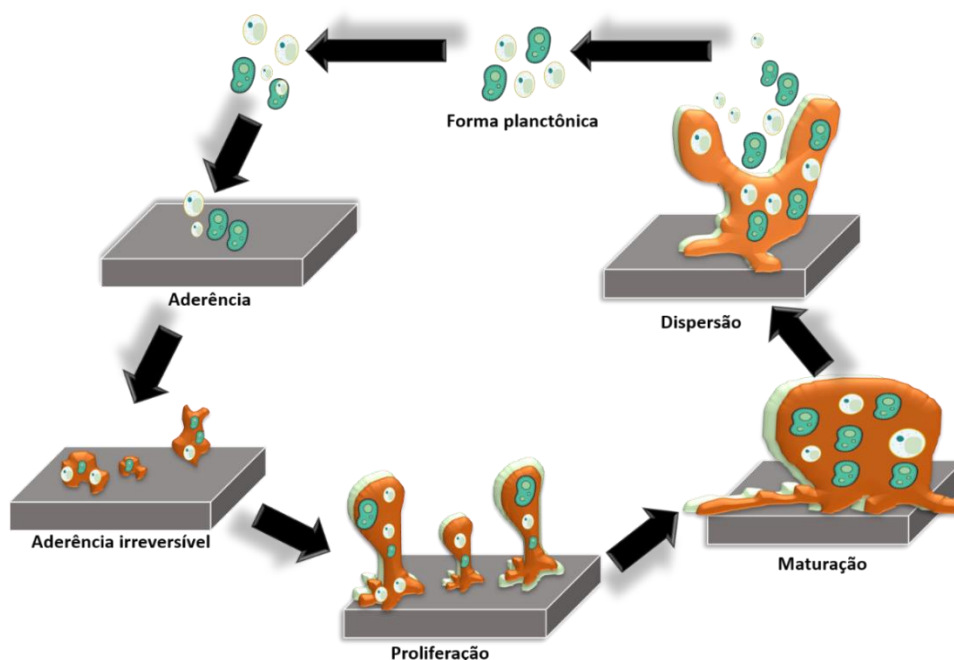


Fonte: Próprio autor.

4.2.3.5. Aplicação dos eletrodos bioinspirados de W/WO_3 na desinfecção do dialisato na presença de biofilmes

Com o progresso do conhecimento científico, admitiu-se como verdadeiro que a formação de biofilmes pode causar danos para a saúde, em diversos segmentos de atividades humanas. Como já explicitado, os biofilmes microbianos podem ser conceituados como comunidades de células aderidas a determinada uma superfície em um invólucro composto por uma matriz de substâncias extracelulares poliméricas, compostas pelos próprios microrganismos visando o aumento de sobrevivência com o meio (STOODLEY et al., 2002). Na natureza, os microrganismos que vivem dispersos em um meio líquido estão na sua forma planctônica. Quando aderidos em uma superfície, a forma planctônica passa a ser denominada de sésil. O estágio sésil é um tipo de comunidade cuja qual propicia vantagens de sobrevivência ao fungo ou bactéria. A Figura 46 resume graficamente o mecanismo de formação de um biofilme.

Figura 46: Mecanismo de formação de um biofilme em uma superfície sólida com todas as fases envolvidas.



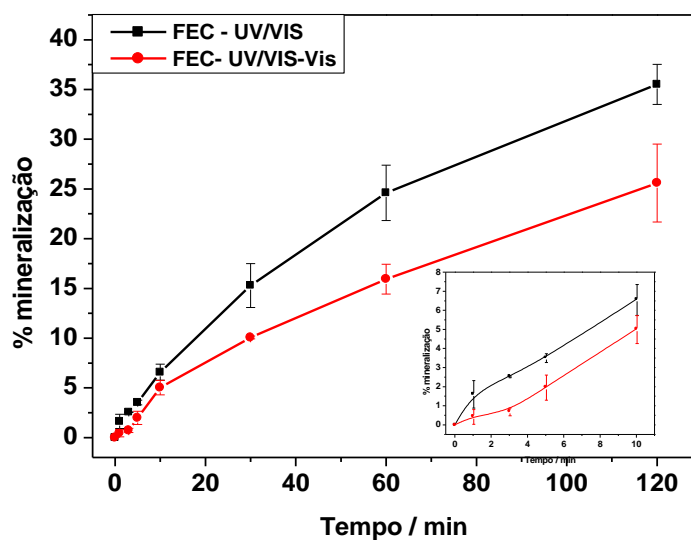
Fonte: Próprio autor.

C. parapsilosis tem uma grande aderência em dispositivos plásticos, bastante utilizados em processos de hemodiálise (MARCELINO, 2018; PIRES et al., 2016a), dessa maneira, uma vez que há possibilidade do microrganismo estar na sua forma sésil no sistema, torna-se necessário estudar o desempenho dos eletrodos em dialisato na presença de biofilmes.

4.2.3.5.1. Comparação entre luz UV/Vis e visível na degradação fotoeletrocatalítica dos biofilmes de *C. parapsilosis*

Os biofilmes de *C. parapsilosis* foram crescidos em lamínulas de vidro com protocolo experimental igual ao descrito no item 4.2.1.3 e aplicados nas medidas fotoeletrocatalíticas em meio de dialisato, conforme método previamente otimizado. Os resultados de porcentagem de mineralização obtidos para ambas as irradiações após 120 minutos de reação são apresentados na Figura 47.

Figura 47: Porcentagem de mineralização para a degradação fotoeletrocatalítica do biofilme de *C. parapsilosis* sob radiação UV/Vis e Vis em dialisato.



Fonte: Próprio autor

Foram necessários cerca de 5 minutos e 16 minutos para a morte total dos fungos presentes no meio para as reações feitas sob radiação UV/Vis e Vis respectivamente. Este maior tempo para morte de 99,9% das células do fungo em questão pode ser atribuído à forma sésil que as células encontram na estrutura do biofilme, portanto a matriz polimérica presente no biofilme contribui para uma maior proteção da célula. Adicionalmente a turbidez do sistema prejudica a penetração da luz na superfície do eletrodo, o que dificulta a fotoexcitação deste.

Analisando a Figura 47, nota-se que houve uma mineralização de 35% e 22% da matéria orgânica no meio para as reações sucedidas com radiação UV/Vis e Visível, respectivamente. A baixa mineralização pode ser explicada pela alta quantidade de carbono orgânico no meio decorrente da matriz polimérica que constitui o biofilme. Contudo, o resultado é bastante promissor. A Tabela 6 reúne os dados provenientes da redução da demanda química de oxigênio e turbidez do sistema com a reação fotoeletrocatalítica.

Tabela 6: Redução de DQO e turbidez para a degradação fotoeletrocatalítica dos biofilmes após 120 minutos de reação em dialisato.

Tempo (min)	UV/Vis	Vis
Redução de turbidez (%)	50%	47%
Redução de DQO (%)	29%	18%

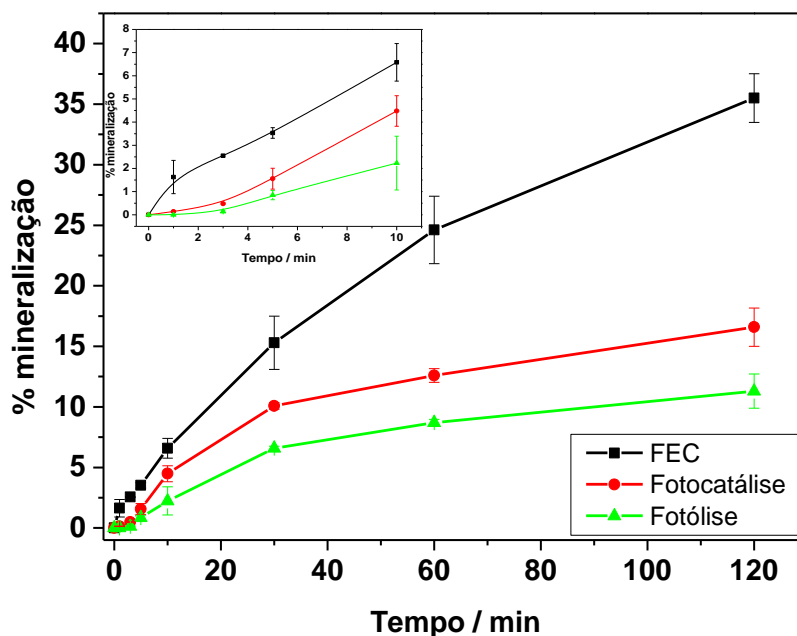
4.2.3.5.2. Comparação entre as técnicas de fotoeletrocatalise, fotocatalise e fotólise na desinfecção de degradação dos biofilmes de *C. parapsilosis*

A seguir, para comprovar a eficiência da fotoeletrocatalise em detrimento de outras técnicas, foram realizadas reações fotolíticas e fotocatalíticas. A Figura 48 traz a porcentagem de mineralização da matriz orgânica do meio de acordo com as reações sucedidas.

A avaliação do gráfico permite inferir que a fotoeletrocatalise foi a técnica mais eficiente para a degradação do biofilme, possuindo maior porcentagem de mineralização.

Adicionalmente, a morte de 99,9 % dos fungos ocorreu com 5,10 e 30 minutos para fotoeletrocatalise, fotocatalise e fotólise, respectivamente, mostrando que, como já esperado, para este tipo de tratamento a fotoeletrocatalise é a técnica mais adequada, uma vez que possui um desempenho superior em detrimento das outras técnicas, como pode ser explicado pelo mecanismo presente na Figura 42

Figura 48: Porcentagem de mineralização para a degradação fotoeletrocatalítica, fotocatalítica e fotolítica do biofilme de *C. parapsilosis* sob radiação UV/Vis e Vis em dialisato. Condições: Meio reacional dialisato, pH =7,2. $E_{app} = +1,5$ V tempo de reação de 120 min. Radiação UV/Vis.

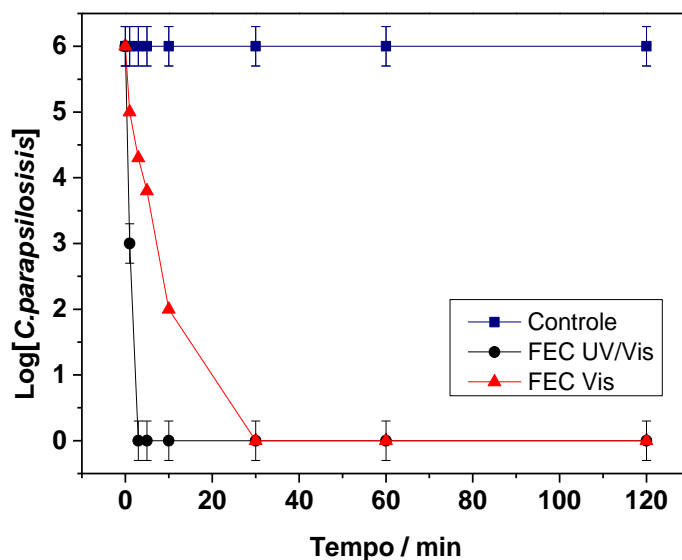


Fonte: Próprio autor.

4.2.3.6. Aplicação dos eletrodos bioinspirados de W/WO₃ em efluentes hospitalares provenientes do processo de hemodiálise

Após otimização do processo, os eletrodos bioinspirados de W/WO₃ foram aplicados em tratamento fotoeletrocatalítico do efluente coletado do processo de hemodiálise, usando potencial equivalente a + 1,5 V, fortificação proposital com $1,6 \times 10^6$ UFC mL de *C. parapsilosis*. A Figura 49 é referente à contagem microbiana realizada para acompanhar de qual maneira se dá a desinfecção.

Figura 49: Contagem microbiana para tratamento fotoeletrocatalítico de *C. parapsilosis* em pH 6,7, em efluente, irradiação UV-Vis e Visível (125W), E = +1,5 V para os 120 minutos de reação



Fonte: Próprio autor.

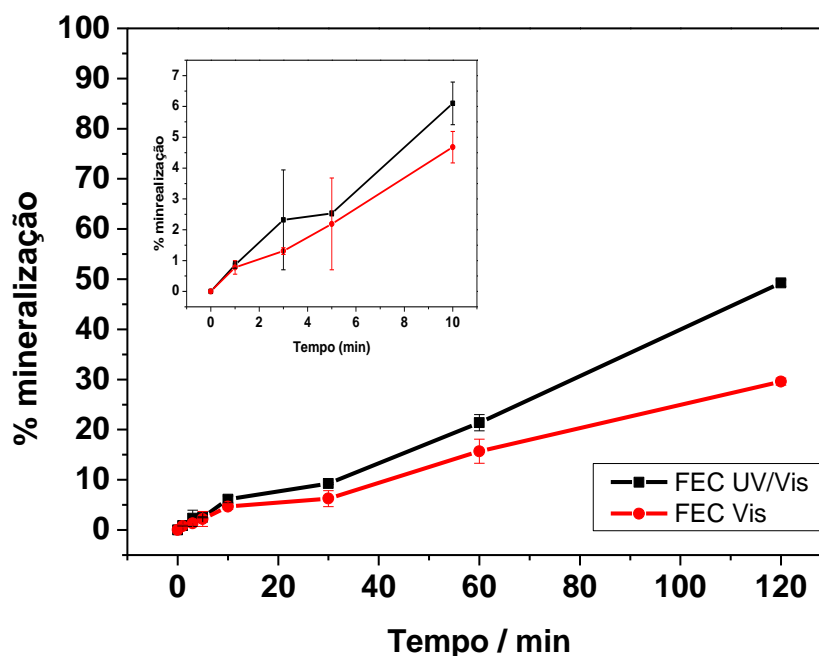
A análise da Figura acima permite a conclusão de que são necessários 3 minutos e 15 minutos para ocorrer a morte de 99,9% das células da levedura em questão para as radiações UV/Vis e Visível, respectivamente. O maior tempo necessário para a desinfecção ocorrer pode estar atrelado à composição do efluente, uma vez que esta matriz possui uma matriz orgânica muito mais complexa e além disso, o efluente já possui uma turbidez significativa inicial (135 NTU), o que pode dificultar a penetração da luz

Capítulo 1: Resultados e Discussão

sobre a superfície do eletrodo e conseqüentemente a sua fotoexcitação, diminuindo a quantidade radicais hidroxila formados no início da reação.

Em relação à conversão matéria orgânica em CO_2 e água, a Figura 50 mostra o gráfico de remoção de carbono orgânico total do sistema usando potencial equivalente a + 1,5 V, fortificação com $1,0 \times 10^6$ UFC mL^{-1} de *C. parapsilosis*. A avaliação prévia do gráfico permite a constatação que o método proposto é eficiente para a diminuição de espécies orgânicas no meio. Entretanto, necessita-se de um maior tempo de reação para uma melhor mineralização, uma vez que foi obtido 48% e 29% de mineralização para a fotoeletrocatalise realizada com luz UV/Vis e luz Visível após 120 minutos, respectivamente, o que concorda com os dados de redução de contagem microbiana turbidez e DQO obtidos.

Figura 50: Porcentagem de mineralização para a degradação fotoeletrocatalítica do biofilme de *C. parapsilosis* sob radiação UV/Vis e Vis em efluente



Fonte: Próprio autor.

A demanda química de oxigênio, é um parâmetro físico-químico muito utilizado para a indicação do potencial poluidor de um efluente, cujo qual é baseado na quantidade

Capítulo 1: Resultados e Discussão

de oxigênio consumida por diversos compostos sem a intervenção de microrganismos. Portanto, a medida de DQO é uma forma indireta de se medir o teor de matéria orgânica oxidável por meio do consumo de oxigênio no processo de oxidação da matéria orgânica presente no efluente. Dessa maneira, este é um parâmetro de relevância significativa para ser medido durante as análises. A Tabela 4 mostra a redução de DQO do dialisato durante a reação realizada.

A Tabela 7 reúne os dados proveniente das reduções de DQO e turbidez do sistema. Nota-se que o houve uma redução de 47% e 28% para as reações conduzidas sob radiações UV/Vis e Vis, respectivamente, mostrando a potencialidade do eletrodo em uma futura etapa de pré-tratamento do efluente antes do seu descarte.

Tabela 7: Redução de DQO e turbidez para a degradação fotoeletrocatalítica dos biofilmes após 120 minutos de reação em dialisato.

	UV/Vis	Vis
Redução de turbidez (%)	99%	99%
Redução de DQO (%)	47%	28%

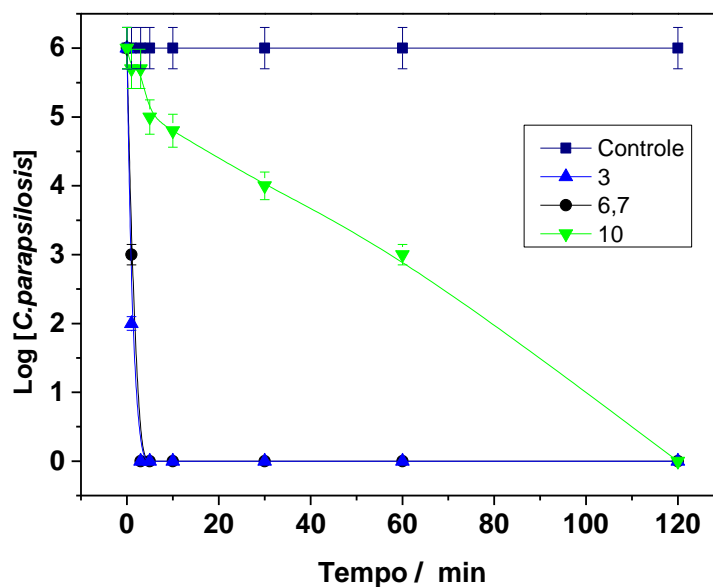
Fonte: Próprio autor

Apesar de apresentar um resultado promissor, outra alternativa para melhorar a eficiência da técnica utilizando este tipo de eletrodo é fazer um estudo de pH e avaliar qual condição contribui para uma maior mineralização dos compostos orgânicos presentes, uma vez que o efluente proveniente da hemodiálise possui uma concentração de matéria orgânica muito elevada ($DQO = 1500 \text{ mg L}^{-1}$). Como já salientado, em meio ácido, a formação de cloro ativo no meio pode contribuir para uma desinfecção mais rápida, uma vez que este possui propriedades antimicrobianas. Adicionalmente, estudos na literatura relatam que em meio ácido, há uma melhor oxidação de espécies orgânicas. Nota-se que ambas as radiações foram suficientes para a diminuição da turbidez do meio, entretanto para a remoção de DQO e conversão da matéria orgânica a CO_2 e água, a radiação com maior conteúdo energético é mais eficiente, uma vez que esta promoverá uma maior formação de radicais hidroxila no meio.

4.2.3.6.1. Efeito do pH na degradação fotoeletrocatalítica de *C. parapsilosis* na presença do efluente proveniente do processo de hemodiálise

Com o objetivo de investigar as melhores condições para a desinfecção fotoeletroquímica do fungo *C. parapsilosis*, estudou-se a influência do pH no efluente utilizado como eletrólito suporte, em pH 3, 6,7 e 10. As fotoeletrocatalises foram conduzidas em meio do efluente, em pH adequado controlado pela adição de NaOH ou H₂SO₄, aplicando-se um potencial de 1,5 V vs. Ag/AgCl e irradiação UV, conforme método previamente otimizado. Alíquotas provenientes do tratamento durante 0, 1, 3, 5, 10, 30, 60 e 120 minutos foram retiradas e submetidas à contagem microbiana, análise de carbono orgânico total e geração de cloro ativo durante o processo fotoeletrocatalítico usando método espectrofotométrico. Os resultados provenientes da inativação de *C. parapsilosis* nas condições previamente descritas são mostrados na Figura 51.

Figura 51: Contagem microbiana para tratamento fotoeletrocatalítico de *C. parapsilosis* em pH 3, 6,7 e 10. Eletrólito suporte: Efluente da hemodiálise, irradiação UV-Vis (125W), E =1,5 V.



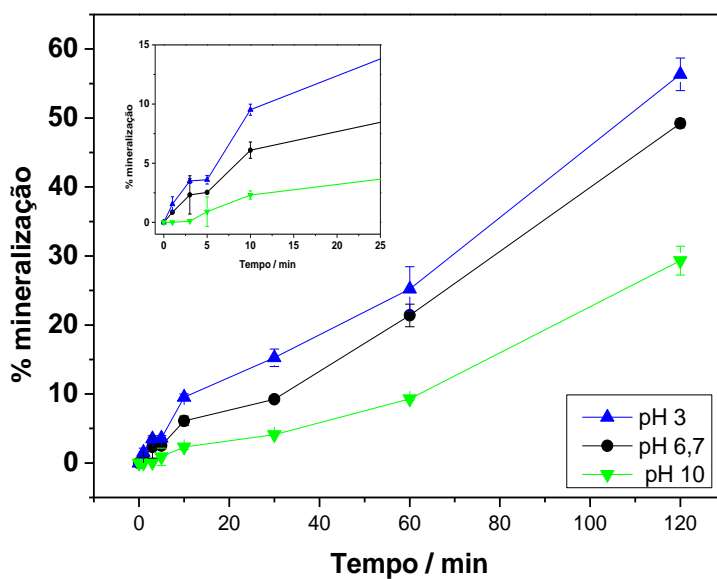
Fonte: Próprio autor.

Capítulo 1: Resultados e Discussão

Os resultados mostram que houve 99,9% de morte do microrganismo após 3 minutos de tratamento sob pH 3 e 6,7. Contudo, tal comportamento não é observado para o pH 10. Em meio alcalino há um decréscimo na eficiência da técnica, que requer aproximadamente 60 minutos para morte do fungo. Isto pode ser explicado de acordo com o potencial de carga zero do eletrodo que em valores altos de pH, a superfície estará altamente carregada com cargas negativas em $\text{pH} > 7$, permitindo uma menor adsorção do fungo, carregado negativamente, na superfície do eletrodo e menor velocidade de degradação (ANIK; CANSIZOGLU, 2006).

Análises de remoção de COT correspondentes às amostras de interesse tratadas em efluente sob diferentes valores de pH são mostradas na Figura 52.

Figura 52 : Efeito do pH na mineralização vs. tempo para desinfecção fotoeletrocatalítica de *C. parapsilosis* em pH 3, 6,7 e 10 sob eletrodo bioinspirado de W/WO_3 ($E = 1,5 \text{ V vs. Ag/AgCl}$), em efluente e irradiação UV-Vis (125W). No *insert* do gráfico há um melhor detalhamento dos primeiros 25 minutos iniciais de reação.

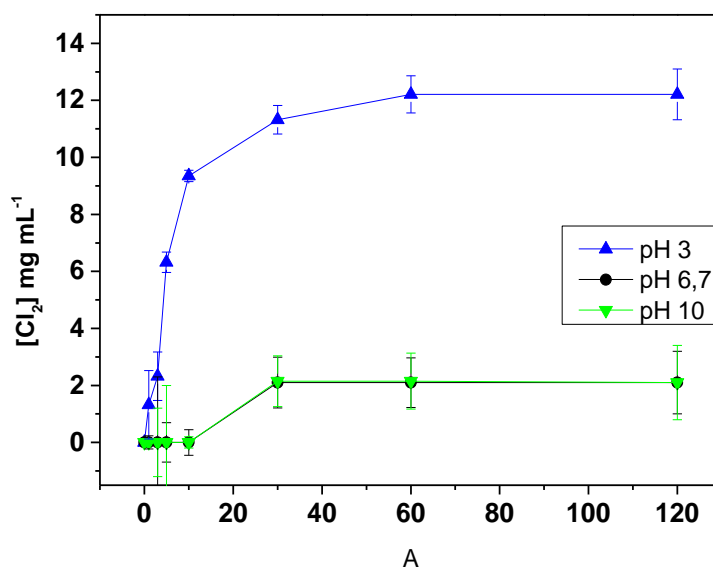


Fonte: Próprio autor

No entanto, comparando-se as três curvas de mineralização para *C. parapsilosis*, pode ser visto que a velocidade de degradação é maior em valores de pH 3 e 6,7 em detrimento do pH 10. Considerando que em meio de cloreto pode estar ocorrendo a formação de cloro ativo, avaliou-se a seguir a geração de cloro ativo em durante tempo de fotoeletrocatalise de *C. parapsilosis*. A Figura 53 exibe os resultados obtidos.

A análise da Figura 53 permite verificar que nos 30 primeiros minutos de fotoeletrocatalise, somente a curva de pH 3 apresentou um aumento significativo na geração de cloro ativo. A geração de cloro ativo em pH 6,7 e 10 é negligenciável, concordando com os dados da literatura que indicam que em pH neutro e alcalino a oxidação fotoeletrocatalítica de cloreto é irrisória devido à fraca adsorção do cloreto na superfície do eletrodo também carregado negativamente. No estágio de 60 minutos de fotoeletrocatalise, a curva de pH 3 apresentou o máximo de cloro ativo gerado, onde a mesma permanece constante até o final do processo. As curvas de pH 6,7 e 10 apresentaram-se constantes a partir de 30 minutos de reação gerando aproximadamente $2,1 \text{ mg L}^{-1}$ de cloro ativo.

Figura 53: Efeito da variação do valor do pH em relação ao tempo de fotoeletrocatalise na geração de cloro ativo utilizando eletrodo de W/WO_3 , sob irradiação UV-Vis 125W. pH 3, 6,7 e 10.



Fonte: Próprio autor.

Deste modo, pode-se verificar que a geração de cloro ativo pelo processo de fotoeletrocatalise ocorre prioritariamente em meio ácido pela adsorção do cloreto na superfície do eletrodo de trabalho carregado positivamente (FRAGA; ZANONI, 2011; SOUZA et al., 2017). As fotoeletrocatalises conduzidas em meio ácido poderiam ser uma grande vantagem nos processos de desinfecção neste caso, visto que a geração de cloroativo no meio ajudaria a eliminar os microrganismos presentes no meio e, sob essas condições, há uma significativa remoção de matéria orgânicas presentes no meio reacional. A Tabela 8 resume os valores de redução de DQO e turbidez para as reações realizadas após 120 min.

Tabela 8: valores de redução de DQO e turbidez para as reações realizadas após 120 min sob eletrodos de bioinspirados de W/WO₃ em presença de efluente.

	pH 3	pH 6,7	pH 10
Redução de turbidez (%)	92%	87	81
Redução de DQO (%)	56	46	27

Fonte: Próprio autor.

Diante destes resultados, o pH 3 seria a melhor condição experimental para desinfecção fotoeletrocatalítica de *C. parapsilosis* em presença do efluente.

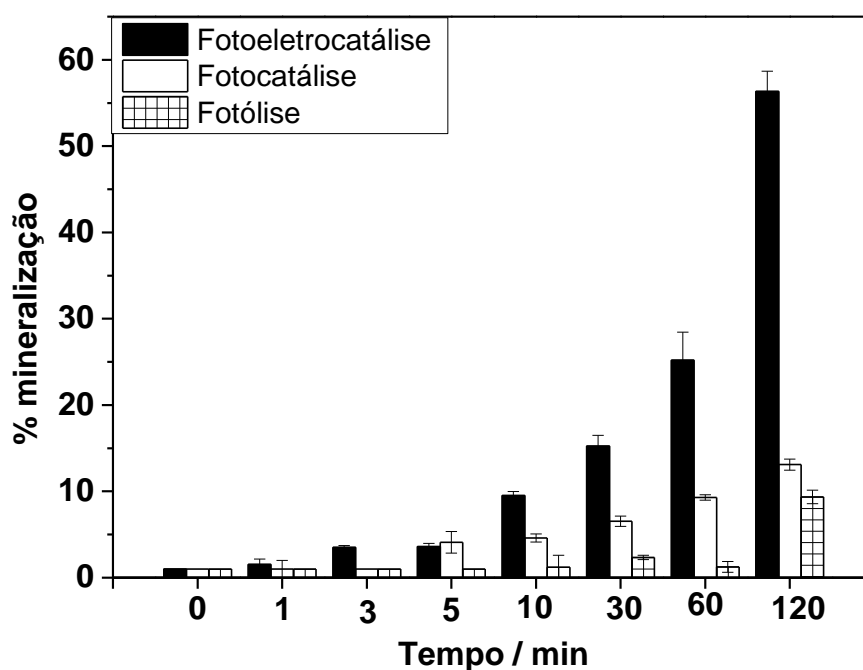
4.2.3.6.2. *Comparação entre as técnicas de fotoeletrocatalise, fotocatalise e fotólise na degradação do efluente proveniente da hemodiálise fortificado com C. parapsilosis*

A avaliação da potencialidade da fotoeletrocatalise (aplicação de potencial e irradiação UV-Vis) utilizando eletrodo nanoporoso de W/WO₃ frente à fotocatalise (irradiação UV-Vis sobre eletrodo de W/WO₃) e fotólise (irradiação UV-Vis) é imprescindível para estabelecer o efeito de cada parâmetro na desinfecção. Os experimentos foram realizados em efluente pH 3 com concentrações de *C. parapsilosis* em torno de $1,0 \times 10^6$ UFC mL⁻¹.

Adicionalmente, cabe ressaltar que uma suspensão de *C. parapsilosis* foi preparada e mantida sem nenhum tratamento por duas horas. Tal análise foi realizada com a finalidade de investigar se o eletrólito suporte poderia estar influenciando na morte de *C. parapsilosis*. Esta amostra foi denominada controle.

A Figura 54 compara a eficiência da técnica de fotoeletrocatalise usando eletrodo bioinspirado de W/WO₃ fotoexcitado com irradiação UV-Vis com as técnicas de fotólise e fotocatalise. O monitoramento da desinfecção de $1,0 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ de *C. parapsilosis* em efluente pH 3 durante 120 min é explicitado na Figura 54.

Figura 54: Porcentagem de mineralização para a degradação fotoeletrocatalítica, fotocatalítica e fotolítica de $1,0 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ de *C. parapsilosis* sob radiação UV/Vis em efluente. Condições: Meio reacional efluente, pH =3. Tempo de reação de 120 min. Radiação UV/Vis.



Fonte: Próprio autor.

Em relação à contagem microbiana, a morte do fungo atingiu 99,9% após 3 minutos de tratamento utilizando radiação UV-Vis para a fotoeletrocatalise. A

fotocatálise permitiu a morte microbiana total em torno de 30 minutos. No entanto, para a fotólise foram necessários mais de 60 minutos para 100% de desinfecção. Nos três processos, não foi verificada a formação de cloro ativo, clorato juntamente com perclorato durante a reação. A fotoeletrocatalise permitiu uma redução de 48% de DQO enquanto foram obtidos uma redução de 8% e 4% para fotocatalise e fotólise respectivamente.

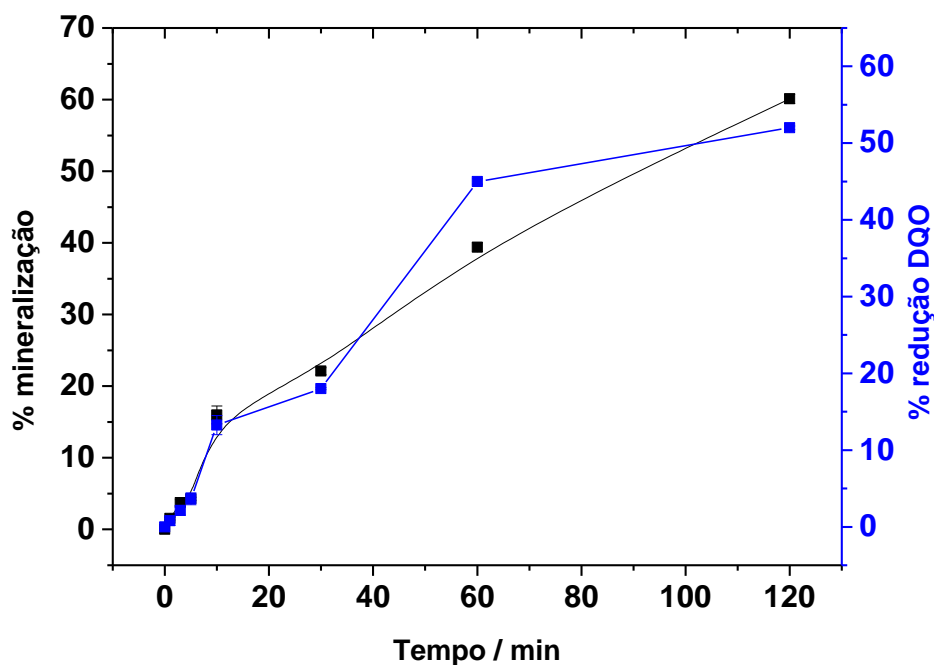
4.2.4. Aplicação dos eletrodos bioinspirados de W/WO₃-Ag na degradação fotoeletrocatalítica de *C. parapsilosis* na presença de dialisato e efluente

Uma vez preparados e depois da metodologia previamente otimizada, conforme explicitada nos itens anteriores, os eletrodos bioinspirados de W/WO₃-Ag foram submetidos às reações fotoeletrocatalíticas na presença de dialisato e efluente na forma livres de *C. parapsilosis*. A seguir estão os resultados obtidos no laboratório. A Figura 55 reúne os valores obtidos de porcentagem de mineralização e DQO obtidos para a reação fotoeletrocatalítica conduzida em meio de dialisato fortificado com $1,0 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ de *C. parapsilosis* com aplicação de potencial de +1,5 V e pH igual a 7,2.

Verifica-se um comportamento semelhante, porem inferior ao eletrodo bioinspirado de W/WO₃ uma vez que foram obtidos cerca de 58% de mineralização da matéria orgânica e 51% de redução de DQO para os eletrodos de W/WO₃-Ag. Para contagem microbiana, conforme esperado, houve morte de 99,9% do fungo estudado após um minuto de tratamento e total redução da turbidez do sistema após 120 minutos de tratamento fotoeletroquímico.

A Figura 56 traz os resultados provenientes da comparação das técnicas de FEC conduzida com radiação UV/Vis e Visível, fotocatalise e fotólise para as condições experimentais relatadas.

Figura 55: Redução na quantidade de carbono orgânico total (em preto) e demanda química de oxigênio na desinfecção de *C. parapsilosis* em dialisato sob eletrodo de W/WO₃-Ag. Condições: 1,0 x 10⁶ UFC mL⁻¹ de *C. parapsilosis* em dialisato, pH = 7,2. E_{app} = +1,5 V. Radiação UV/Vis.



Fonte: Próprio autor.

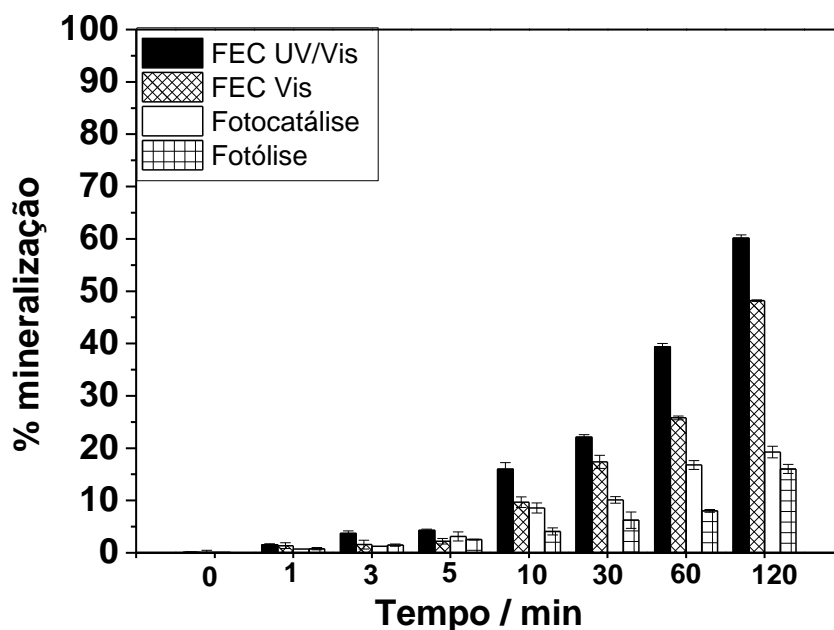
Conforme esperado, verificou-se um melhor desempenho para a técnica de fotoeletrocatalise conduzida sob radiação UV/Vis em detrimento das demais técnicas. Valores que corroboram com os dados de contagem microbiana presentes na Tabela 9.

Tabela 9: Tempos de inativação microbiana para os experimentos realizados com os eletrodos de W/WO₃-Ag

Técnica	FEC UV/Vis	FEC Vis	Fotocatálise	Fotólise
Tempo de inativação (min)	1	1	10	30

Fonte: Próprio autor

Figura 56: Porcentagem de mineralização para a degradação fotoeletrocatalítica, fotocatalítica e fotolítica de $1,0 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ de *C.parapsilosis* sob radiação UV/Vis e Visível em dialisato sob eletrodos de W/WO₃-Ag. Condições: Meio dialisato, pH =7,2. Tempo de reação de 120 min.



Fonte: Próprio autor.

Os eletrodos de W/WO₃-Ag também foram submetidos às reações fotoeletrocatalíticas no meio contendo o efluente, ajustado para pH 3, como meio reacional na presença de $1,0 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ de *C. parapsilosis*. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 10.

Não foi observada redução total de turbidez para todas as técnicas empregadas. Tal resultado sugere que ainda há a presença de espécies em suspensão na amostra empregada, fato este que se encontra de acordo com os baixos valores de redução da matéria orgânica e DQO. Embora o eletrodo tenha sido satisfatório para propiciar a morte do microrganismo, o mesmo não teve desempenho semelhante em relação à degradação da matéria orgânica proveniente da lise celular de *C. parapsilosis* em meio de efluente. Cabe ressaltar que tanto para as medidas realizadas no dialisato quanto no efluente não foi detectada a lixiviação da prata da superfície. Tal fato pode ser explicado pelo fato de

haver uma alta interação química entre a prata e os grupos catecóis da dopamina utilizada como agente ancorante para a modificação do eletrodo (XU et al., 2017).

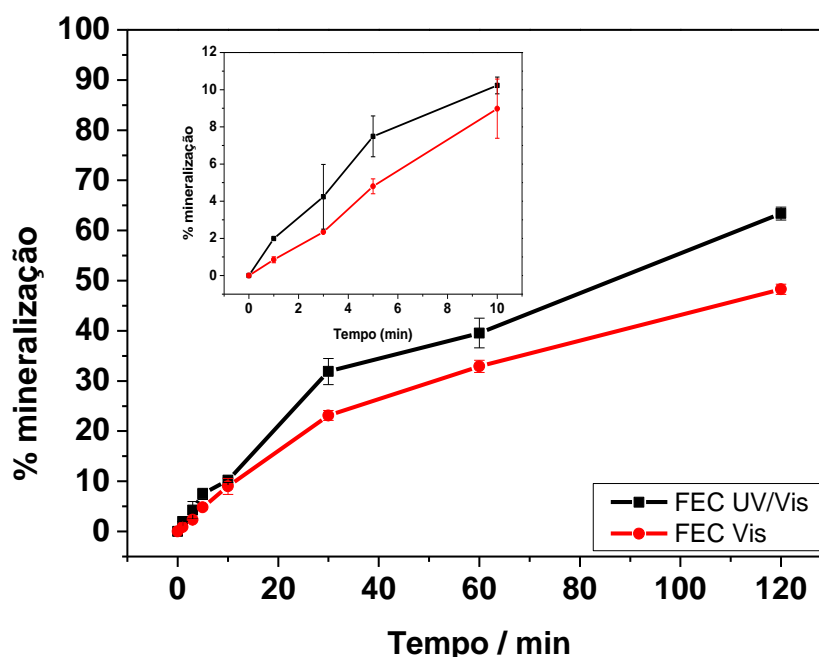
Tabela 10: Tempos de inativação microbiana para os experimentos realizados com os eletrodos de W/WO₃-Ag, % de mineralização e % de redução em meio de efluente.

Técnica	FEC UV/Vis	FEC Vis	Fotocatálise	Fotólise
Tempo de inativação (min)	1	1	30	30
%mineralização	26,5	17,2	11,5	9,3
% Redução DQO	18	12	8	4

4.2.5. Aplicação dos eletrodos de W/WO₃ preparado por templates a degradação fotoeletrocatalítica de C. parapsilosis em sua forma planctônica e de biofilme na presença de dialisato e efluente

Uma vez preparado, o eletrodo desenvolvido foi aplicado na degradação fotoeletrocatalítica de *C. parapsilosis* com o objetivo de comparar o seu desempenho ao eletrodo bioinspirado preparado previamente na condição otimizada anteriormente (E= +1,5V, fortificação com 1,0 X 10⁶ UFC mL⁻¹ de *C. parapsilosis*). A Figura 57 traz a remoção de carbono orgânico total em função do tempo para a desinfecção fotoeletrocatalítica de 1,0 x 10⁶ UFC mL⁻¹ de *C. parapsilosis* na sua forma planctônica.

Figura 57: Porcentagem de mineralização para a degradação fotoeletrocatalítica do biofilme de *C.parapsilosis* sob radiação UV/Vis e Vis em dialisato para os eletrodos de W/WO₃ feitos por templates sintéticos em dialisato pH 7, 2, E_{app}=1,5 V.

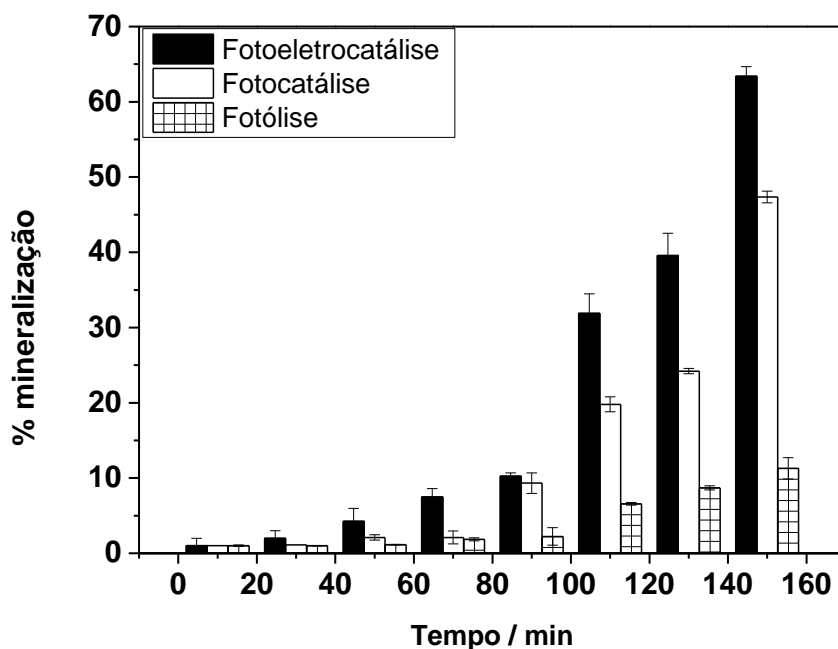


Fonte: Próprio autor.

Houve morte microbiana de *C. parapsilosis* após um minuto de tratamento para a degradação com radiação UV/Vis e Vis, e retirada total da turbidez do sistema após 120 minutos de tratamento, resultado semelhante ao encontrado com o eletrodo bioinspirado. Em relação à mineralização da matriz orgânica, obteve-se de 64% e 48%, respectivamente. Para o eletrodo bioinspirado, a degradação com radiação UV/Vis e Vis, nessas mesmas condições ($E=+1,5V$, 10×10^6 UFC mL⁻¹ de *C. parapsilosis*, 120 minutos de reação), a redução de carbono orgânico total foi de 70% e 57%, respectivamente.

Ao comparar as técnicas de fotoeletrocatalise, fotocatalise e fotólise, verifica-se que a FEC apresentou melhor redução de matéria orgânica em detrimento das demais, de acordo com o gráfico presente na Figura 58.

Figura 58: Porcentagem de mineralização para a degradação fotoeletrocatalítica, fotocatalítica e fotólítica de $1,0 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ de *C.parapsilosis* sob radiação UV/Vis e Visível em dialisato sob eletrodos de W/WO₃ construídos por *templates*. Condições: Meio dialisato, pH =7,2. Tempo de reação de 120 min.



Fonte: Próprio autor.

Ainda em meio de dialisato, os eletrodos em estudo foram aplicados na desinfecção fotoeletrocatalítica (com radiação UV/Vis e visível), fotocatalítica de *C. parapsilosis* na forma de biofilme. Os dados obtidos se encontram na Tabela 11.

Os dados obtidos mostram que os eletrodos feitos com *templates* sintéticos são eficientes para o tratamento do dialisato contaminado por *C. parapsilosis*. Ao realizar uma comparação com os eletrodos bioinspirados de W/WO₃, isso mostra que a morfologia bioinspirada contribui para um melhor rendimento da reação, tendo um desempenho superior ao eletrodo feito com moldes sintéticos

Tabela 11: Resultados obtidos para os diferentes experimentos realizados com os eletrodos feitos por *templates* sintéticos de W/WO₃ na presença de biofilme em meio de dialisato.

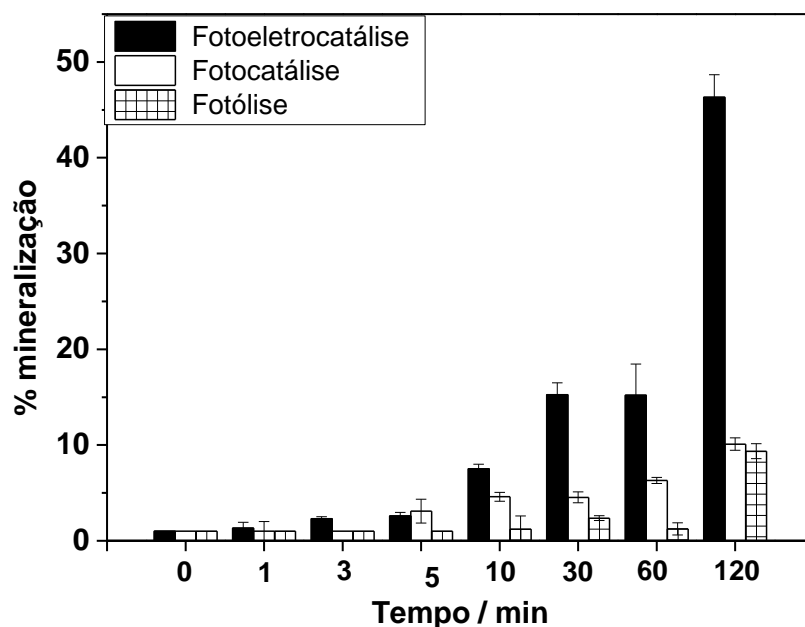
Técnica	FEC UV/Vis	FEC Vis	Fotocatálise	Fotólise
Tempo de inativação (min)	5	15	20	30
% mineralização	29	20	14	9
% redução DQO	27	18	14	8
% redução Turbidez	72	59	54	20

Fonte: Próprio autor

Os dados obtidos mostram que os eletrodos feitos com *templates* sintéticos são eficientes para o tratamento do dialisato contaminado por *C. parapsilosis*. Ao realizar uma comparação com os eletrodos bioinspirados de W/WO₃, isso mostra que a morfologia bioinspirada contribui para um melhor rendimento da reação, tendo um desempenho superior ao eletrodo feito com moldes sintéticos

A última aplicação deste material foi no efluente proveniente da hemodiálise. Conforme feito sistematicamente, o efluente foi fortificado com $1,0 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ e ajustado para pH 3. A Figura 59 reúne os resultados obtidos das degradações fotoeletrocatalíticas conduzidas sob irradiação UV/Vis e visível, degradação fotocatalítica sob radiação UV/Vis e fotólise. Para contagem microbiana, foram necessários 10 minutos para 99,9% de morte do *C. parapsilosis* sob radiação UV/Vis seguido de 30 minutos tanto para fotocatalise e fotólise.

Figura 59: Porcentagem de mineralização para as técnicas de FEC UV/Vis, fotocatálise e fotólise conduzidas sob eletrodos construídos por *templates* de W/WO₃ em presença de efluente.



Fonte: Próprio autor.

De maneira geral, os eletrodos bioinspirados tiveram um melhor desempenho frente aos sintéticos em relação à degradação, o que pode estar relacionado com a morfologia do material, evidenciando assim a dependência entre desempenho e morfologia do eletrodo. Contudo, os eletrodos feitos por *templates* sintéticos tiveram resultados bem promissores. Principalmente quando é levado em conta a complexidade das matrizes empregadas.

5. FUTUROS EXPERIMENTOS

Em virtude da grande complexidade da constituição do efluente oriundo proveniente da hemodiálise, aspira-se desenvolver uma metodologia cromatográfica para a análise e acompanhamento das espécies majoritárias presentes: creatinina, ácido úrico e ureia. Dessa maneira, poder-se-á fazer uma análise cinética de todos os tratamentos e eletrodos aplicados.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos indicam que o eletrodo bioinspirado de W/WO₃ preparado eletroquimicamente apresenta estrutura semelhante ao filme do microrganismo previamente depositado e fase monoclinica com *band gap* em torno de 2,8 eV. O eletrodo é fotoativo e absorve na região do visível e do ultravioleta e apresenta maior fotocorrente no dialisato e radiação UV-Vis (aproximadamente 30 mA).

Parâmetros tais como: potencial aplicado, tempo de reação e concentração de *C. parapsilosis* e tempo de reação foram otimizados eletrólito suporte. As melhores condições observadas foram para uma concentração de 1×10^6 UFC mL⁻¹, tempo de 120 minutos de reação e aplicação de um potencial equivalente a +1,5 V. Durante um minuto de tratamento foi diagnosticada a morte das leveduras quando o fotoânodo era irradiado com luz UV-Vis e Vis com auxílio da lâmpada de vapor de Hg 125W. Não foi verificada a formação significativa de cloro ativo nas condições empregadas assim como não há formação de íons clorato e perclorato e espécies organocloradas durante a degradação fotoeletrocatalítica.

A comparação entre fotólise, fotocatalise e fotoeletrocatalise mostra que esta última se mostrou mais eficiente, obtendo uma mineralização de matéria orgânica de 70%, levando à conclusão de que a metodologia adotada é bastante promissora para a desinfecção do dialisato contaminado com *C. parapsilosis*. O eletrodo proposto também foi aplicado para a desinfecção de degradação do microrganismo em questão na forma de biofilme e observou-se uma mineralização de aproximadamente 35% e morte das células em 5 minutos de reação. Para o efluente proveniente da hemodiálise, o método mostrou-se bastante auspicioso com uma degradação de 47% da grande matéria orgânica e 3 minutos para morte de qualquer microrganismo presente. A modificação com prata ainda não foi feita de maneira satisfatória, o que requer uma investigação maior sobre melhores condições experimentais.

Os eletrodos bioinspirados modificados com prata, embora tenham perdido sua morfologia em decorrência da modificação com polidopamina, apresentou bons resultados tanto em presença de dialisato quanto efluente. Em sua melhor condição, o mesmo possibilitou a morte de 99,9% do microrganismo empregado em um minuto de reação e uma mineralização superior a 60%.

Capítulo 1: Considerações Finais

Paralelamente foram desenvolvidos eletrodos de W/WO₃ com filmes nanoestruturados designados por *templates* de poliestireno. Os eletrodos apresentaram um bom desempenho fotoeletrocatalítico para o tratamento de *C. parapsilosis* na sua forma planctônica e presente no dialisato e efluente.

Através dos resultados preliminares obtidos, pode-se concluir que o uso de eletrodos de W/WO₃ pode ser uma promissora alternativa para desinfecção de água e efluente oriundo do processo de hemodiálise. O trabalho é de cunho totalmente inovador para o tratamento da água de hemodálise. A fotoeletrocatalise é uma técnica eficiente para a desinfecção de águas, considerando-se que permitiu 99,9% de desinfecção em curtos tempos de tratamento para microrganismo altamente resistente aos tratamentos convencionais, sem geração de subprodutos tóxicos até o momento. Entretanto, formas de diminuir o tempo de tratamento e aumentar a porcentagem de mineralização da matriz orgânica são completamente pertinentes aspirando uma melhoria na eficiência da técnica empregada

Capítulo 2:

Construção de magneto-ELISA- e imunossensor eletroquímico para determinação de *Legionella pneumophila* em dialisato

1. INTRODUÇÃO

Legionella pneumophila é uma bactéria flagelada, gram negativa, saprófita da água, pertencente ao gênero *Legionella* o qual tem recebido destaque na literatura desde 1976, após um surto epidêmico de pneumonia rica em manifestações sistêmicas e de alta mortalidade ocorrida durante uma convenção em um hotel na Philadelphia, EUA (PEREIRA GOMES et al., 1989).

Por serem consideradas saprófitas aquáticas, as espécies de *Legionella* sp. são mais facilmente encontradas em ambientes aquáticos e estão associadas a duas doenças: a Doença dos Legionários ou legionelose e a febre de Pontiac. A legionelose trata-se da manifestação clínica mais expressiva da infecção e costuma evoluir para uma pneumonia atípica, com um período de incubação 2 a 10 dias. Surge habitualmente de forma aguda e, nos casos mais graves, pode culminar na morte do paciente (FERREIRA; CUNHA, 2007a; GUTIÉRREZ et al., 2006; MOBED et al., 2019).

A legionelose é contraída através da inalação de água contaminada por *Legionella* sp. ou na forma de aerossol, possivelmente, por aspiração pulmonar. A capacidade da *L. pneumophila* de causar a doença depende da sua multiplicação no interior dos macrófagos pulmonares. Dessa maneira, as bactérias produzem citotoxinas, que podem destruir os macrófagos e seriam liberadas no meio extracelular, recomeçando o ciclo infeccioso intracelular em outro macrófago (FERREIRA; CUNHA, 2007b; STOUT J. et al., 2007)

A principal fonte de *L. pneumophila* é o sistema de distribuição de água, podendo entrar nos sistemas de água do hospital em quantidade não detectável. Dessa maneira, a água preparada para a produção do dialisato em sistemas de hemodiálise possui um risco em potencial de contaminação por esse tipo de bactéria (STOUT J. et al., 2007; VAN KENHOVE et al., 2019). As estações municipais de tratamento de água também podem sofrer contaminação, no entanto a contaminação do dialisato é potencialmente prejudicial aos pacientes em hemodiálise.

Existem alguns parâmetros ambientais que condicionam tanto a colonização, quanto a multiplicação de bactérias e os outros fatores artificiais que influenciam sua amplificação e disseminação. Dessa forma, observando os sistemas de abastecimento de

Capítulo 2: Introdução

água, pode-se destacar alguns parâmetros que favorecem condições ambientais ótimas para o desenvolvimento de *Legionella*. sp. Os parâmetros são:

- i) Temperatura da água entre 20 e 50°C; o microrganismo tem crescimento ótimo entre 35 e 45°C;
- ii) Condições de pH entre 5 e 8;
- iii) Zonas de estagnação de água (reservatórios, tubulações dos sistemas prediais, pontos de extremidade das redes etc.);
- iv) Presença de matéria orgânica e biofilmes;
- v) Presença de materiais porosos e de derivados de silicões, potencializando a proliferação de bactérias (FERREIRA; CUNHA, 2007b; LIN et al., 1998)

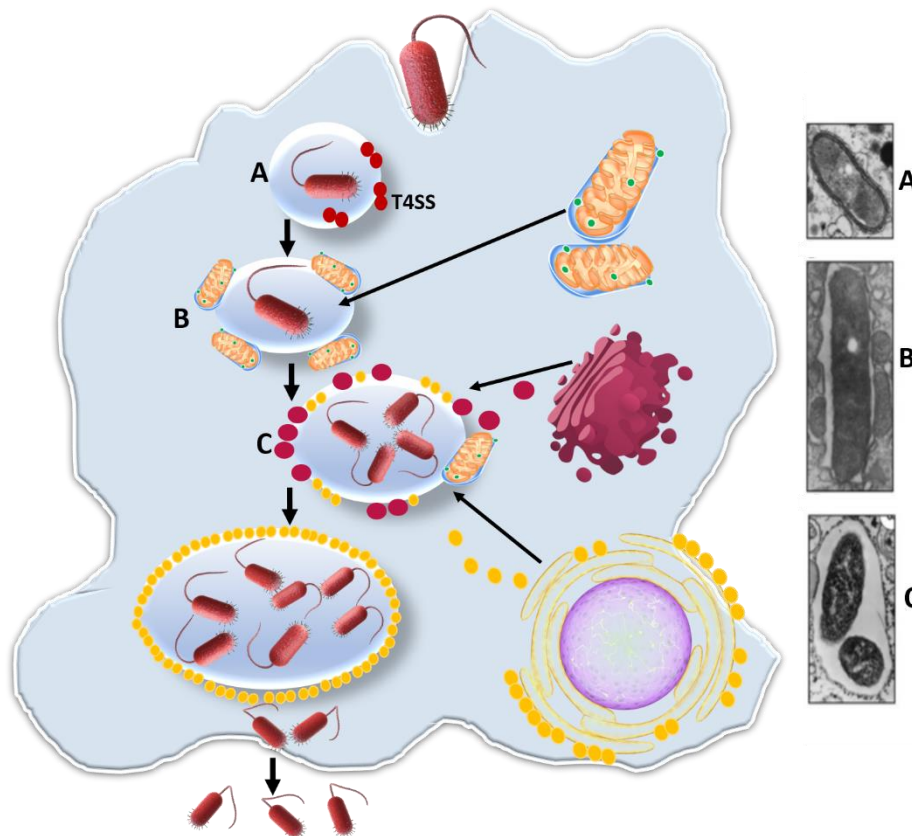
Equipamentos e sistemas que produzem aerossóis são aqueles que proporcionam um maior risco para a contaminação pelo microrganismo, uma vez que, as gotas de água contaminadas (com tamanho em média de 5 µm) podem penetrar no sistema respiratório de maneira profunda, chegando nos alvéolos pulmonares, causando assim a infecção. Cabe ressaltar que, apesar de se conhecer cerca de 48 espécies pertencentes ao gênero *Legionella*, 65 sorogrupos foram identificados e apenas 20 deles estão associados a estados patológicos em seres humanos. Os 20 sorogrupos identificados podem ser capazes de gerar algum tipo de acometimento severo, como pneumonia, em pessoas expostas a água contaminada.

A permanência e a multiplicação de espécies de Legionellas, em especial *L. pneumophila*, no ambiente são muito favorecidas pela presença de protozoários (*Hartmanella vermiformis*, *Tetrahymena pyriformes*) e amebas (*Acanthamoeba castellani*, *Naegleria spp.*). O mecanismo infeccioso se sucede por meio da invasão de *L. pneumophila* nestes hospedeiros e conseqüentemente ocorre a apropriação das macromoléculas intracelulares visando a multiplicação intracelular. Posteriormente ocorre a fase de replicação intracelular até o ponto em que ocorre a ruptura da célula hospedeira e o ciclo se reinicia (CIRILLO; FALKOW; TOMPKINS, 1994; PHILIPPE; BLECH; HARTEMANN, 2006), vide Figura 60. Diante deste contexto, pode-se inferir que quanto mais livre de microrganismos em geral esteja a água, melhor será sua qualidade microbiológica. Dessa forma, é imprescindível criar metodologia de

Capítulo 2: Introdução

tratamentos de desinfecção como abordado no Capítulo 1 e de identificação rápida de patógenos.

Figura 60: Processo de infecção e replicação de *Legionella pneumophila* no interior da célula hospedeira



Fonte: Adaptado de (AMBRÓSIO, 2017).

De acordo com SCHULZE; SONNENBORN, (2009), a pneumonia nosocomial - diagnosticada de acordo com os parâmetros do Centers for Diseases Control and Prevention (CDC), é responsável por aproximadamente 15% de todas as infecções hospitalares. Neste trabalho também é explicitado que nos EUA ocorrem por volta de 23.000 casos de legionelose. Adicionalmente, *L. pneumophila* é a segunda maior causa de pneumonia, sendo suplantada apenas por *Streptococcus pneumoniae* e responsável por uma quantidade significativa de surtos anuais de pneumonias de origem hospitalar. Cabe ressaltar que cerca de 40% dos pacientes com infecção hospitalar chegam a óbito por conta deste tipo de infecção (BRADLEY; BRYAN, 2019).

Capítulo 2: Introdução

As pneumonias em geral são consideradas como a primeira causa de morte entre as doenças respiratórias e, abstraindo-se as causas externas, estão em quarto lugar no *ranking* de mortalidade geral. Avalia-se que cerca de 19.000.000 casos de pneumonias ocorram por ano e que *L. pneumophila* é responsável por 6% dessa morbidade (SCHULZ et al., 2005). Pacientes com enfermidades graves ou imunodepressão possuem um alto risco de infecção por *Legionella* spp. Neoplasias não hematológicas, doença pulmonar crônica, tabagismo e idade avançada são comorbidades que contribuem para um aumento pronunciado na taxa de morte uma vez que pesquisas apontam que pessoas mais velhas e/ou com doenças adjacentes são mais propensas a morrer desta infecção (CDC, 2017).

Um estudo realizado pelo Grupo Europeu de Estudos de Infecção por *Legionella* spp (EWGLI- European Working Group of Legionnaires' Infection) evidenciou um aumento pronunciado no número de ocorrências de legionelose, principalmente na Europa, o que explicita a preocupação por parte dos países europeus em diagnosticar e identificar com rapidez a fonte dessas infecções (European Working Group of Legionnaires Infection - EWGLW, 2008 *apud* AMBRÓSIO, 2017).

Em um inquérito sorológico realizado em doadores de sangue e trabalhadores de Unidades de Tratamento Intensivo de três hospitais em São Paulo foram encontrados anticorpos em 19% das amostras testadas em um universo amostral de 800 pacientes (CARDOSO, 2016). Já LEVIN et al., (1991) investigaram um surto epidêmico em uma unidade de transplante renal em São Paulo e identificaram *L. pneumophila* como causa do surto, evidenciando a necessidade de um monitoramento regular deste bacilo no ambiente hospitalar.

Em um estudo realizado por FERREIRA (2004), *L. pneumophila* foi encontrada em amostras de águas oriundas dos sistemas de distribuição de água de hospitais, no Rio de Janeiro. Dos 16 hospitais inspecionados, em 5 foi verificada a presença de *L. pneumophila* sorogrupo 1, 3,4,5 e 6. Os resultados mostraram que a rotina de vigilância da rede de distribuição de um hospital é imprescindível para garantir que não ocorram agravos à saúde associados à presença desse agente etiológico.

Diante deste panorama, tendo em vista que a prevenção e controle de danos à saúde, evidencia-se a relevância de se implementar normas preventivas neste sentido. Quando comparado a outros países no mundo, o quadro epidemiológico no Brasil é bastante semelhante a nível mundial, onde FERREIRA E CUNHA (2007) estimam 6.000

mortes no Brasil por ano em decorrência de pneumonias causadas por *L. pneumophila*, casuística semelhante à tuberculose e superior que meningite.

Nos últimos anos, houve um aumento da preocupação com agentes infecciosos transmitidos pela água, como exemplo a *Legionella* sp., e novas estratégias de detecção das mesmas são vitais tanto para detectar a contaminação quanto para minimizar a proliferação em sistemas de água hospitalar (CAICEDO et al., 2019; WARD, 2011). Uma alternativa viável para a detecção dessas espécies é o desenvolvimento de imunossensores, que podem ser classificados como dispositivos envolvendo o acoplamento de reações imunoquímicas a transdutores apropriados. O princípio geral de funcionamento dos imunossensores é baseado no reconhecimento imunoquímico específico de anticorpos (antígenos) imobilizado em um transdutor para antígenos (anticorpos) sendo capaz de produzir sinais analíticos que variam dinamicamente com as concentrações de analitos de interesse (WANG; SHEN; YU, 2008).

1.1. Detecção de *Legionella* em amostras ambientais

O método mais recomendado e utilizado para a detecção de *Legionella* em amostras ambientais de água em acordo com a norma ISO 11731:2017, consiste em método decultura em meios seletivos (European Centre for Disease Prevention and Control, 2017; Instituto Português da Qualidade, 2014). De acordo com a norma ISO 11731:2017 Water quality – Enumeration of *Legionella* (2017), é necessário realizar uma filtração em membrana, com a finalidade de pré-concentrar a amostra, seguida da diluição e inoculação da amostra em meios de cultura seletivos com origem e características das amostras coletadas.

Objetivando a redução do crescimento de microrganismos interferentes na análise, a amostra pode sofrer alguns pré-tratamentos térmicos ou ácidos. Tal método de filtração por membrana é sem dúvida o método mais utilizado, uma vez que a concentração de *Legionella* é geralmente desconhecida. A filtração pode ser realizada em dois métodos distintos:

- i) Método de filtração de membrana e inoculação direta dos filtros nos meios de cultura;
- ii) Método de filtração de membrana seguido de processo de lavagem.

Capítulo 2: Introdução

Após filtração em membranas, as alíquotas são inoculadas nos respectivos meios de cultura específicos para o tipo de crescimento de *Legionella*. Comumente os meios mais usados são: agar BCYE, BCYE-Cys, BCYE+AB e agar GVPC (Glicina, Vancomicina, Polimixina b, Ciclohexamida). O tempo de incubação utilizado é de 7 a 10 dias com uma temperatura de incubação em torno de 36°C. Após o período de crescimento, deve-se avaliar se há a formação de colônias de *Legionella* com auxílio de uma lâmpada ultravioleta que emite luminosidade em torno de 360 nm. Ao ser submetido a essa radiação, as colônias da bactéria em questão apresentam uma cor levemente esverdeada, sendo esta técnica muito aplicada para realizar especiação do microrganismo em detrimento de outros potencialmente presentes na amostra. Posteriormente, para confirmar a identificação de *Legionella*, deve-se inocular a amostra em meio BYCE-cys e BYCE por mais 5 dias à 36°C. Por fim, deverá considerar as colônias que cresceram no último meio e que não exibiram crescimento no meio com cisteína (Norma ISO 11731:2017 Water quality – Enumeration of *Legionella*, 2017). Apesar de ser um método relativamente seletivo, o método apresenta algumas limitações como alto tempo de análise (total de 15 dias), incapacidade para a detecção de bactérias em estado VBNC, baixa sensibilidade e perda da viabilidade das amostras (BURILLO; PEDRO-BOTET; BOUZA, 2017; DÍAZ-FLORES et al., 2015).

Um método alternância para a verificação da presença de *Legionella* em amostras ambientais é através do método PCR em tempo real que possibilita uma detecção mais rápida e bastante específica (DITOMMASO et al., 2015; WHILEY et al., 2014). Para a execução deste método é utilizado a norma ISSO/TS 12869:2012 (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2017; KIRSCHNER, 2016). Através da amplificação da sequência de DNA bacteriano, na quantificação de cópias presentes na amostra é possível. Entretanto, o método apresenta algumas limitações. Como o método determina toda a quantidade de DNA bacteriano presente na amostra, o que faz com que o método não diferencie as bactérias que se encontram em atividade das demais (DITOMMASO, RICCIARDI, GIACOMUZZI, ARAUCO RIVERA, & ZOTTI, 2015). Dessa forma, o resultado das concentrações presentes poderá estar muito acima da realidade. Sendo assim, o emprego de PCR não é muito indicado para monitorar níveis de *Legionella*, uma vez que os resultados de concentração não são fidedignos. Dessa forma para uma detecção rápida meramente qualitativa o método é amplamente empregado, embora seja falho na quantificação.

Uma outra desvantagem atrelada ao método de PCR é a expressão dos resultados. Geralmente, o método atinge concentração ao redor de $\mu\text{g mL}^{-1}$, dificultando assim a interpretação dos resultados obtidos, pois de acordo com as diferentes diretrizes, os níveis de *Legionella* são expressos em UFC mL^{-1} (AMBRÓSIO, 2017).

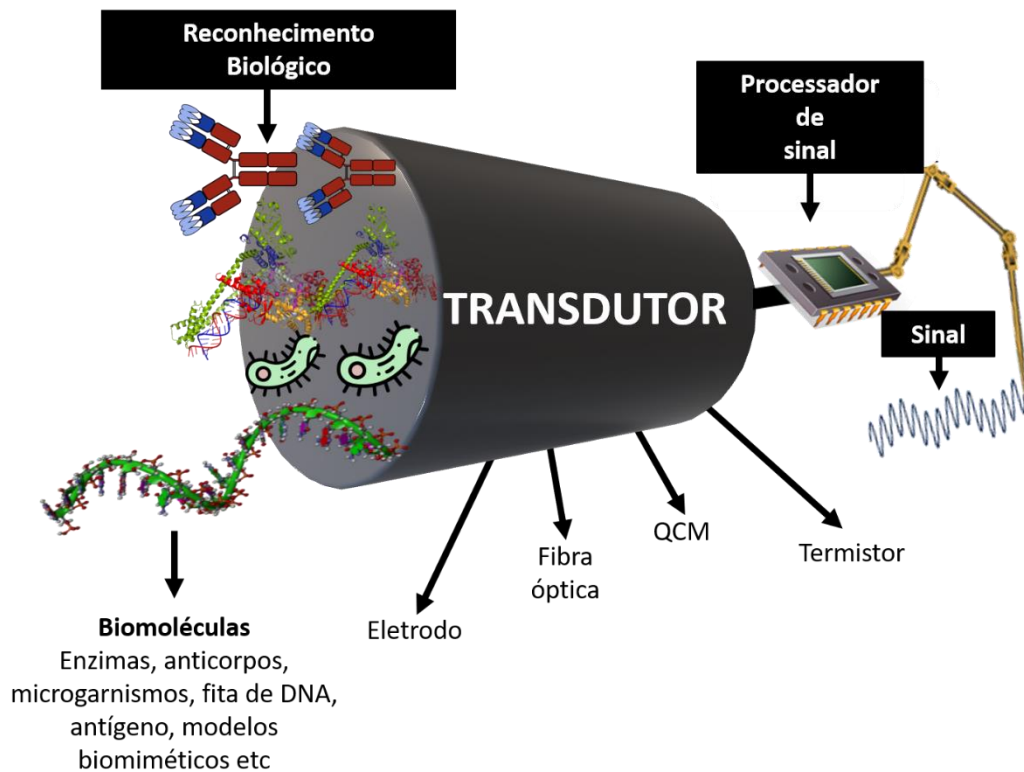
1.2. Biossensores e imunossensores aplicados à detecção de bactérias

Levando em consideração a International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), um biossensor é um dispositivo integrado, capaz de fornecer informação quantitativa ou semi-quantitativa específica. Para isto, utiliza como receptor bioquímico um elemento de reconhecimento biológico, o qual, é mantido em contato direto com um elemento de transdução (POSTHUMA-TRUMPIE; KORF; VAN AMERONGEN, 2009). A Figura 61 exemplifica um dispositivo biossensor, combinando uma determinada componente biológica (fita de DNA, enzima, anticorpos etc) com um transdutor físico-químico para detecção do analito em questão, como por exemplo um vírus, fungo, bactéria, células ou uma substância química.

A aplicação de um biossensor é diversa e vai desde a área clínica permeando por ambiental e bioprocessos, sendo o principal foco voltado para desenvolvimento de testes de diagnóstico rápido, *point-of-care* (POC). Tais testes podem ser aplicados em várias áreas como por exemplo: agricultura, saúde animal, ciência forense, diagnóstico médico, segurança alimentar, dentre outras (YU et al., 2011).

Com o advento do primeiro biossensor para a detecção de glicose realizado por Clark e Lyons em 1962 (CLARK; LYONS, 1962), a comunidade científica tem trabalhado no desenvolvimento de dispositivos com essa configuração, podendo-se exemplificar o próprio biossensor para detecção de glicose que ainda hoje é alvo de estudos, com mais de 40 tipos de dispositivos no mercado (FRANCO, 2010). Este comportamento demonstra a evolução dos sistemas e a procura incessante pela melhoria nas detecções, visando sistemas cada vez mais sensíveis e seletivos. Na arquitetura de um biossensor, o transdutor e o modo de interação do analito com a camada de reconhecimento constituem a chave para a construção destes dispositivos.

Figura 61: Representação esquemática de um biossensor



Fonte: Próprio autor.

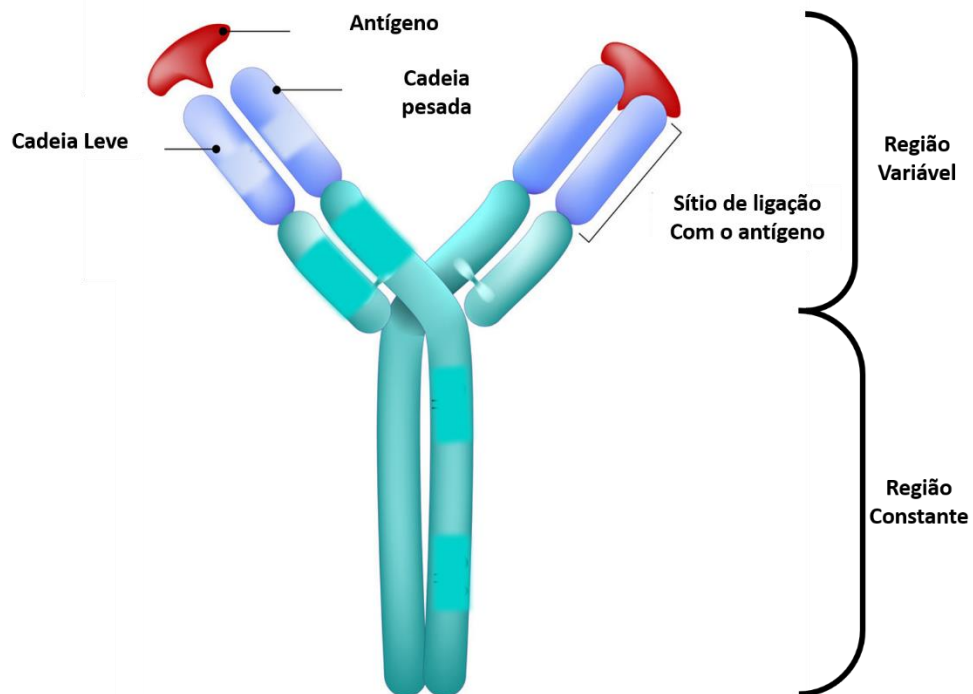
Considerando a camada de reconhecimento biológica, esta pode ser composta por diferentes tipos de biomoléculas como: enzimas, antígenos, anticorpos e fragmentos de ADN. Tecidos e microrganismos também podem ser usados, mas há uma menor proporção de trabalhos envolvendo estas espécies (FRANCO, 2010).

Dentre as diversas moléculas biológicas aplicadas, os anticorpos (Abs) podem ser conceituados como glicoproteínas de formato globular as quais são secretadas por linfócitos B, conferindo uma característica de especificidade de resposta imune humoral adquirida. Estas macromoléculas são compostas por duas cadeias polipeptídicas: sendo duas cadeias idênticas entre si, denominadas cadeias pesadas, e outras duas cadeias idênticas entre si, denominadas de cadeias leves. Sendo assim, as cadeias leves se ligam quimicamente às cadeias pesadas por ligações de dissulfeto. Ao longo das cadeias, estão as estruturas conceituadas como domínios, sequências repetitivas de aminoácidos que acabam assumindo uma conformação peculiar, podendo ser constantes ou variáveis. Dessa forma, os anticorpos são classificados de acordo com o tipo de cadeia pesada que

Capítulo 2: Introdução

possuam. No caso de uma molécula do tipo IgG, as cadeias pesadas interagem até o fim e depois se ramificam separadamente com cadeias leves, originando assim uma molécula em forma de Y. As imunoglobulinas podem ser clivadas por proteases nas dobradiças de separação. A clivagem com a papaína libera o fragmento basal denominado de Fc devido a sua cristalização imediata e duas ramificações menores, chamadas Fab, as quais são fragmentos de ligação dos antígenos. Nestas porções há a ocorrência da interação específica antígeno-anticorpo pois, cada uma das ramificações apresentam um sítio de ligação com seus respectivos antígenos (LEHNINGER, 2004). A estrutura de um anticorpo tipo IgG, a mesma classificação empregada neste presente trabalho, pode ser vista na Figura 62.

Figura 62: Estrutura do anticorpo e suas principais partes



Fonte: Próprio autor.

Antígeno (Ag) pode ser definido como uma molécula ou patógeno que tem a capacidade de gerar uma resposta imunológica. Dessa forma, pode ser um vírus, uma parede celular bacteriana, uma proteína ou qualquer outra macromolécula. Um receptor

Capítulo 2: Introdução

da célula T ou um anticorpo individual se liga à estrutura molecular dentro do antígeno, conhecido como determinante antigênico ou epítopo. A ligação estabelecida entre o antígeno e o anticorpo é resultado de diferentes tipos de interações e diferentes números de ligações. Costumam ser forças químicas não covalentes reversíveis que acabam controlando essa interação (BAE et al., 2004; FRANCO, 2010; LEHNINGER, 2004). Diante do que foi exposto, a construção de biossensores baseados na interação existente entre o antígeno e o anticorpo se tornou importante, sobretudo na área médica, onde está muito bem fundamentado o estudo do sistema imunológico.

Os imunossensores são definidos como um dispositivo sensorial composto por um anticorpo (ou antígeno) imobilizado na superfície transdutora, que converte o sinal biológico de imunoafinidade em um sinal analítico mensurável (JUSTINO; DUARTE; ROCHA-SANTOS, 2016). No âmbito dos biossensores, os imunossensores representam um grupo que merece uma atenção especial, pois a sua forma de detecção é muito sensível e seletiva. Quanto à classificação, os imunossensores podem ser classificados em dois tipos: os diretos e os indiretos. Os imunossensores diretos permitem o controle da interação de fato entre o antígeno e o anticorpo. Em relação aos imunossensores indiretos, estes mensuram o resultado desta interação por meio do uso de um marcador quimicamente ativo (FRANCO, 2010).

Os Imunossensores em geral têm como fundamento básico o princípio de imunoabsorção enzimática ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Ensaios ELISA são largamente empregados na detecção de antígenos e anticorpos (Figura 3) em uma amostra envolvendo o uso de seus respectivos anticorpos e antígenos específicos. Para realizar a detecção, é necessário o uso de enzimas e substratos específicos. Comumente são empregados marcadores enzimáticos como as enzimas *Horseradish peroxidase* (HRP), *Beta galactosidase* e a *Fosfatase alcalina*, uma vez que estas apresentam alta pureza, alta atividade específica e substrato estável (VICKERS et al., 2011). Há a necessidade de se utilizar substratos cromogênicos e específicos para cada enzima, os quais são hidrolisados, gerando pela formação de espécies coloridas, onde a intensidade de cor é proporcional à concentração do analito. Adicionalmente, tais enzimas quando em contato com seus substratos, geram espécie eletroquimicamente ativas que podem oxidar ou reduzir normalmente de forma reversível (CRISTEA et al., [s.d.]).

A enzima peroxidase HRP, a qual é obtida de raiz forte, conforme dito anteriormente é empregada com marcador nesses ensaios como marcador devido a suas

Capítulo 2: Introdução

significativas propriedades redox, que além do seu custo não muito elevado, proporciona uma resposta relativamente estável. A HRP trata-se de uma glicoproteína de que possui 308 resíduos de aminoácidos, com dois íons Ca^{2+} e um grupo heme ligado não covalentemente à cadeia polipeptídica, formando assim o grupo prostético que tem como função reduzir o peróxido (VAN HAANDEL, 2000).

Podem ser utilizados diferentes arranjos do método em questão utilizando enzimas e anticorpos, onde vários tipos de ligações do tipo não covalentes possibilitam para a interação entre antígeno e anticorpo estabelecida. Dentre estes tipos de forças, podemos destacar as forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. A afinidade entre o anticorpo e antígeno é calculada pela constante de afinidade (K_A), vide Equação 19, que por sua vez está intrinsecamente relacionada com a formação do complexo antígeno/anticorpo. Métodos com altas sensibilidades são obtidos pelos imunoenaios, como resultante dos altos valores de constante de afinidade, que variam de 10^4 a 10^{12} L mol^{-1} (RICCARDI, SANTOS; YAMANAKA, 2002).

$$K_A = \frac{[AbAg]}{[Ab][Ag]} \quad (19)$$

Onde Ab é correspondente ao anticorpo, Ag relacionado com o antígeno e AbAg, o complexo anticorpo-antígeno formado.

Considerando o tipo de analito de interesse pode-se construir diferentes configurações de ELISA, como por exemplo: direto, indireto, competitivo e sanduíche indireto. A Figura 63 apresenta graficamente algumas configurações possíveis para o imunossensaio ELISA. Na configuração direta, um antígeno, ou um anticorpo é imobilizado na superfície dos poços da microplaca. Posteriormente uma proteína (albumina do soro bovino, caseína, etc) é adicionada em excesso com objetivo de fazer o bloqueio dos sítios de ligação livre. Um Ab marcado com uma enzima é adicionado ao poço. O Ab interage com seu Ag, formando o complexo Ab/Ag e o excesso de anticorpo marcado com a enzima é então lavado. A etapa a seguir consiste na adição do substrato da enzima o qual será convertido em um composto que fornecerá um sinal mensurável diretamente ligado à quantidade de Ag. A intensidade da cor produzida é medida por uma leitora de placas espectrofotométrica que medem a absorbância em cada poço utilizado (ANJOS, 2019).

Capítulo 2: Introdução

O ELISA indireto ocorre em duas etapas que envolvem dois processos de ligação do anticorpo primário e do secundário para se ligar no Ag de interesse. Dessa forma, inicialmente o Ab primário é incubado juntamente com seu Ag, seguida da incubação do anticorpo secundário. É oportuno salientar que esta configuração pode levar a geração de sinais não específicos decorrente da reação cruzada entre que o Ab secundário pode ocasionar. Durante a execução do experimento, o antígeno é incubado, seguido do bloqueio, seguidamente a solução contendo os anticorpos é adicionada no meio para a fixação, após a incubação do Ag com Ab primário, o Ab secundário marcado é adicionado ao meio. Cabe ressaltar que entre todas as etapas do ensaio, torna-se necessário uma lavagem para a retirada de espécies que não interagiram no meio reacional, para melhor entendimento, observe a Figura 4B.

O terceiro tipo de ELISA é o competitivo. O evento central é um processo de ligação competitiva pelo Ag da amostra (a ser determinado) e o Ag adicionado. Em questão de procedimento, os ensaios ELISA do tipo competitivo divergem dos demais tipos. As etapas principais são:

- i) O Ab primário é incubado com a amostra de interesse, formando o complexo Ab-Ag;
- ii) O complexo formado é adicionado na placa de 96 poços as quais são pré-revestidas com o mesmo Ag;
- iii) O Ab não ligado é removido com a lavagem da placa. Cabe pontuar que quanto mais Ag na amostra, menos Ab primários vão se ligar aos Ags que estão revestindo a placa.
- iv) Incubação com o Ab secundário;
- v) Adição de um agente cromogênico ou fluorescente para análise

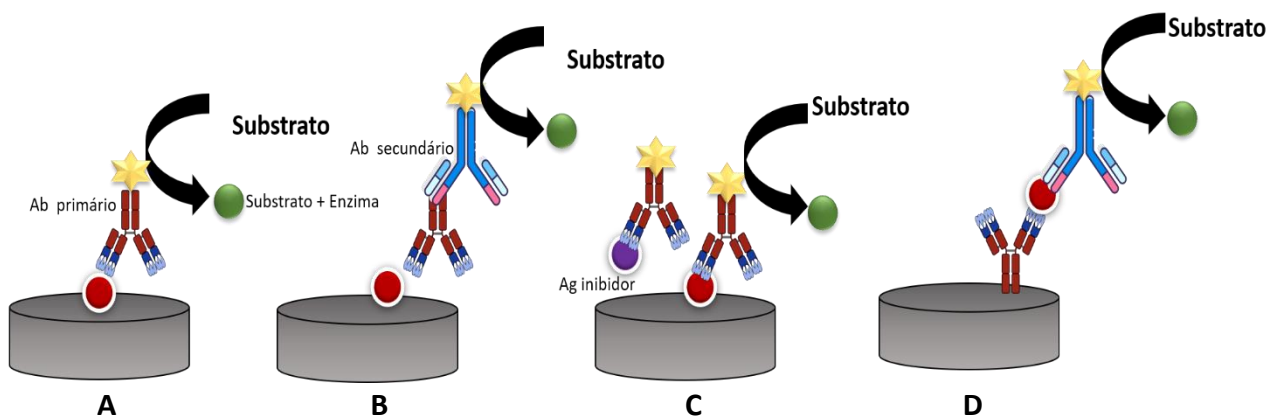
Dessa forma, quanto maior o sinal obtido, menor a concentração de Ag na amostra. Uma grande vantagem desse tipo de ELISA é a possibilidade de usar amostras brutas e impuras e ainda ligar seletivamente qualquer Ag que possa estar presente.

Por fim, o ELISA tipo sanduíche, mais rotineiramente utilizado para a quantificação de antígenos, consiste na quantificação do Ag entre duas camadas de anticorpos, de captura e detecção. Ao invés de ligar o antígeno diretamente na placa, os anticorpos primários são imobilizados, seguido da adição do Ag e por fim, incubação com o anticorpo marcado. Entre todas as etapas, são necessárias as lavagens para retirada de

Capítulo 2: Introdução

excesso de espécies. Por fim, a adição do substrato da enzima para formação de uma espécie colorida mensurável é realizada. Para este tipo de ensaio, o Ag a ser analisado deve possuir no mínimo dois epítomos para se ligar aos Abs. A vantagem do emprego deste tipo de ELISA é a não necessidade de um grande preparo de amostra e o aumento na sensibilidade do método (duas a cinco vezes mais que o ELISA direto e indireto).

Figura 63: Tipos de imunoenensaio ELISA: (A) configuração direta, (B) configuração indireta, (C) competitiva e (D) indireta do tipo sanduíche.



Fonte: Adaptado de (ANJOS, 2019).

Uma alternativa bastante utilizada para melhorar a eficiência de ensaios ELISA e dos imunossensores em geral tem sido o emprego de partículas magnéticas. Estas podem ser consideradas como ferramentas poderosas para o desenvolvimento e aplicações em imunoenaios (GESSLER et al., 2006; ZACCO et al., 2007). A utilização de imunopartículas melhora a eficiência da reação imunológica devido ao aumento da área superficial, assim como a cinética do ensaio, pois partindo da premissa que as partículas estão em suspensão, a probabilidade do anticorpo se ligar ao analito é muito maior. Ademais, o uso de ímãs permite a fácil manipulação dessas partículas, onde o efeito de matriz pode ser minimizado devido às melhores condições de lavagem e passos de separação sem perdas significativas. Adicionalmente, tal estratégia possibilita análise de amostras sem pré-tratamento, como normalmente é requerido.

O emprego de imunopartículas vem sendo constantemente utilizado no desenvolvimento de biosensores para diversas aplicações, podendo destacar a detecção de zearalenona em amostras alimentícias, alcançando-se um limite de detecção de 0,011

Capítulo 2: Introdução

$\mu\text{g mL}^{-1}$ (HERVÁS; LÓPEZ; ESCARPA, 2009) ácido fólico em leite com LD equivalente a $0,027 \text{ nmol L}^{-1}$, *Plasmodium faciparum*, associado à malária. LD de $0,36 \text{ ng mL}^{-1}$ (CASTILHO et al., 2011).

Em relação ao transdutor, este pode variar em forma e função para se adequar ao interesse em questão. Os principais transdutores são:

- i) Piezoelétricos: Avaliam as variações de frequência de um cristal de quartzo oscilante oriundas de um aumento ou diminuição de massa na superfície. Dessa forma um biossensor composto por uma biomolécula imobilizada sob um cristal de quartzo funciona de acordo com o princípio da molécula alvo em solução interagir de maneira específica com a camada de reconhecimento, possibilitando uma alteração na frequência de oscilação e conseqüentemente um aumento de massa do sistema (AFONSO, 2012; SKLÁDAL, 2003);
- ii) Ópticos: Em análises bioquímicas, sistemas do tipo colorimétricos são amplamente utilizados em análises bioquímicas de rotina, como ensaios tipo ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), os quais promovem reações tipo substrato-produto com variação de cor nas soluções. Os compostos fluorescentes ou quimioluminescentes são vastamente empregados como marcadores ópticos nas medidas fluorescentes de excitação e emissão dos compostos ou de seus respectivos compostos derivados. Tais propriedades são baseadas em fenômenos ópticos, possibilitando a detecção através das diferenças nos índices de refração e espalhamento de luz. Os transdutores geralmente combinados a estas técnicas são as fibras óticas, que transmitem luz tendo como princípio o fenômeno da refletância interna total (RIT), geralmente compostas por plástico ou sílica (FRANCO, [2010])
- iii) Térmicos: Estes tipos de transdutores são utilizados nas reações biológicas de interesse cujas quais sucedem com liberação ou absorção de calor, o que é refletido no aumento ou decréscimo de temperatura no meio reacional. Com auxílio de dispositivos termométricos, é possível realizar a mensuração da variação de temperatura de um fluido circulante seguindo uma reação sobre o

transdutor contendo a fase reconhecedora imobilizada. Baseados nos princípios de funcionamento de termômetros convencionais, estes transdutores medem calor a partir de termistores. Partindo dessa premissa, a liberação ou absorção de calor total é proporcional à entalpia molar e ao número de moléculas de produtos criadas na reação envolvida. Os termistores geralmente são resistores com um coeficiente de temperatura de resistência relativamente baixo. Costumam ser materiais semicondutores fabricados pela mistura de óxidos de níquel, ferro, cobalto, entre outros (RAMANATHAN; DANIELSSON, 2001)

- iv) Eletroquímicos: Sem dúvidas, os transdutores eletroquímicos são os mais encontrados na literatura. Isto justifica-se pela vasta gama de técnicas e materiais para construção dos transdutores atrelados à facilidade de manuseio. Adicionalmente, os sistemas podem ser miniaturizados em eletrodos impressos (*screen-printed*), que oferecem dispositivos debaixo custo, fácil manuseio e requer baixa quantidade de amostra. A presença de grupos passíveis de sofrer reações de oxi-redução nas estruturas biológicas pode ser detectada por medidas de corrente e carga. Dentre as diferentes técnicas que podem ser empregadas para o desenvolvimento de biossensor eletroquímico, está a Espectroscopia de Impedância eletroquímica (EIS) (ANJOS, 2019; FRANCO, [s.d.]; MOURA et al., 2020; ZACCO et al., 2007).

1.3. Espectroscopia de impedância eletroquímica aplicada ao desenvolvimento de Imunossensores

O princípio básico da Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) consiste na aplicação de uma perturbação senoidal de tensão de pequena amplitude e de frequência ω , ao sistema que está sendo estudado. A origem da impedância, (Z) relaciona-se com o aparecimento de uma corrente AC (*alternating current*), oriunda de um potencial, de modo análogo ao proposto pela Lei de Ohm (Equação 20).

$$R = \frac{E}{I} \quad (20)$$

Partindo do conceito de resistência (R), pode-se verificar que há uma relação simples entre potencial (E) e corrente (I) em sistemas DC (*direct current*). Em sistemas AC, a impedância é a relação que surge entre o potencial e a corrente. Portanto, de modo geral, a impedância pode ser compreendida como um tipo de resistência que surge em um dado sistema.

As equações 21 e 22 expressam a impedância como uma função transferência entre o potencial e a corrente de acordo com, que possui uma onda senoidal, devido ao sistema de corrente alternada. Por isso, conforme foi dito anteriormente, a partir de uma pequena perturbação de potencial ou corrente sobre o sistema, a resposta de corrente ou de potencial que aparece pode se encontrar ou não em fase ou até mesmo em ângulos intermediários (Φ : ângulo de fase) à outra função (SKINNER; HALL, 1994).

$$E_t = \Delta E \text{ sen}(\omega t) \quad (21)$$

$$i_t = \Delta i \text{ sen}(\omega t + \phi) \quad (22)$$

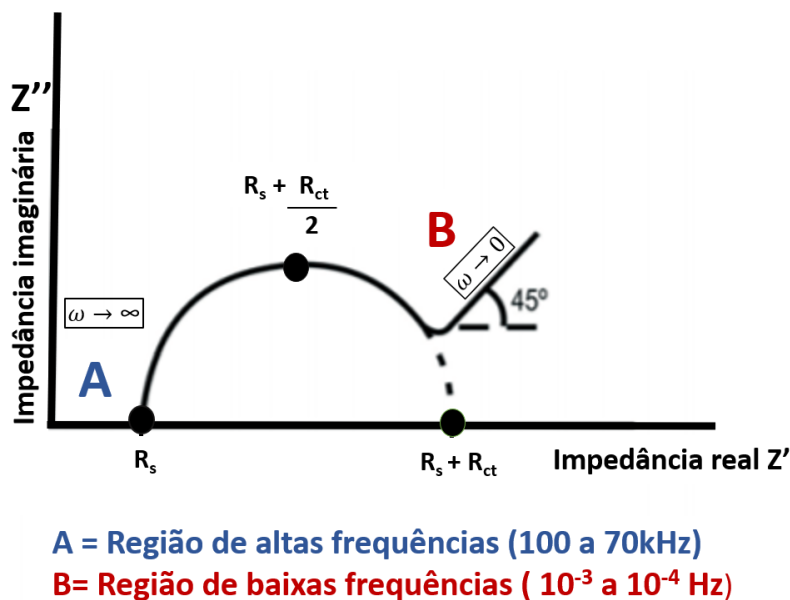
Uma vez que a frequência (ω) com que a perturbação de potencial ou corrente aplicada é variada em uma medida sob um intervalo determinado previamente, acontece deste modo, uma varredura de frequências, onde em cada frequência operante é obtida uma resposta em relação ao potencial-corrente medidos. Por isso que a palavra espectroscopia é satisfatoriamente empregada para denominar esta técnica. Dessa forma, é possível perturbar o sistema utilizando diferentes valores de frequência, uma vez que a onda de potencial é do tipo senoidal. Sendo assim, é possível empregar a técnica para análise de etapas de um mecanismo reacional a partir da obtenção de informações provenientes da impedância eletroquímica. Esta pode ser realizada aplicando diferentes modelos de medida, como os circuitos equivalentes ou modelos matemáticos (BARSOUKOV; MacDONALD, 2005)

Um dos modelos mais utilizados para apresentar as medidas de impedância é através do gráfico de Nyquist (Figura 64), onde se pode verificar os valores da parte imaginária de impedância (Z') em função da impedância real (Z''). O diagrama ideal de Nyquist é composto por um semicírculo na região de altas frequências e uma variação

Capítulo 2: Introdução

linear na região de médias e baixas frequências. Sendo assim, na região de frequências altas, o efeito da relaxação de transferência de carga é evidenciado através de um semicírculo, onde através da sua análise, é possível obter os valores de R_s (resistência do eletrólito e eletrodo), R_{ct} (resistência de transferência de carga) e C_d (capacitância da dupla camada elétrica (ORAZEM; TRIBOLLET, 2008).

Figura 64: Representação de um diagrama de Nyquist típico



Fonte: Próprio autor.

A resistência associada à solução eletrolítica, R_s , pode ter seu valor encontrado através da primeira interseção do semicírculo com o eixo real. Já a segunda interseção do semicírculo como o eixo real oferece o valor da resistência associada à solução eletrolítica com o valor da resistência relacionada com o processo de transferência de carga associada ($R_s + R_{ct}$).

O valor de R_{ct} está intimamente atrelado à transferência de elétrons que ocorrem nos processos de óxido-redução na interface eletrodo-solução. A transferência eletrônica sucede na superfície do eletrodo empregado, que impreterivelmente deverá estar em solução, funcionando como uma sonda. Partindo desse princípio fundamental, o valor de R_{ct} terá uma relação direta com a facilidade ou dificuldade com a qual ocorre o fenômeno de transferência eletrônica da sonda na superfície do eletrodo.

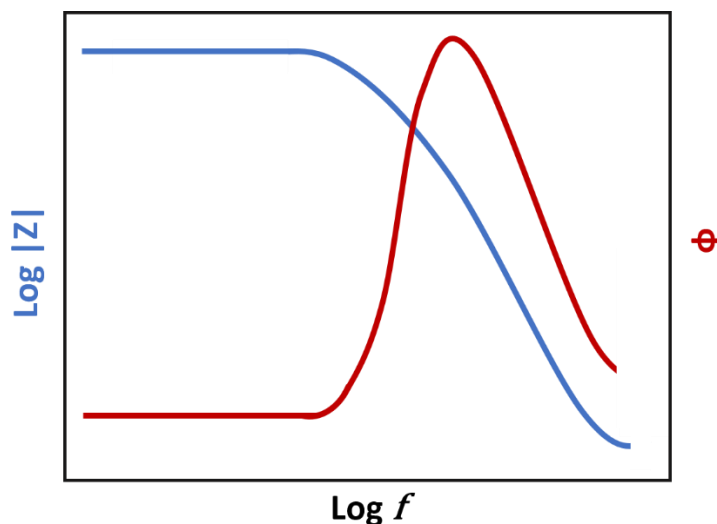
Capítulo 2: Introdução

O valor de capacitância da dupla camada elétrica, C_d , também pode ser obtido através da análise do presente gráfico. Tal capacitância surge em decorrência do acúmulo de cargas que se forma na interface eletrodo-solução, típico de um capacitor. O valor dessa capacitância pode ser obtido através da Equação 23 onde f é equivalente à frequência onde ocorre o valor máximo do semicírculo (ORAZEM; TRIBOLLET, 2008).

$$C_d = \frac{1}{2\pi r f R_{ct}} \quad (23)$$

Um outro gráfico muito utilizado para explicitar os dados obtidos da EIS é a curva de Bode (Figura 65). Para a construção dessa curva é realizada a plotagem de $\log|Z|$, onde $|Z|$ é igual ao módulo da impedância e o ângulo de fase (φ) versus o log da frequência. Deste gráfico pode-se obter informações complementares àquelas obtidas no diagrama de Nyquist. As mudanças no módulo da impedância apontam os efeitos da resistência à transferência de carga de um dado sistema. Contudo, com o aumento da frequência, observam-se alterações no ângulo de fase entre o potencial aplicado e a corrente resultante. Tal alteração observada no ângulo de fase contribui para a obtenção de informações em relação à componente capacitiva do sistema, pois estas componentes introduzem um comportamento co-senoidal na corrente (ORAZEM; TRIBOLLET, 2008 ;ROCHA, 2014).

Figura 65: Gráfico típico de Bode



Fonte: Próprio autor.

Em adição, nos sistemas que apontam efeitos significativos da impedância à transferência de massa, é conveniente a introdução de um elemento denominado “impedância Warburg” com a finalidade de simular características do sistema experimental. Dessa maneira, alguns fatores podem influenciar a impedância do sistema, podendo ser destacados os processos faradaicos, os processos de adsorção de espécies eletroativas e não eletroativas, reações no eletrodo envolvendo a formação de compostos intermediários estáveis, heterogeneidade de superfícies, de forma a possibilitar à EIE um vasto campo de aplicação (FRANCO,2010; ROCHA, 2014; YANG et al., 2009).

Com o propósito de dar uma finalidade analítica, os parâmetros da EIS (R_{ct} e C_d) podem ser associados à concentração do analito de interesse uma vez que o aumento ou diminuição da quantidade de uma substância que esteja imobilizada na superfície do eletrodo, um elemento de reconhecimento biológico, por exemplo, provocará mudanças nos valores destes parâmetros. Ademais, A EIS é amplamente empregada como técnica de caracterização de eletrodos já que a modificação desta superfície acarretará alterações em toda a dinâmica da interface do eletrodo, culminando em uma alteração do valor da impedância obtida.

No campo dos imunossensores, a EIS configura uma técnica que permite a manipulação da resposta em imunossensores livres de marcadores (*label-free*), pois a formação do par antígeno-anticorpo culmina em uma mudança nas características de resposta do eletrodo, dispensando o uso de medidas indiretas. Tal característica implica

Capítulo 2: Introdução

em uma maior simplicidade e menor custo atribuído ao sensor, pois o ensaio necessitará de um número inferior de etapas, dispensando o uso de anticorpos marcados (BAE et al., 2004; DANIELS; POURMAND, 2007; VENKATANARAYANAN; KEYES; FORSTER, 2013). Em adição, a EIS é uma técnica não destrutiva, podendo ser realizadas medidas sucessivas em um mesmo eletrodo sem causar muitos danos ao eletrodo.

Entre os trabalhos envolvendo imunossensores, pode-se destacar o trabalho realizado por SIAVASH ETEMADINEZHAD (2012) no qual, com auxílio de uma folha de ouro, como eletrodo de trabalho e imobilização dos anticorpos em partículas magnéticas de Fe_3O_4 modificadas com grupos carboxílicos e uso da técnica de voltametria de onda quadrada, foi desenvolvido um imunossensor eletroquímico para a detecção do vírus de hepatite B. O presente biossensor apresentou uma faixa de concentração linear de $0,3\text{-}1000 \text{ pgmL}^{-1}$ e limite de detecção de $0,19 \text{ pgmL}^{-1}$. Entre os escassos trabalhos envolvendo imunossensores impedimétricos, o trabalho realizado por HUSHEGYIET al. (2017) foi bastante relevante, principalmente quando avaliamos o atual contexto de pandemia. Neste estudo, um ultra-sensível imunossensor *label-free* foi construído para a detecção do vírus da gripe H3N2. Uma vez aplicado para a identificação e análise do vírus, o presente biossensor apresentou um LOD de aproximadamente 13 partículas virais, sendo menor dos valores de LOD encontrados até hoje para estes vírus.

Embora a literatura mostre que vários métodos para a detecção de *L. pneumophila tenham sido explorados*, tais métodos demandam grande tempo de preparação de amostra e elevado custo de análise. Diante deste contexto, torna-se imprescindível o desenvolvimento de novos métodos para determinação e quantificação de *Legionella* spp. Nesta parte do trabalho investigou-se o desenvolvimento de novos métodos de detecção e quantificação de *Legionella* spp usando reações imunológicas pelo método de ELISA, magneto-ELISA e biossensor eletroquímico.

2. OBJETIVO

O objetivo do trabalho foi investigar o desenvolvimento de um biossensor impedimétrico utilizando-se eletrodo epóxi-magneto, bem como o uso de ELISA e magneto-ELISA para determinação de *Legionella* sp. em amostras de água e ambiente hospitalar. Estes métodos serão baseados em ensaio imunológico entre a bactéria e anticorpos monoclonais específicos para *Legionella pneumophila* que reagem com o epítopo LPS, fazendo uso de partículas magnéticas para captura, seguido da transdução óptica e eletroquímica, para os ensaios de magneto- ELISA e biossensor, respectivamente.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes e Equipamentos

As partículas magnéticas de 280 e 450 nm de diâmetro modificadas com grupo tosil (Dynabeads MyOne™ Tosil ativadas, catálogo n° 665.01) foram obtidas da Invitrogen Dynal AS (Oslo, Noruega). Estas partículas magnéticas são formadas por magnetitas do tipo γ -Fe₂O₃ e Fe₃O₄ paramagnéticas, dispersas em uma matriz de polímero com conteúdo magnético médio de 17% (m/m). Os anticorpos utilizados nos ensaios foram: o anticorpo *Legionella* LPS monoclonal, Invitrogen, extraído de rato e *Legionella* Polyclonal Antibody, HRP, policlonal, Invitrogen extraído do coelho, ambos adquiridos da ThermoScientific. Caseína foi adquirida da Sigma. Aldrich *Legionella pneumophilla* ATCC 33152 foram crescidas em placas de *Legionella* MWY selective Agar (Scarlau Chemie, Espanha), e as culturas incubadas a 37 °C, onde foi realizada a contagem microbiana. A contagem também foi realizada por microscopia após realização da coloração Ziehl – Neelsen e observação em microscópio Leica- DMRBE (Leica, Alemanha). Todas as soluções aquosas foram preparadas com água Milli-Q (Millipore Inc., 18 M Ω cm). As soluções utilizadas para imobilização do anticorpo à partícula magnética foram: tampão de acoplamento (borato 0,10 mol L⁻¹, pH 8,5), sulfato de amônia (3,0 mol L⁻¹ preparado em tampão de acoplamento), PBS (tampão fosfato 0,01 mol L⁻¹ + NaCl 0,15 mol L⁻¹, pH 7,4), tampão de incubação (PBS com Caseína 2,0% m/v), tampão de bloqueio (PBS com Caseína 0,50% m/v e PBS com Glicina 0,50% m/v), tampão de lavagem (PBST com Caseína 0,10% m/v) e tampão de estoque (PBST com caseína 0,10% m/v e azida de sódio 0,02% m/v).

A detecção óptica para os ensaios ELISA foi feita através da adição de 100 μ L de solução do substrato H₂O₂ 0,004% (v/v) e TMB 0,01% (v/v) em tampão citrato e incubada por 30 min a temperatura ambiente no escuro. A reação enzimática foi interrompida adicionando-se 100 μ L de H₂SO₄ a uma concentração de 2,0 mol L⁻¹. A solução para detecção da atividade de HRP possui uma coloração azul (Absorbância máxima (A_{max}) em λ =370 e 652 nm) que muda para amarelo (A_{max} em λ =450 nm) após adição da solução de ácido sulfúrico para interromper a reação (GIJS, 2004). A medida de absorbância do sobrenadante foi realizada com microplaca de leitura usando um filtro de 450 nm. Placas de micropoços de polipropileno e poliestireno utilizadas em ELISA foram

adquiridas da Maxsorp (Catálogo n° 153364) e Nunc (Catálogo n° 269787, Roskilde, Dinamarca), respectivamente. A separação magnética das partículas durante as lavagens foi feita com auxílio de um separador magnético de tubos Eppendorf Dynal MPC-S (Produtos n° 120.20D, Dynal Biotech ASA, Noruega) ou placa magnética de 96- poços (Product no. 21358, Thermo FisherScientific, Waltham, USA). As incubações e lavagens com as placas de micropoços foram realizadas sob agitação utilizando um Minishaker MS1 (IKA, Alemanha), e a incubação a temperatura controlada em tubos Eppendorf foi realizada em um Eppendorf Thermomixer compacto.

As medidas ópticas foram realizadas em um leitor de microplacas TECAN Sunrise com o software Magellan 4,0.

As medidas impedimétricas foram realizadas em um potenciostato AUTOLAB 302N. Utilizando-se uma célula eletroquímica convencional de 3 eletrodos: platina como eletrodo auxiliar Ag/AgCl como eletrodo de referência (Orion 900200) com solução externa de KCl 3 mol L⁻¹ e eletrodo de trabalho o magneto sensor previamente preparado.

3.2. Imobilização do Anticorpo monoclonal anti-*Legionella* na partícula magnética (MP)

A imobilização do anticorpo *Legionella* LPS monoclonal na partícula magnética, tanto as de 280 e 450 nm, foi feita de acordo com protocolo do fabricante Dynal. Um volume de 165 µL de partículas magnéticas modificadas com tosil (Dynabeads M-280 e 450 Tosylactivated) foram lavadas 2 vezes com 1 mL de tampão de acoplamento, sendo o sobrenadante removido. Em seguida, as partículas magnéticas foram resuspendidas em 250 µL, sendo 125 µL de tampão de acoplamento, 25 µL do anticorpo e 100 µL de sulfato de amônio 3 mol L⁻¹ em tampão borato (pH 9,5). As partículas foram incubadas por 19 h (17 h em thermomix a 800 rpm e 37 °C, seguido por incubação em rotor a baixa rotação e temperatura ambiente por 2 h). Após a incubação, as partículas modificadas foram então resuspendidas ao mesmo volume (250 µL) de tampão bloqueante e incubadas por 2 h em thermomix a 37 °C, para inativação dos grupos tosil restantes. As partículas foram posteriormente submetidas a 2 lavagens com tampão de lavagem. Finalmente, foram resuspendidas em tampão de estoque para alcançar uma concentração final de 3,75 mg mL⁻¹ para as Mps 280nm e 1 x10⁶ mps mL⁻¹ e estocadas a 4° C. Antes de cada ensaio as

Capítulo 2: Materiais e métodos

partículas modificadas foram lavadas 3 vezes com PBS (tampão fosfato 7,4) e resuspendidas a volume final adequado para obter-se a concentração desejada (BRUGNERA, 2013).

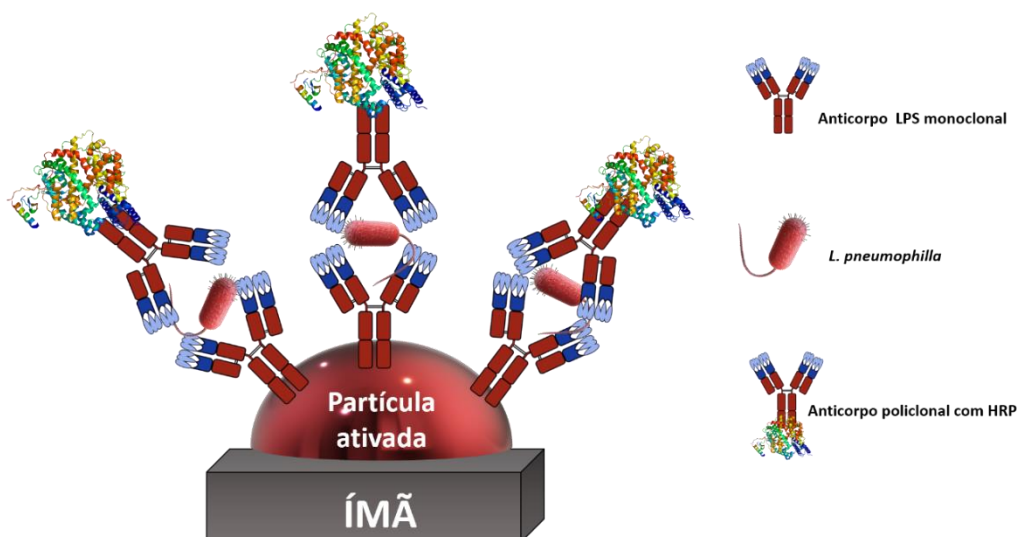
3.3. Ensaio ELISA e magneto-ELISA

O ensaio de magneto-ELISA sanduíche foi baseado na reação de captura imunológica a partir do emprego das partículas magnéticas com anticorpo imobilizados, marcação enzimática baseada na reação imunológica sanduíche, e detecção óptica. Foi sucedido conforme descrito a seguir: O ensaio foi realizado em placas de 96 poços seguindo os seguintes passos:

- i) Captura de *L. pneumophilla* (100 µL) pelas partículas magnéticas imobilizadas com o anticorpo monoclonal de acordo com o que foi supracitado, este passo envolve a reação imunológica entre o anticorpo e a bactéria flagelada adicionada em meio de água ultrapura por 1 h sob agitação (450 rpm) a temperatura ambiente;
- ii) Marcação enzimática, baseada em uma reação imunológica sanduíche, com 100 µL de anticorpo policlonal marcador com HRP por 1 h, seguido por 3 lavagens com 200 µL de PBS. Após essas etapas, de incubação e lavagem, as partículas magnéticas foram separadas do sobrenadante colocando-se as placas sobre imã
- iii) Detecção óptica com TMB e H₂O₂. A Figura 66 mostra um esquema do ensaio de Magneto-Elisa realizado.

Para otimização da concentração dos reagentes utilizou-se um protocolo de diluição (2D), sendo a concentração de um reagente variado na vertical e outro na horizontal da placa de 96 poços, permitindo a obtenção da condição ótima de ambos os reagentes. Sendo assim, este ensaio foi realizado para otimização da concentração das espécies participantes do ensaio. É oportuno salientar que, por motivos de segurança, a bactéria utilizada em todos os ensaios realizados foi inativada a 100°C por 10 minutos.

Figura 66: Esquema do ensaio de Magneto-Elisa realizado



Fonte: Próprio autor.

3.4. Magneto Imunossensor impedimétrico

3.4.1. Construção do eletrodo Grafite-Epóxi

Os eletrodos magnéticos compósitos de grafite- epóxi foram preparados como descrito a seguir (BRUGNERA, 2013).

Primeiramente, um parafuso de metal com 6cm de diâmetro foi fixado a um contato elétrico do tipo fêmea por meio de um metal de 2 mm de diâmetro na extremidade traseira. Simultaneamente, um disco de cobre de 5,9 mm foi mergulhado por poucos segundos em uma solução de $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}$ 1:1 (v/v) com a finalidade de realizar um tratamento químico para remover o óxido de cobre. Após secagem, este foi soldado com um fio de estanho na extremidade do contato elétrico fêmea, o qual foi colocado dentro de um tubo cilíndrico de PVC (diâmetro interno= 6 mm, diâmetro externo= 8 mm, e comprimento de 18 mm). Após este processo, uma cavidade de 3 mm foi obtida no final do corpo do eletrodo. Uma pasta de compósito de grafite- epoxi (GEC) foi preparada pela mistura manual de resina epoxi (Epo-Tek H77) e endurecedor (ambos de Epoxy Technology, EUA) a uma proporção 20:3, como indicado pelo fabricante. Grafite em pó (tamanho de partícula de 50 μm , BDH, UK) e resina epoxi em uma proporção 1:4 (m/m) foram misturadas manualmente até se obter uma dispersão uniforme de grafite em pó no

polímero. Uma fina camada da pasta resultante foi inicialmente colocada no corpo do PVC cilíndrico, o qual possui um contato elétrico a 3 mm de profundidade para isolar o disco de cobre. Um pequeno ímã de neodímio (diâmetro de 3 mm) foi colocado no centro do eletrodo. Em seguida, realizou-se o completo preenchimento do corpo do eletrodo com a pasta e por fim, o eletrodo foi curado a 90 °C por 5 dias, até a pasta tornar-se completamente rígida. Para realização das medidas o eletrodo foi lavado com água duplamente destilada e polido, primeiramente com lixa e em seguida com papel de alumina com o objetivo de atribuir o acabamento espelhado.

A aplicação e reprodutibilidade do sensor construído baseado em GEC e polímero foi previamente reportado pelo grupo de pesquisa (CASTILHO et al., 2011; PIVIDORI; MERKOÇI; ALEGRET, 2001). Com o auxílio destes eletrodos (m-GEC) pode-se capturar as partículas magnéticas contidas em tubos de eppendorf de 2 mL.

3.4.2. Otimização do magneto-Imunossensor impedimétrico

Com a finalidade de se obter um bom sinal eletroquímico, optou-se por realizar algumas otimizações, como concentração ótima de anticorpo e partícula.

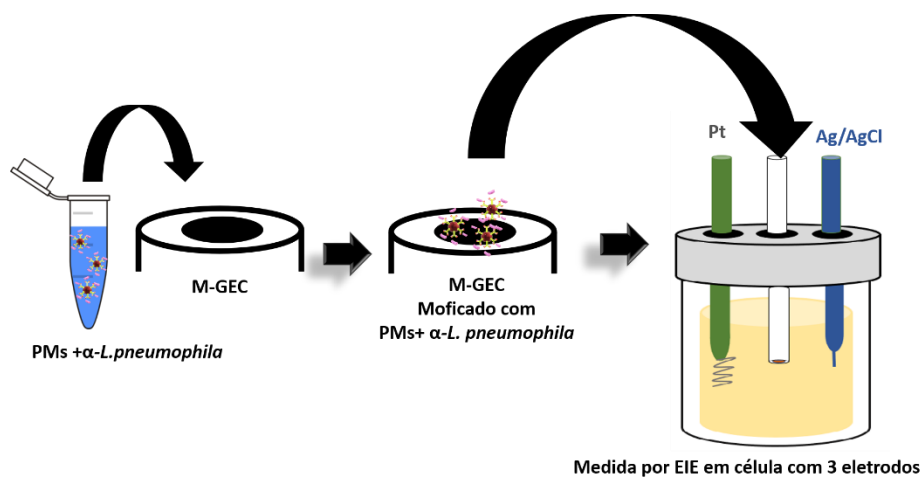
O ensaio foi realizado em eppendorff de 2 mL de acordo com as seguintes etapas, vide Figura 67:

- i) Captura de *L. pneumophila* (500 µL) pelas partículas magnéticas imobilizadas com o anticorpo monoclonal LPS durante uma hora de imobilização;
- ii) Lavagem com PBS para a retirada de espécies de não interesse;
- iii) Ressuspensão das partículas em água ultrapura;
- iv) Modificação do eletrodo m-GEC com o produto de imobilização da etapa passada com auxílio de uma micropipeta;
- v) Leitura por Espectroscopia de impedância eletroquímica

O sinal eletroquímico observado foi baseado na análise da impedância proveniente da modificação do eletrodo com as espécies em questão. A maior vantagem do emprego dessa técnica é o uso dessa medida label free, não necessitando da presença do anticorpo

secundário, barateando o processo, uma vez que à medida que se adicionam espécies orgânicas na superfície do eletrodo, estima-se que haja um aumento da impedância do sistema, deixando-o mais resistivo.

Figura 67: Esquema para o procedimento realizado na análise eletroquímica



Fonte: Próprio autor.

3.5. Microscopia Confocal

Microscopia confocal foi realizada para verificar as interações do imunoenensaio e checar de fato se as partículas capturaram o anticorpo primário, para isto os anticorpos imobilizados nas partículas modificadas em questão foram incubados com um anticorpo anti-rato marcado com Alexa Fluor 488 por 1 h, as observações foram realizadas com auxílio microscópio de varredura a laser confocal (Leica, Alemanha) usando Plan Apo 40 com objetivo de imersão. O marcador foi excitado com diodo azul (405 nm) e detectado na faixa de 415 a 460 nm.

3.6. Aplicação do método propostos para determinação de *L. pneumophila* em amostras ambientais e hospitalares

Os métodos propostos foram aplicados para determinação de *L. pneumophila* em amostras de água de torneira e água utilizada no processo de hemodiálise (dialisato) em concentração de $1,0 \times 10^5$ UFC mL⁻¹ e $1,0 \times 10^6$ UFC mL⁻¹.

Os ensaios de ELISA e magneto-ELISA, foram realizados utilizando o método de filtração em membrana como técnica de pré-concentração, como padronizado pela American Public Health Association (APHA). Membranas com poro de 0,45 µm foram utilizadas para filtração da água contaminada, utilizando-se 250 mL de amostra. Posteriormente, os filtros foram macerados em 2,0 mL em água e submetidos a vortex. Para realização dos ensaios utilizou-se 100 µL da solução.

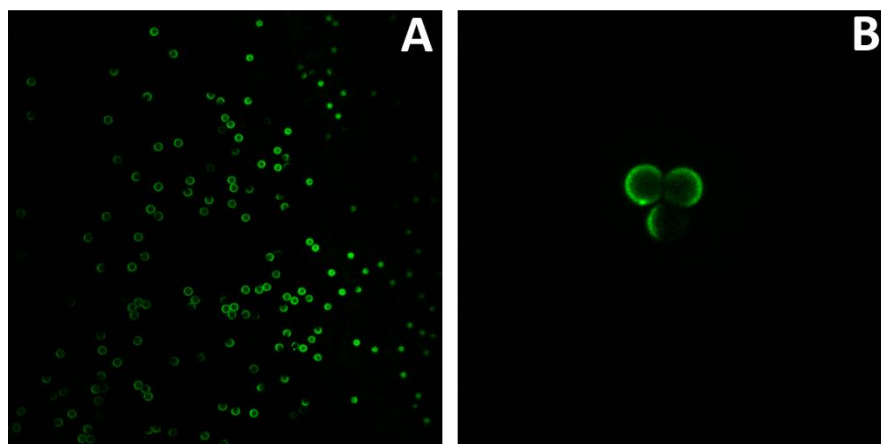
Em um método alternativo, as foram fortificadas com a suspensão aquosa de *L. pneumophila* e todo o processo de incubação já explicitado foi realizado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização das partículas magnéticas modificadas com anticorpo monoclonal LPS por microscopia confocal

A imagem obtida por microscopia confocal (Figura 68 A e B) mostra a modificação das partículas magnéticas com anticorpo α -*L. pneumophila*. Após o período de incubação com o anti- α -*L. pneumophila* marcado com Alexa Fluor 488 mostra que as partículas foram completamente recobertas, sugerindo que a modificação foi feita de maneira satisfatória. O mecanismo de imobilização está explicitado na Figura 69.

Figura 68: Imagens de microscopia confocal obtida após a modificação das MPs com o anticorpo primário.



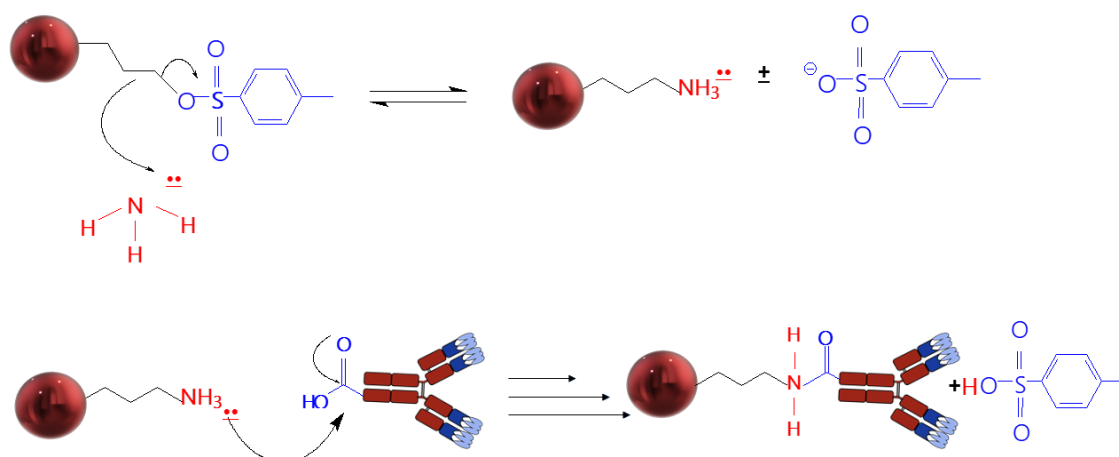
Fonte: Próprio autor.

Como pode ser visto, o mecanismo de modificação das partículas se dá primeiramente pelo ataque nucleofílico do grupamento amino ao carbono ávido por elétrons ligado ao grupamento tosil, configurando uma reação de substituição nucleofílica bimolecular, do tipo SN_2 . Este, por ser um excelente grupo abandonador, é substituído pelo grupamento amino, modificando assim a superfície da partícula. Por fim, a porção carbóxi-terminal do anticorpo sofre o ataque nucleofílico do grupamento amino presente na superfície da partícula magnética, formando assim uma ligação do tipo amídica, acoplando o anticorpo à partícula.

Capítulo 2: Resultados e Discussão

Ao analisar a Figura 68, verifica-se que o mecanismo supracitado ocorreu satisfatoriamente, possibilitando o uso da MPs nos posteriores imunoenaios.

Figura 69: Mecanismo proposto para modificação da MP com anticorpo α -*Legionella* LPS

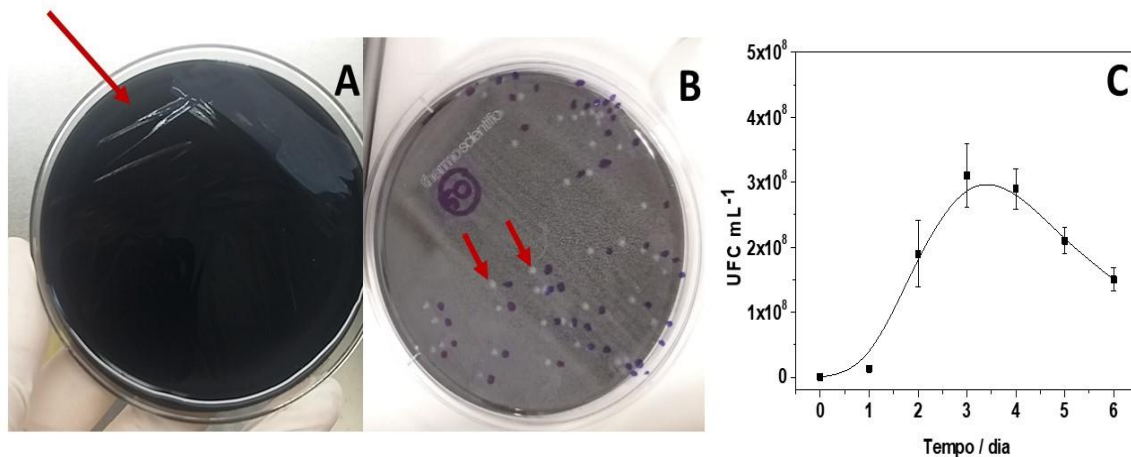


Fonte: Próprio autor.

4.2. Ensaio ELISA e Magneto-ELISA para a detecção de *L. pneumophila*

Esta primeira etapa do trabalho foi utilizada para a investigação da possibilidade de criar uma metodologia analítica baseada em ensaios do tipo ELISA e magneto-ELISA para a determinação de *L. pneumophila* em amostras de água. Inicialmente, foi realizada a ativação das cepas que estavam congeladas e foi estudada a cinética de crescimento da bactéria em questão ATCC 33152 em placas de Legionela MWY selective Agar (Figura 70 A e B) no período de sete dias, sendo as culturas cultivadas a 37°C em estufa. Para atender esta finalidade, foi utilizada a técnica de contagem microbiana. As curvas de crescimento estão presentes na Figura 70 C.

Figura 70: Reativação das Cepas de *L. pneumophila* A e B. Curva de crescimento microbiano obtida em C



Fonte: Próprio autor.

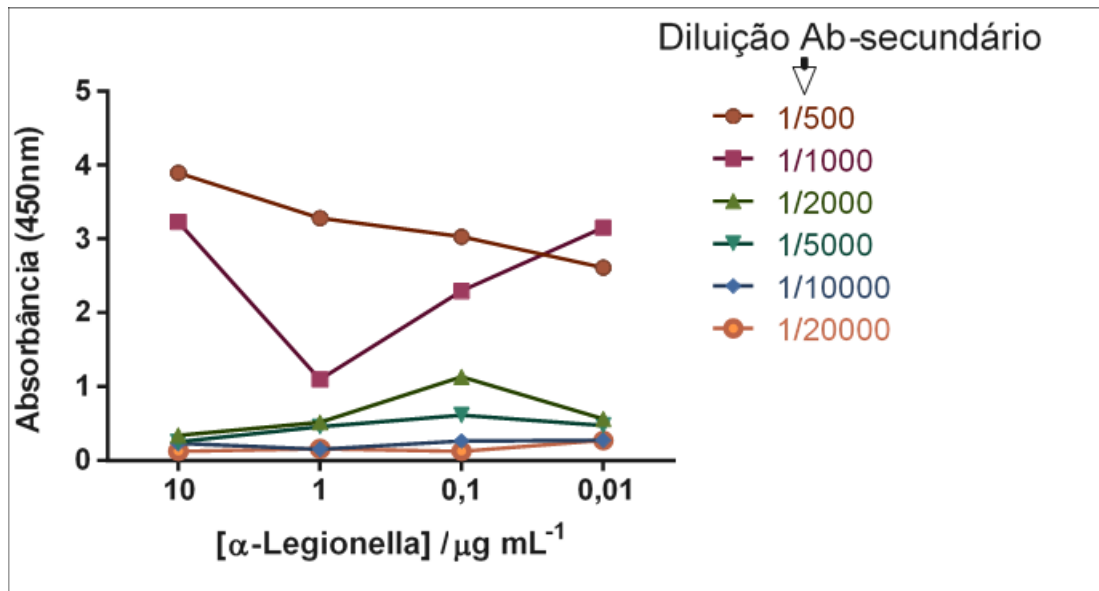
A análise do gráfico permite verificar uma curva típica de crescimento microbiano. Entre os dois primeiros dias há a fase tipo lag, com baixa ou ausência de divisão. Esta faz trata-se de uma fase de adaptação de latência, marcada por uma intensa atividade metabólica. No segundo e terceiro dia, observa-se a fase log, onde há um período de reprodução celular com grande atividade. No terceiro e quarto dia já se verifica a fase estacionária sem aumento no número de células vivas. A partir do quinto dia já há um decréscimo na quantidade de células presentes no meio, configurando o início da morte celular. Baseando-se na curva obtida, o período de 3 dias de incubação foi definido como tempo ideal de *L. pneumophila*, sendo este tempo usado para a obtenção das células bacterianas utilizadas para os experimentos posteriores.

4.2.1. Otimização Ensaio ELISA

O primeiro ensaio realizado foi um ensaio ELISA-2D do tipo indireto em caráter exploratório para conhecer o sistema a ser estudado, variando as concentrações de anticorpo primário e secundário concomitantemente com a finalidade de verificar como se dá a captura da bactéria em questão pelo anticorpo primário escolhido. A concentração de bactéria foi fixada em $1,0 \times 10^5$ UFC mL⁻¹. O resultado encontra-se na Figura 71.

Capítulo 2: Resultados e Discussão

Figura 71: Absorbância obtida para diferentes concentrações de no ELISA-2D indireto inicial. Condições: [*L. pneumophila*]= $1,0 \times 10^5$ UFC mL⁻¹, [Ac primário] = 10, 1, 0,1 e 0,01 µg mL⁻¹, Diluição Ab secundário: 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/5000, 1/10000, 1/20000 tempo de incubação= 1h



Fonte: Próprio autor

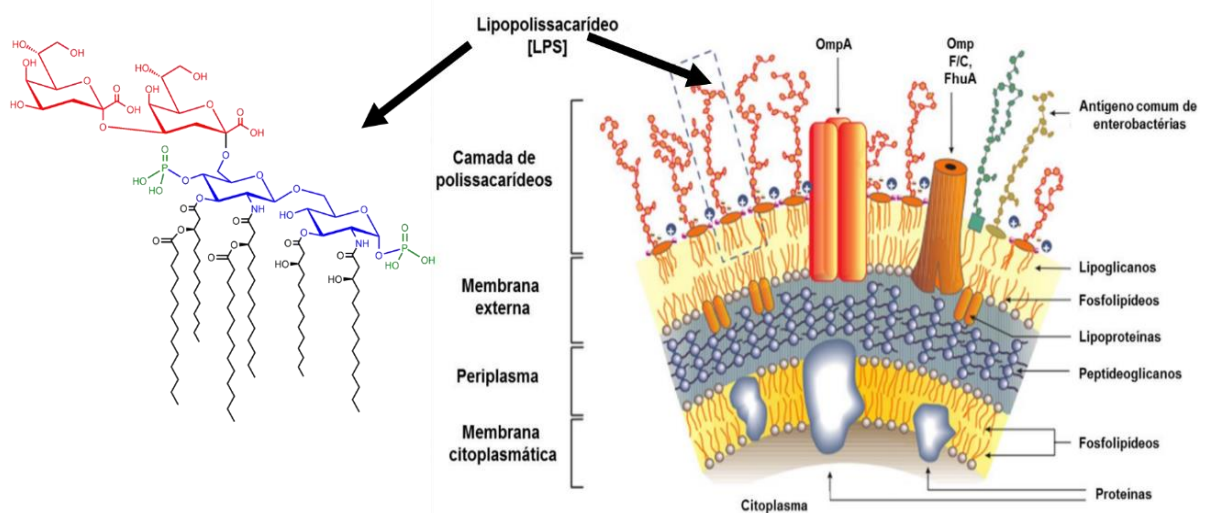
Pode-se observar que houve uma boa captura da bactéria pelo anticorpo, principalmente nas duas concentrações mais altas de ambos os anticorpos. Entretanto, é necessário explorar ainda mais o sistema. Como o ensaio final do magneto-ELISA é um ensaio do tipo sanduíche, optou-se por fazer um ensaio nessa configuração, de modo a se aproximar do sistema final para poder fazer uma comparação mais fidedigna. Todavia, cabe salientar que o resultado observado foi satisfatório.

Os anticorpos são caracterizados funcionalmente pelo epítipo que eles reconhecem de maneira específica. No caso em questão, a ligação a um epítipo ocorre através de interações não covalentes fracas, tais como: ligação hidrofóbica, forças de van der Waals, ponte de hidrogênio e interações iônicas, as quais são aproximadamente 100 ou 1000 vezes mais fracas quando comparadas às ligações covalentes. A soma das interações entre um epítipo e um sítio de ligação do anticorpo origina um complexo de baixa constante de dissociação, Kd. Ademais, esses tipos de interação apenas sucedem a distâncias muito curtas e é uma forma de complementaridade entre um epítipo e um sítio de ligação do anticorpo (modelo chave e fechadura) o qual possibilita a proximidade dos

Capítulo 2: Resultados e Discussão

dois (CRISTEA et al., [s.d.]). O anticorpo primário interage com o componente LPS celular da bactéria. O lipopolissacarídeo (LPS) é o principal antígeno imunodominante de todas as espécies de *Legionella*, incluindo *Legionella pneumophila*, sendo o principal antígeno reconhecido pelos soros dos pacientes infectados (RIGO, 2016). Trata-se de uma endotoxina presente nas bactérias gram-negativas, onde a parede celular é formada por uma camada fina de peptídeoglicanos e uma membrana lipídica externa cuja qual é decorada por lipossacarídeos em sua porção externa, garantido uma barreira protetora para a bactéria (PHILIPPE; BLECH; HARTEMANN, 2006). A estrutura da parede celular de uma bactéria gram-negativa juntamente com a estrutura química do LPS encontra-se na Figura 72.

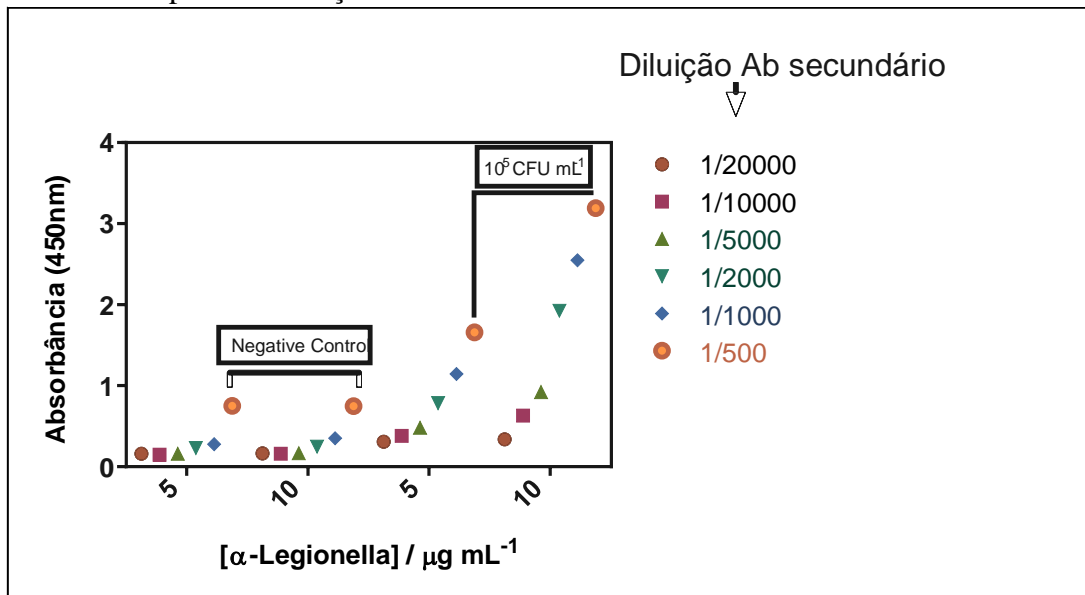
Figura 72: Estrutura de uma membrana de uma endobactéria, com destaque para a estrutura química do LPS



Fonte: Adaptado de (RIGO, 2016)

Na Figura 73 encontra-se os valores de absorbância encontrados no ensaio ELISA-2D tipo sanduíche realizado variando as concentrações de anticorpo primário e secundário ao mesmo tempo, onde a concentração de bactéria permaneceu fixa em $1,0 \times 10^5$ UFC mL⁻¹.

Figura 73: Absorbância obtida para diferentes concentrações no teste ELISA-2D sanduíche inicial. Condições: [*L. pneumophila*]= $1,0 \times 10^5$ UFC mL⁻¹, [Ac primário] = 5 e 10 µg mL⁻¹, Diluição Ab secundário: 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/5000, 1/10000, 1/20000 tempo de incubação= 1h



Fonte: Próprio autor

A análise do gráfico permite a observação de um comportamento sistemático, pois à medida que se aumenta as concentrações de ambos os anticorpos, há um aumento da absorbância obtida. Dessa forma, a combinação que envolvia o menor gasto de anticorpo e uma significativa relação sinal/ruído foi a de concentração de anticorpo primário igual a 10 mg mL⁻¹ e diluição de 1/2000 de anticorpo secundário para a construção da curva de calibração analítica, conforme visto na Tabela 12.

Capítulo 2: Resultados e Discussão

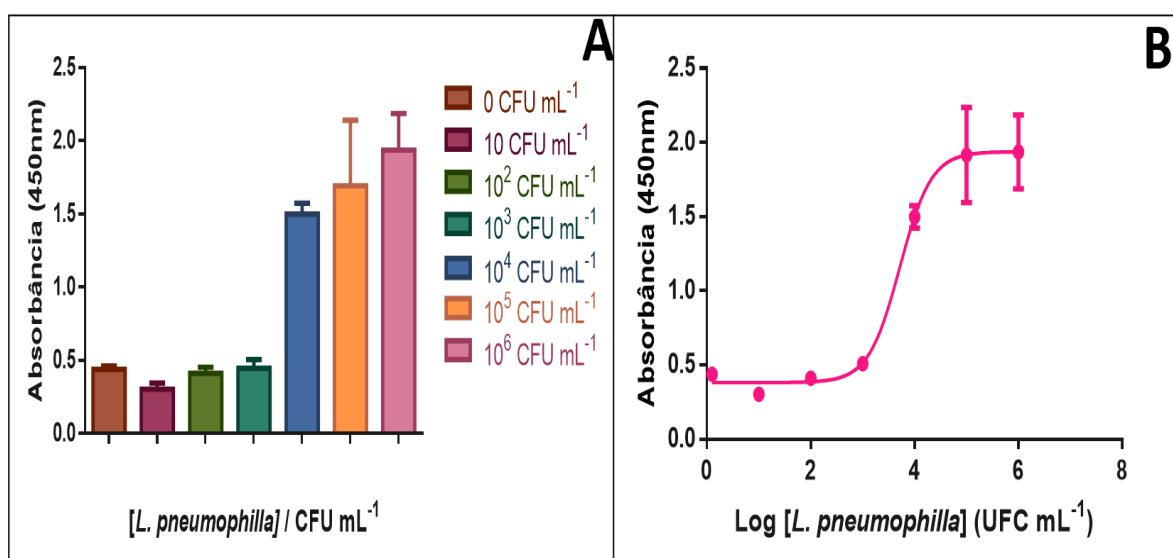
Tabela 12: Valores da relação sinal/ruído obtidos no Ensaio ELISA-2D Sanduíche

	1/20000	1/10000	1/5000	1/2000	1/1000	1/500
Sinal /ruído 5 mg mL ⁻¹	1,895	2,577	2,993	3,371	4,128	2,208
Sinal/ruído 10 mg mL ⁻¹	2,037	3,947	5,473	7,790	7,279	4,271

Fonte: Próprio autor.

Uma vez determinadas as concentrações de anticorpos a ser utilizadas, foi construída a curva analítica de calibração por meio do ensaio ELISA tipo sanduíche, utilizando-se as seguintes concentrações de *L. pneumophila*: 0,10,100,1000,10000,100000,1000000 UFC mL⁻¹. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 74.

Figura 74: Absorbância vs concentrações de *L. pneumophila* em UFC mL⁻¹ (A) e em Log (B). Condições: [Ac primário] = 10 µg mL⁻¹, Diluição Ab secundário: 1/2000, tempo de incubação = 1h



Fonte: Próprio autor.

Capítulo 2: Resultados e Discussão

Em concentrações inferiores a $1,0 \times 10^4$ UFC mL⁻¹ não é possível distinguir entre o sinal da bactéria e o sinal proveniente do branco da amostra, realizado em água (Figura 15B). Adicionalmente, pode-se perceber que a absorbância em função do log da concentração apresenta uma forma sigmoidal, típicas de ensaios ELISA.

A curva analítica obtida apresenta uma região linear no intervalo de concentração de $1,0 \times 10^4$ a $1,0 \times 10^6$ UFC mL⁻¹. Os limites de detecção e quantificação foram calculados cujos valores são $5,0 \times 10^3$ e $1,7 \times 10^4$ UFC mL⁻¹. Adicionalmente, pode-se verificar que não há efeito de matriz pronunciado, uma vez que as bactérias foram preparadas em água, o que facilita quando for aplicar esta metodologia em amostra real. A reprodutibilidade do método foi analisada através do desvio padrão relativo (DPR) de 10 medidas utilizando-se uma suspensão de *L. pneumophila* $1,0 \times 10^8$ UFC mL⁻¹, obtendo-se DPR de 2,71, mostrando que o método é bastante reprodutível.

Por fim, o método proposto foi aplicado para a detecção de *L. pneumophila* em água de torneira coletada no Hospital Universitário da Universitat Autònoma de Barcelona. Para isto, 250 mL da amostra, previamente autoclavada, foi fortificada com *L. pneumophila* nas concentrações $1,0 \times 10^5$ e $1,0 \times 10^6$ UFC mL⁻¹. Para fazer a concentração da amostra, foi utilizado o método de filtração por membrana e posteriormente a amostra foi re-suspendida em 1mL de água ultrapura. Os valores de unidades formadora da bactéria encontrados com suas respectivas recuperações encontram-se na Tabela 13.

Tabela 13 : Amostra analisada e recuperações obtidas utilizando o método ELISA sanduíche

<i>L.pneumophila</i> Adicionada (UFC mL ⁻¹)	<i>L.pneumophila</i> encontrada (UFC mL ⁻¹)	Recuperação (%)
$1,0 \times 10^5$	$2,3 \times 10^4$	23
$1,0 \times 10^6$	$2,7 \times 10^5$	27

Fonte: Próprio autor.

Os dados apresentados na Tabela 13 revelam que apesar de ser possível a detecção de *L. pneumophila*, os valores de recuperação foram relativamente baixos. Tal fato pode ser atribuído principalmente às perdas provenientes do processo de filtração por membrana, pois algumas bactérias podem ter ficado retidas na membrana utilizada. Dessa maneira, uma melhor otimização desta etapa seria de grande valia ser realizada. Estes

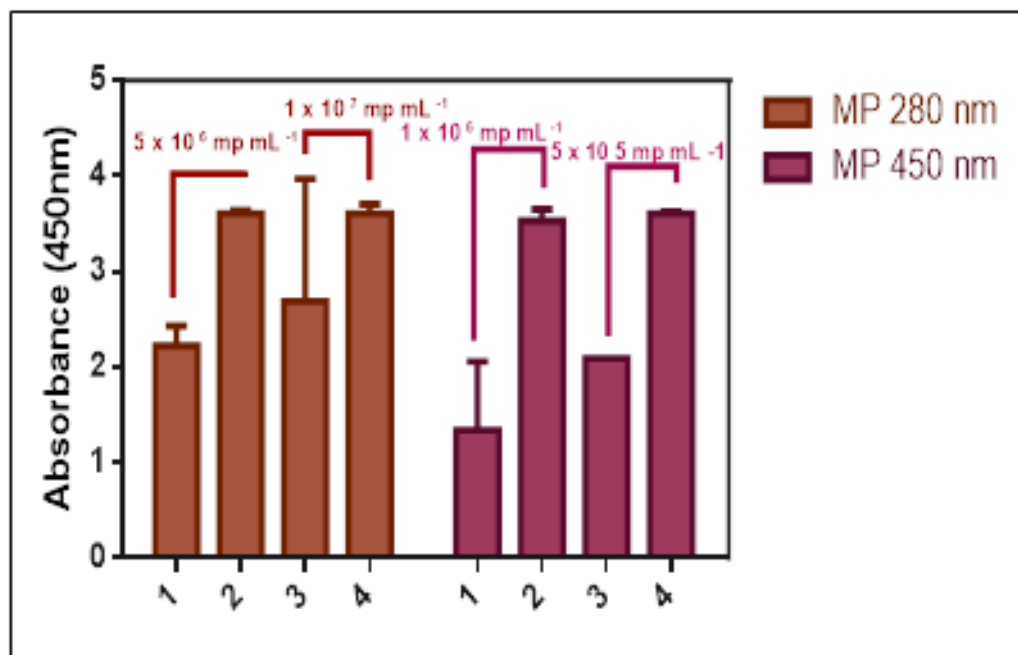
sugerem uma grande perda de bactérias no procedimento de filtração. Embora seja possível quantificar concentrações menores realizando-se a filtração de volumes maiores de amostra, tal comportamento não foi observado.

4.2.2. Otimização ensaios Magneto-ELISA

Os dados provenientes do ensaio ELISA já foram bastante promissores, no que se refere a estudo de reprodutibilidade e respectivos limites de detecção e quantificação. No entanto, com o intuito de melhorar a sensibilidade do método optou-se para o uso de partículas magnéticas, que poderiam propiciar pré-concentração da amostra (ZACCO et al., 2007). Deste modo, investigou-se a seguir o desenvolvimento da metodologia baseada no ensaio magneto-ELISA. Para alcançar este objetivo, algumas otimizações precisaram ser realizadas. Dentre estas otimizações estão: tamanho e concentração das Mps empregadas e concentração do anticorpo secundário, marcado com HRP.

Em relação ao tamanho das Mps, estudou-se duas concentrações diferentes com o objetivo de verificar qual tamanho seria mais adequado para o desenvolvimento da metodologia. Os tamanhos estudados de partícula foram equivalentes a 280 e 450nm, modificadas conforme relatado no item 3.2. A Figura 75 traz os resultados provenientes dos do ensaio magneto-ELISA realizado. A análise do gráfico permite concluir que as partículas com 450 nm de diâmetro, embora estivesse 10 vezes mais diluída, possuíram um melhor desempenho quando comparadas às partículas com 280 nm de diâmetro, pois apresentam uma maior relação sinal/ruído. Tal comportamento pode ser justificado pelo maior diâmetro das partículas, que propiciam maior área para imobilização de mais anticorpos, que por sua vez interagem com um maior número de bactérias, tornando a diferença entre branco e amostra mais discrepante. Dessa forma, esse tamanho de partícula foi escolhido nas medidas posteriores. Cabe ressaltar que para as essas etapas, a concentração de *L. pneumophila* foi mantida constante em 1×10^5 CFU mL⁻¹.

Figura 75: Absorbância obtida para diferentes concentrações tamanhos 280 e 450nm de partículas magnéticas no magneto-ELISA. Condições: [*L. pneumophila*] = $1,0 \times 10^5$ UFC mL⁻¹, Diluição Ab secundário: 1/2000, tempo de incubação = 1h



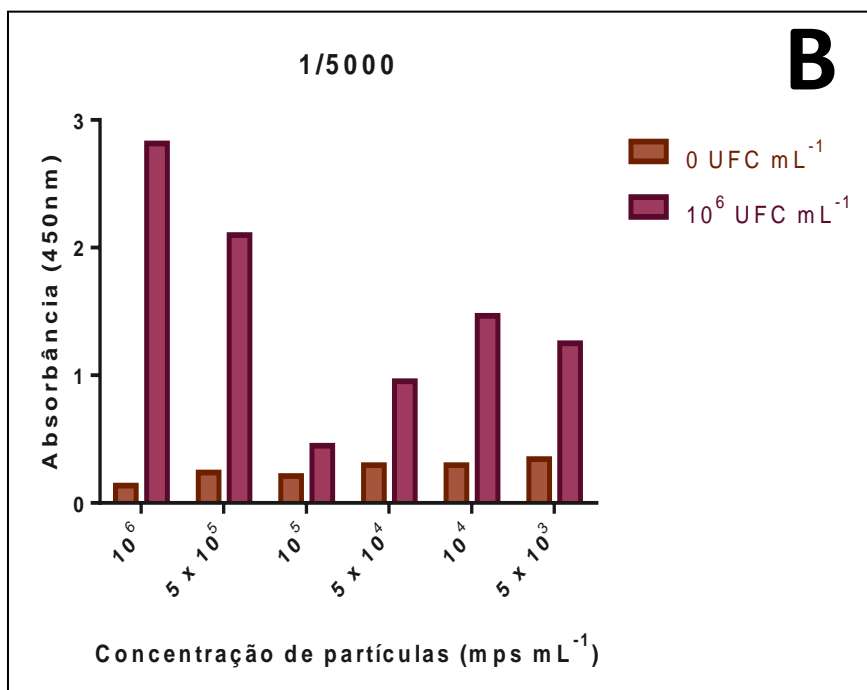
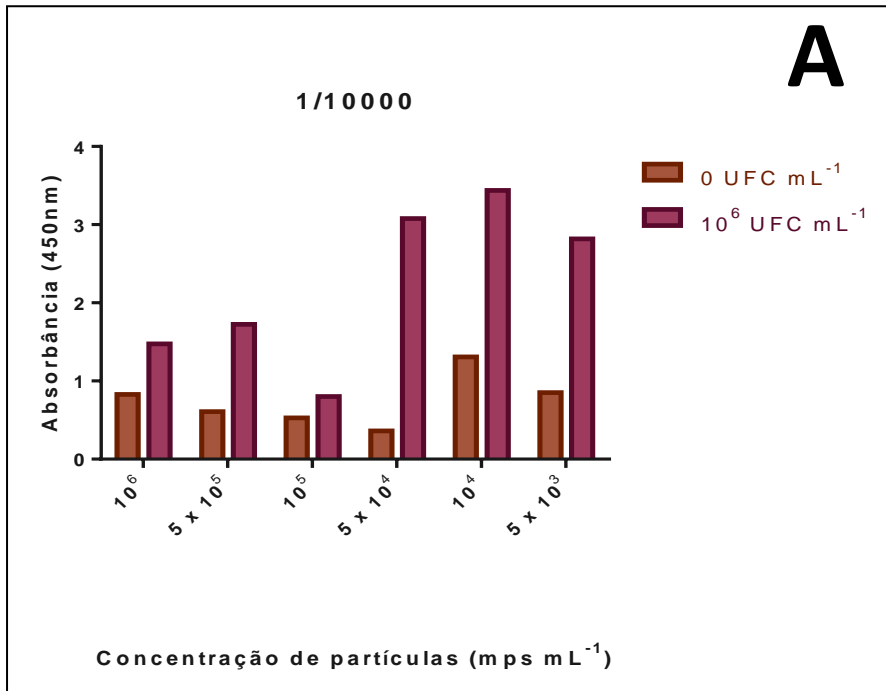
Fonte: Próprio autor.

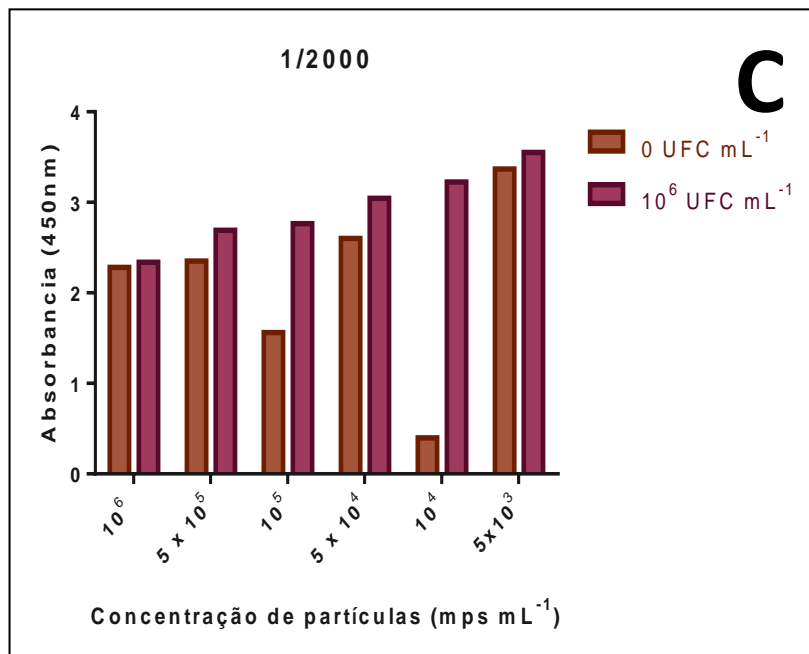
A seguir investigou-se a influência de dois outros parâmetros importantes no desenvolvimento do ensaio magneto-ELISA, i) concentração de partícula em $1,0 \times 10^6$ mp mL⁻¹, $5,0 \times 10^5$ mp mL⁻¹, $1,0 \times 10^5$ mp mL⁻¹, $5,0 \times 10^4$ mp mL⁻¹, $1,0 \times 10^4$ mp mL⁻¹ e 5×10^3 mp mL⁻¹; e ii) diluição adequada de anticorpo secundário, 1/10000, 1/5000 e 1/2000. Os resultados são apresentados na Figura 76.

A partir da análise destas informações, observa-se que primeiramente, a diluição de 1/2000 do anticorpo secundário não é a mais adequada neste caso, uma vez que não há uma diferença significativa entre branco e amostra. Tal comportamento pode ser explicado baseando-se no princípio de que se a concentração do anticorpo secundário estiver relativamente alta, mesmo com as lavagens e bloqueio do sistema, interações inespecíficas irão ocorrer, saturando o sistema de modo a não ter uma diferença pronunciada entre branco e amostra. Ainda observando os gráficos, pode-se inferir que a diluição 1/10000 forneceu maiores valores de absorbância e maiores valores da relação sinal/ruído. Dessa forma essa diluição foi escolhida para medidas posteriores.

Capítulo 2: Resultados e Discussão

Figura 76: Absorbância obtida para diferentes concentrações de partículas magnéticas no magneto-ELISA. Condições: [*L. pneumophila*]= $1,0 \times 10^5$ UFC mL⁻¹, Diluição Ab secundário: 1/2000, 1/5000, 1/10000 (A), 1/5000 (B), 1/2000 (C). [PMs] = 1×10^6 mp mL⁻¹, 5×10^5 mp mL⁻¹, 1×10^5 mp mL⁻¹, 5×10^4 mp mL⁻¹, 1×10^4 mp mL⁻¹ e 5×10^3 mp mL⁻¹ tempo de incubação= 1h





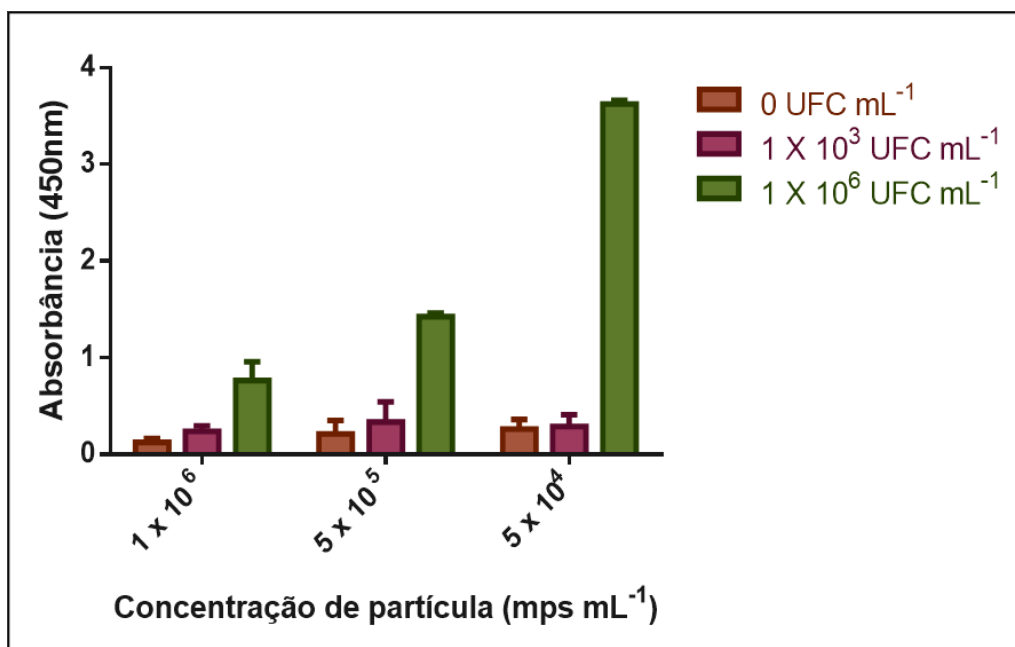
Fonte: Próprio autor.

No desenvolvimento do magneto-ELISA um ponto importante é o menor gasto de anticorpo secundário. Dessa forma, a seguir investigou-se qual o melhor desenho experimental para uso de menor concentração de anticorpo secundário, e menor concentração de HRP para marcação do anticorpo. Como as concentrações de 5×10^4 , 1×10^4 e 5×10^3 mp mL⁻¹ na diluição de 1/10000 conferiram maior valores de absorbância e conferiram uma boa diferença entre branco e amostra, foi realizado um Ensaio magneto-ELISA, variando-se esses valores de concentração e mantendo-se a diluição do anticorpo secundário em 1/10000, previamente otimizada. O resultado obtido é apresentado na Figura 77.

Observa-se que a melhor concentração corresponde a partícula em suspensão de equivalente a 5×10^4 mp mL⁻¹, a qual foi utilizada na construção da curva analítica. A Tabela 14 reúne os parâmetros avaliados e os respectivos valores otimizados no método desenvolvido.

Capítulo 2: Resultados e Discussão

Figura 77: Absorbância obtida para diferentes concentrações de partículas magnéticas no magneto-ELISA. Condições: [*L. pneumophila*]= $1,0 \times 10^5$ UFC mL⁻¹, Diluição Ab secundário 1/10000. [MPs] = $1,0 \times 10^6$ mp mL⁻¹, $5,0 \times 10^5$ mp mL⁻¹, $1,0 \times 10^5$ mp mL⁻¹, $5,0 \times 10^4$ tempo de incubação = 1h



Fonte: Próprio autor.

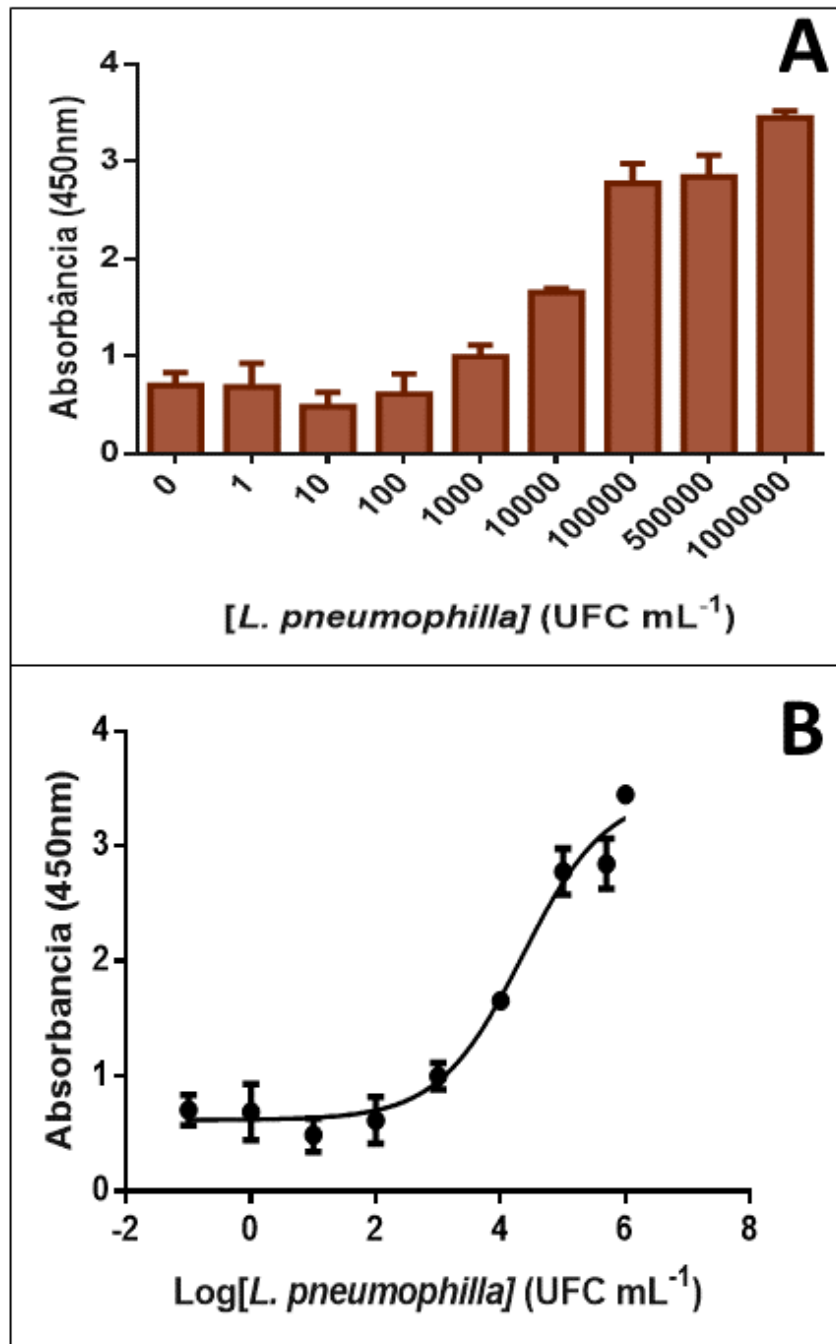
Tabela 14: Variáveis estudadas, intervalos avaliados e condição otimizada para ensaio magneto-ELISA para detecção de *L. Legionella*

Variável	Intervalo estudado	Valor otimizado
Diâmetro de Mp	280 e 450 nm	450 nm
Diluição Anticorpo secundário	1/2000 – 1/10000 mp mL ⁻¹	1/10000
Concentração Mp	$1 \times 10^6 - 5 \times 10^3$	5×10^4 mp mL ⁻¹

Fonte: Próprio autor.

Uma vez otimizados, os parâmetros necessários, foi construída a curva analítica de calibração por meio do ensaio Magneto- ELISA tipo sanduíche, utilizando-se as seguintes concentrações de *L. pneumophila*: 0,1, 10, 100, 1000, 10000, 100000, 500000, 1000000 UFC mL⁻¹. Os resultados obtidos encontram-se Figura 78.

Figura 78 Absorbância vs concentrações de *L. pneumophila* em UFC mL⁻¹ (A) e em Log (B). Condições: [MP] = 5 x 10⁴ mp mL⁻¹, Diluição Ab secundário: 1/10000, tempo de incubação igual = 1h



Fonte: Próprio autor.

Em concentrações inferiores a 1,0 x 10³ UFC mL⁻¹ não é possível distinguir entre o sinal da bactéria e o sinal proveniente do meio do branco (Figura 19), adicionalmente,

Capítulo 2: Resultados e Discussão

pode-se perceber que a absorvância em função do log da concentração apresenta uma forma sigmoide, típicas de ensaios ELISA, conforme já esperado (BRUGNERA, 2013; CARDOSO, 2016; CASTILHO et al., 2011; ZACCO et al., 2007.)A curva analítica obtida apresenta uma região linear no intervalo de concentração de 1×10^3 a 1×10^7 UFC mL⁻¹, correspondente a uma maior faixa de trabalho quando comparada com os resultados da ELISA sanduíche desenvolvido anteriormente. Os limites de detecção e quantificação foram calculados cujos valores são $1,3 \times 10^4$ e $6,3 \times 10^3$ UFC mL⁻¹. Ademais, também pode-se verificar que não há efeito de matriz pronunciado, uma vez que as bactérias foram preparadas em água, o que facilita quando for aplicar esta metodologia em amostra real, semelhante ao sistema anterior. A reprodutibilidade do método foi analisada através do desvio padrão relativo (DPR) de 10 medidas utilizando-se uma suspensão de *L. pneumophila* $1,0 \times 10^8$ UFC mL⁻¹, obtendo-se DPR de 4,54, mostrando que o método é bastante reprodutível.

Por fim, o método proposto foi aplicado para a detecção de *L. pneumophila* em água de torneira coletada no Hospital Universitário da Universitat Autònoma de Barcelona. O procedimento foi o mesmo realizado no item 3.6. Os valores de unidades formadora da bactéria encontrados com suas respectivas recuperações encontram-se na Tabela 4.

Tabela 15: Amostra analisada e recuperações obtidas utilizando-se o método magneto-ELISA.

<i>L.pneumophila</i> Adicionada (UFC mL ⁻¹)	<i>L.pneumophila</i> encontrada (UFC mL ⁻¹)	Recuperação (%)
$1,0 \times 10^5$	$5,2 \times 10^4$	52
$1,0 \times 10^6$	$5,4 \times 10^5$	54

Fonte: Próprio autor.

Os dados apresentados na Tabela 15 revelam que apesar de ser possível a detecção de *L. pneumophila* e os resultados serem mais satisfatórios quando se verifica o primeiro sistema, os valores de recuperação permanecem relativamente baixos. Conforme já citado anteriormente, tal fato pode ser atribuído principalmente às perdas provenientes do processo de filtração por membrana, pois algumas bactérias podem ter ficado retidas na

Capítulo 2: Resultados e Discussão

membrana utilizada. Dessa maneira, uma melhor otimização desta etapa seria de grande valia ser realizada.

Diante deste contexto, para compreender se a perda de amostra está ocorrendo na etapa de filtração por membrana, optou-se por um método mais simples de análise de amostra. Foi realizada uma fortificação de 1mL da amostra nas concentrações de interesse ($5,0 \times 10^5$ $5,0 \times 10^6$ UFC mL⁻¹). Após esse processo, as amostras foram submetidas aos ensaios imunoenzimáticos em questão. Os valores observados encontram-se na Tabela 16.

Tabela 16: Amostra analisada e recuperações obtidas utilizando-se o método magneto-ELISA apenas com fortificação da amostra.

<i>L.pneumophila</i> Adicionada (UFC mL ⁻¹)	<i>L.pneumophila</i> encontrada (UFC mL ⁻¹)	Recuperação (%)
$1,0 \times 10^5$	$8,6 \times 10^4$	86%
$1,0 \times 10^6$	$9,1 \times 10^5$	91%

Fonte: Próprio autor.

Os valores obtidos na Tabela 16 demonstram claramente que o processo de filtração por membrana apresenta algumas limitações e, necessitam maiores etapas de otimização. Embora o método de filtração de membrana seja eficiente para pré-concentrar as amostras, nova metodologia alternativa foram investigadas em experimentos posteriores usando espectroscopia de impedância eletroquímica.

4.2.3. Desenvolvimento magneto-imunosensor eletroquímico por Espectroscopia de impedância eletroquímica

4.2.3.1. Otimizações parâmetros EIS

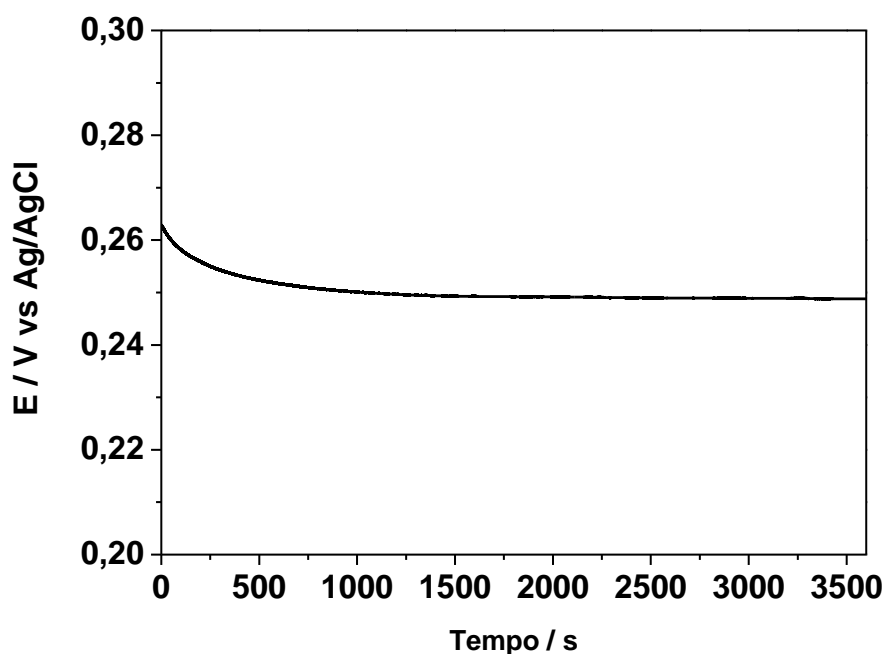
A seguir investigou-se o desenvolvimento de um imunosensor eletroquímico e impedimétrico para a determinação de *L. pneumophila*, com o objetivo de buscar melhores limites de detecção usando EIS, uma vez que neste método não é requerido a

Capítulo 2: Resultados e Discussão

presença de um anticorpo secundário e a detecção pode ser mais sensível (DANIELS; POURMAND, 2007).

Inicialmente, os parâmetros mais adequados para obtenção da resposta analítica foi estudada, iniciando-se pelo tempo de estabilização de potencial de circuito aberto (E_{OC}) durante imersão do eletrodo m-GEC em solução de $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ preparada em solução KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Este parâmetro é importante para que o potencial de circuito aberto esteja estável durante a medida. Se o E_{OC} variar durante a medida analítica, os dados obtidos perdem a confiabilidade, uma vez que estão relacionados à diferentes estágios do sistema, configurando medidas distintas, não representativas do sistema em análise, no qual o pressuposto de estabilidade já não estará mais sendo obedecido. Os resultados são apresentados na Figura 79.

Figura 79: Variação do potencial de circuito aberto do eletrodo m-GEC ao longo de 1 hora. Medida realizada em solução de $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ preparada em solução KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.



Fonte: Próprio autor.

Foi verificado que ao longo de 1 hora de experimento, o E_{OC} variou em 10 mV (0,010 V) até o ponto final da medida. Dessa forma pode-se concluir que não ocorrem

Capítulo 2: Resultados e Discussão

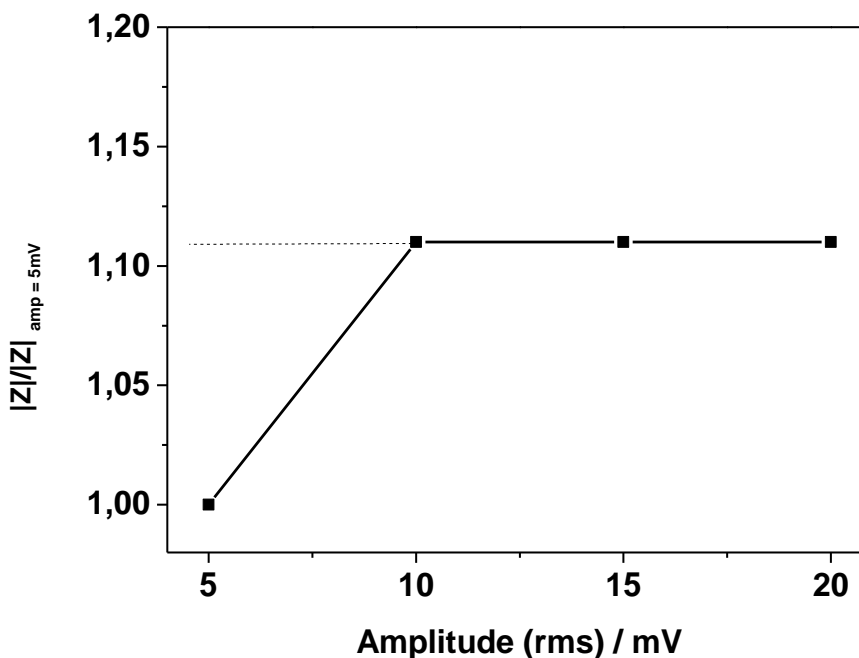
variações significantes de potencial neste estudo, uma vez que após este tempo a variação de potencial que ocorre até o término da medida é inferior a 10 mV. Dessa maneira, tempo de estabilização de 120 segundos foi adotado nas medidas posteriores.

Outra variável que requer ser avaliada em uma medida de EIS é a amplitude de perturbação do potencial uma vez que a obediência ao princípio da linearidade depende da amplitude da onda senoidal aplicada. Esta deve possuir um valor tal que esteja flutuando entre o desejo de minimizar uma resposta não-linear, pelo uso de uma pequena amplitude, e minimizar o ruído, pelo uso de uma amplitude grande de perturbação. Portanto, a escolha de uma amplitude apropriada é sempre muito importante para garantir a melhor resposta do sistema em cada frequência aplicada e isso deve ser demonstrado experimentalmente (FERREIRA, A. A. P.; FUGIVARA, C. S.; YAMANAKA, H.; BENEDETTI, V., 2011; ROCHA, 2014).

Partindo desse princípio avaliou-se o sistema está ou não sob o regime de linearidade, são realizadas diversas medidas de impedância, aplicando diferentes valores de amplitudes: 5, 10, 15 e 20 (rms) mV, mantendo-se fixo os outros parâmetros. Posteriormente, todos os valores de módulo da impedância $|Z|$ são obtidos a partir dos diagramas para uma certa frequência fixada. Há a possibilidade e liberdade de ser escolhido um ou mais valores de frequência, entretanto é de grande valia examinar a região de baixas frequências, já que é a região mais propensa à resposta não-linear. Neste estudo foi escolhida a frequência 50 mHz.

Capítulo 2: Resultados e Discussão

Figura 80: Valores da razão de $|Z|/|Z|_{5\text{mV}}$ vs amplitude (rms) para o eletrodo m-GEC. Medidas realizadas em solução $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ preparada em solução KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. A frequência analisada foi 50 mHz.



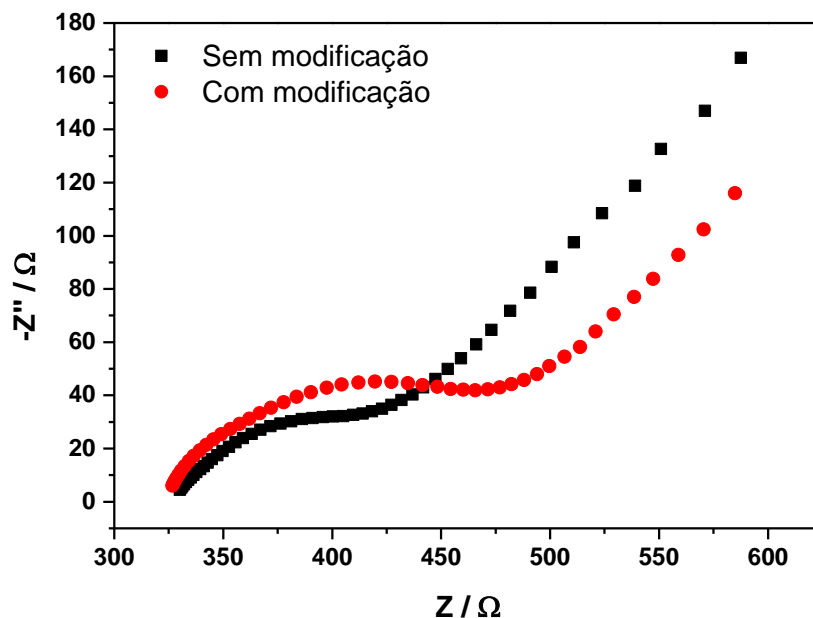
Fonte: Próprio autor.

Pode-se observar que o sistema não responde linearmente em amplitudes (rms) inferiores a 10 mV na frequência de 50 mHz. Ademais, pode-se inferir que não há impedimento em se utilizar as amplitudes 10, 15 e 20 neste sistema, pois todas responderam linearmente. Assim, adotou-se a amplitude de 10 mV (rms) como amplitude otimizada. Outro parâmetro analisado foi o intervalo de frequência. Todas as medidas realizadas até este ponto do projeto, foram realizadas no intervalo de frequência de 50 kHz a 10 mHz, que pode ser considerado um amplo intervalo, abrangendo frequências altas, intermediárias e baixas. Isso quer dizer que o sistema está sendo perturbado em frequências representativas que permitem visualizar diferentes etapas dos processos eletroquímicos que ocorrem na superfície do eletrodo em estudo.

4.2.3.2. Otimização das etapas de construção do imunossensor

A Figura 81 apresenta a medida exploratória de impedância para o eletrodo antes e após modificação com as partículas magnéticas (MPs) imobilizadas com o anticorpo α -*L. pneumophila*, em concentração de $1,0 \times 10^6$ mps mL⁻¹. em 5×10^{-3} mol L⁻¹ Fe (CN)₆^{3-/4-} em solução de KCl 0,5 mol L⁻¹. O gráfico de Nyquist mostra que após adição dos anticorpos sobre a superfície do eletrodo, o sistema fica mais resistivo, refletindo o aumento da constante de resistência de carga do sistema.

Figura 81: Medidas obtidas com eletrodo m-GEC sem modificação e após a modificação com $1,0 \times 10^4$ mps mL⁻¹. Medidas realizadas em solução Fe (CN)₆^{3-/4-} 5×10^{-3} mol L⁻¹ preparada em solução KCl 0,5 mol L⁻¹.

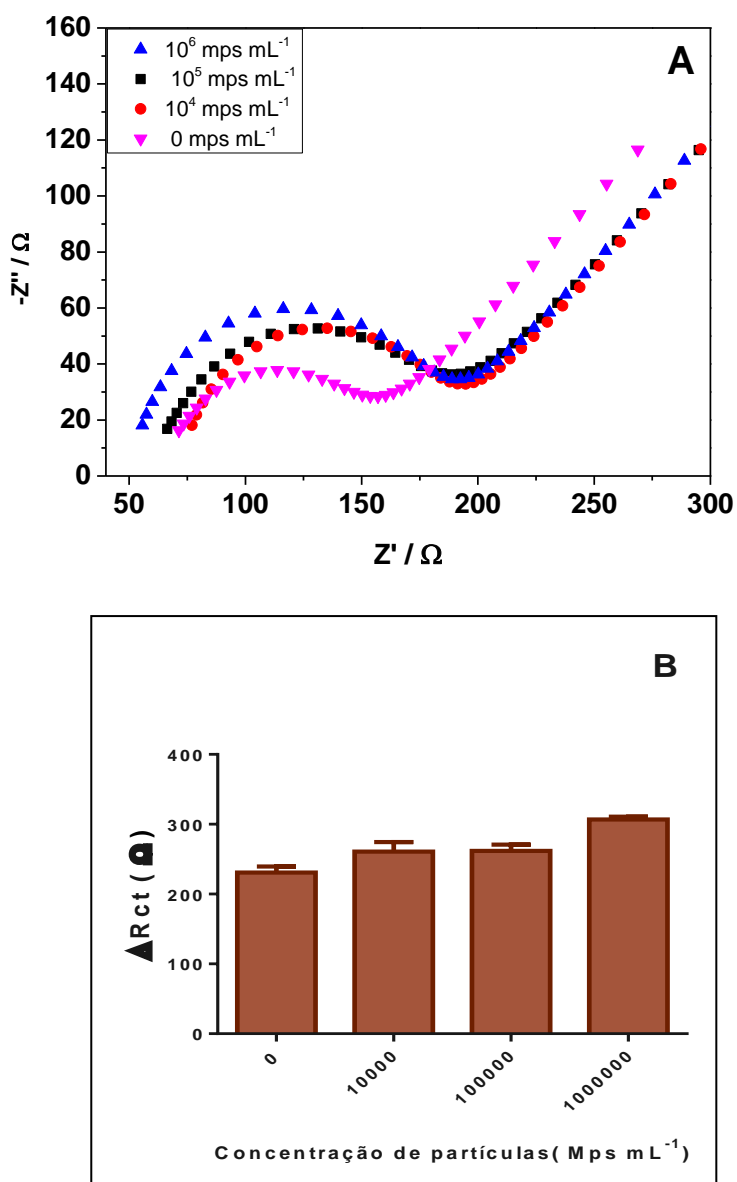


Fonte: Próprio autor.

O efeito da concentração de MPs 450 nm modificadas com o anticorpo secundário foi investigado após adição em concentrações de $1,0 \times 10^4$ mps mL⁻¹, $1,0 \times 10^5$ mps mL⁻¹ e $1,0 \times 10^6$ mps mL⁻¹ sobre a superfície do eletrodo.

Capítulo 2: Resultados e Discussão

Figura 82: Gráficos de Niquist (A) e variação de R_{ct} proveniente da otimização da concentração de partículas magnéticas modificadas com anticorpo monoclonal anti-*Legionella*. Medidas realizadas em solução $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-} 5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ preparada em solução de $\text{KCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$.



Fonte: Próprio autor.

Observa-se um aumento da impedância eletroquímica proporcionalmente ao aumento de partículas sobre o eletrodo. Para as concentrações de 1×10^4 e 1×10^5 mps mL⁻¹ não foi observada uma diferença significativa. Dessa forma escolheu-se a

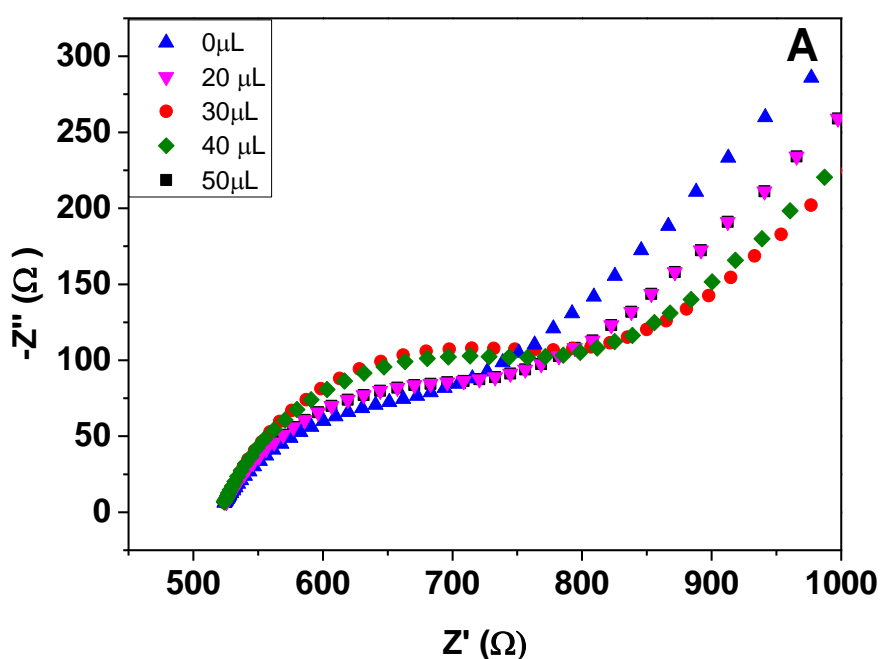
Capítulo 2: Resultados e Discussão

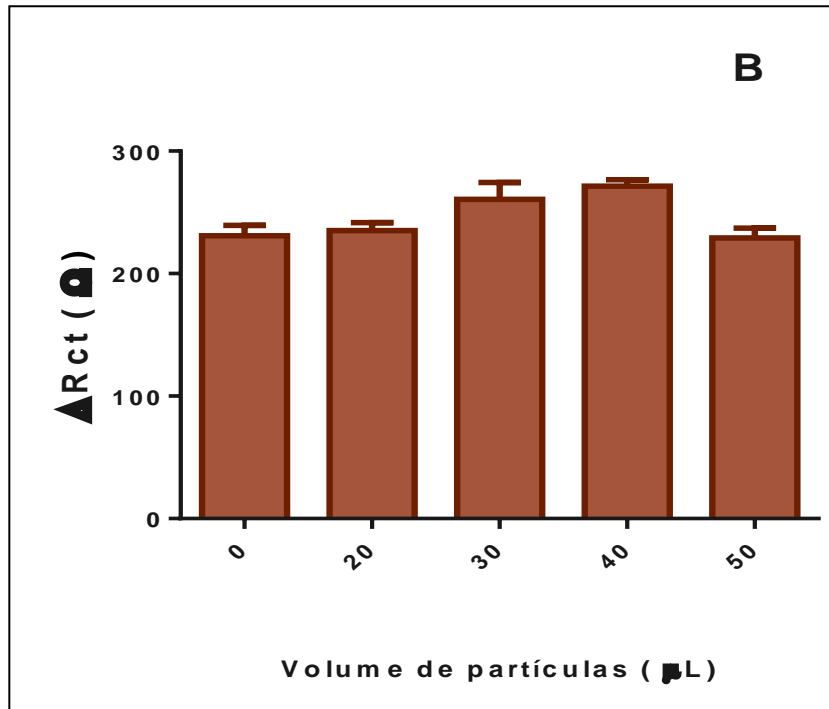
concentração de $1,0 \times 10^4$ mps mL^{-1} de MP para as medidas posteriores, diminuindo a concentração em relação ao método de ELISA.

Outro parâmetro analisado foi o volume de amostra (20 30, 40 e 50 μL) adicionado na superfície do eletrodo de trabalho, uma vez que afeta o número de partículas sobre a superfície do eletrodo.

Entre o volume de 20 μL de amostra adicionados e o branco não há uma diferença significativa no sistema, sendo o valor de ΔR_{ct} muito próximo do branco. Em relação aos volumes de 30 e 40 μL , observa-se um incremento na resistência do sistema, conforme esperado, pois mais material orgânico e resistivo está sendo acoplado ao sistema. Entretanto, quando se adiciona o volume referente a 50 μL , observa-se, contrariamente, uma diminuição da impedância do sistema. Pode-se inferir que neste volume, há uma maior aglomeração de partículas, de modo que estas não se dispersão homogeneamente no eletrodo de trabalho, deixando parte da superfície livre para a ocorrência de eventos eletrônicos. Deste modo, o volume ótimo de partículas para o sistema foi o de 30 μL .

Figura 83: Gráficos de Niquist (A) e variação de ΔR_{ct} proveniente da otimização do volume de partículas magnéticas modificadas com anticorpo monoclonal anti-*Legionella*. Medidas realizadas em solução $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 5×10^{-3} mol L^{-1} preparada em solução KCl 0,5 mol L^{-1} .



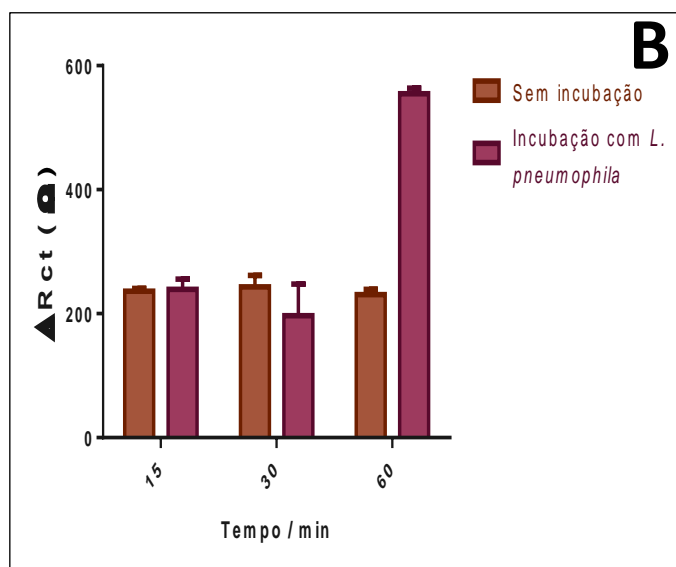
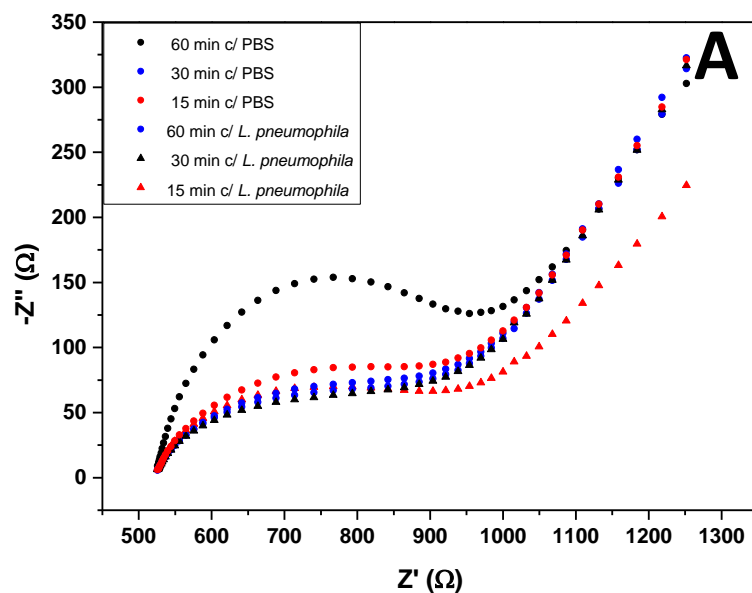


Fonte: Próprio autor.

O efeito do tempo de incubação também foi investigado comparando a resposta impedimétrica para medidas realizadas após 15 minutos, 30 minutos e 60 minutos de reação entre a partícula modificada e a bactéria em concentração de 1×10^{-5} UFC mL⁻¹. Os resultados são mostrados na Figura 84 . Observou-se que o tempo ótimo de 60 minutos propiciou melhor diferença entre os valores de ΔR_{ct} e escolhido nas medidas a seguir. O tempo de incubação ótimo encontrado, corrobora com os ensaios ELISA realizados anteriormente.

Capítulo 2: Resultados e Discussão

Figura 84: Gráficos de Nyquist (A) e variação de ΔR_{ct} (B) proveniente da otimização do volume de partículas magnéticas modificadas com anticorpo monoclonal anti-*Legionella*. Medidas realizadas em solução $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-} 5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ preparada em solução $\text{KCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$.



Fonte: Próprio autor.

Capítulo 2: Resultados e Discussão

Os parâmetros avaliados e otimizados para o desenvolvimento do método foram compilados na Tabela 17.

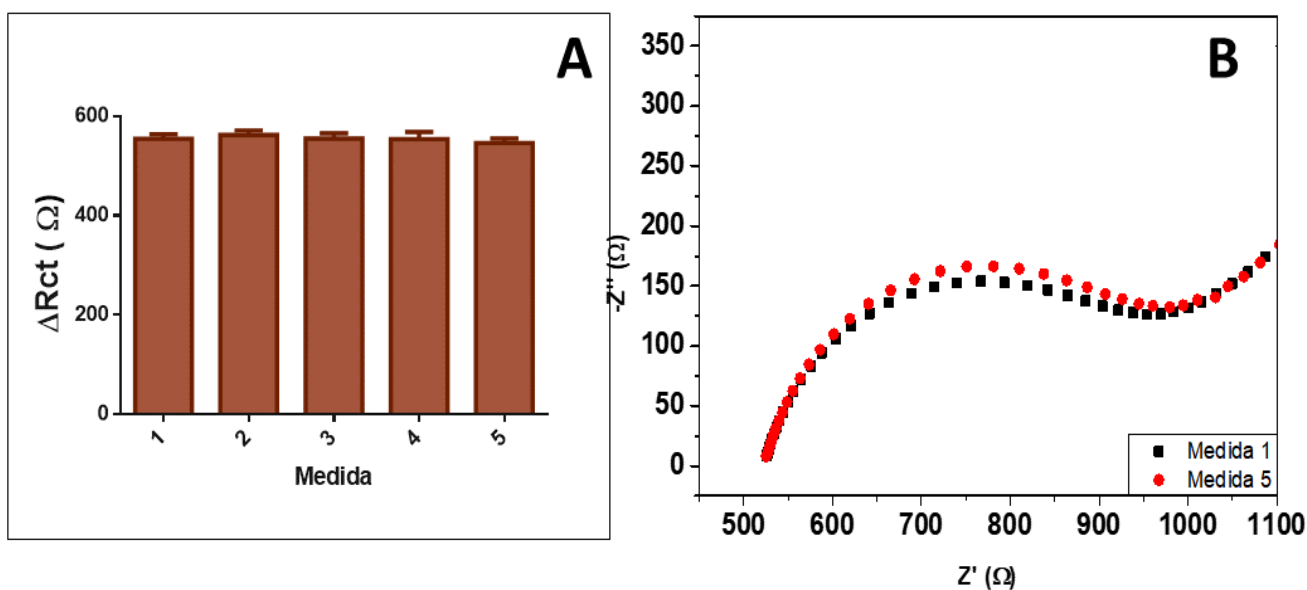
Tabela 17: Parâmetros avaliados e condições otimizadas

Variável	Intervalo estudado	Valor otimizado
Concentração de MP	$1 \times 10^4 - 5 \times 10^6$ mp mL ⁻¹	5×10^4 mp mL ⁻¹
Volume de suspensão de partícula	20 – 50 µL	30µL
Tempo de incubação	15 – 60 min	60 min

Fonte: Próprio autor.

4.2.3.3. Estudo de estabilidade do biossensor impedimétrico após medidas de EIS sucessivas

Figura 85: Valores de ΔR_{ct} obtidos em cada medida (A). Diagramas de Nyquist referentes à medida Medidas realizadas em solução $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 5×10^{-3} mol L⁻¹ preparada em solução KCl 0,5 mol L⁻¹ (B).



Fonte: Próprio autor.

A estabilidade da resposta foi analisada comparando as respostas após 5 medidas sucessivas de EIS para a mesma imobilização do anticorpo, usando etapa de enxague entre as medidas e tempo de incubação por 60 minutos em solução tampão PBS 0,1 mol L⁻¹, pH 7,4. O diagrama de Nyquist obtido imediatamente após o término do processo e ao fim do estudo está apresentado na Figura 85B.

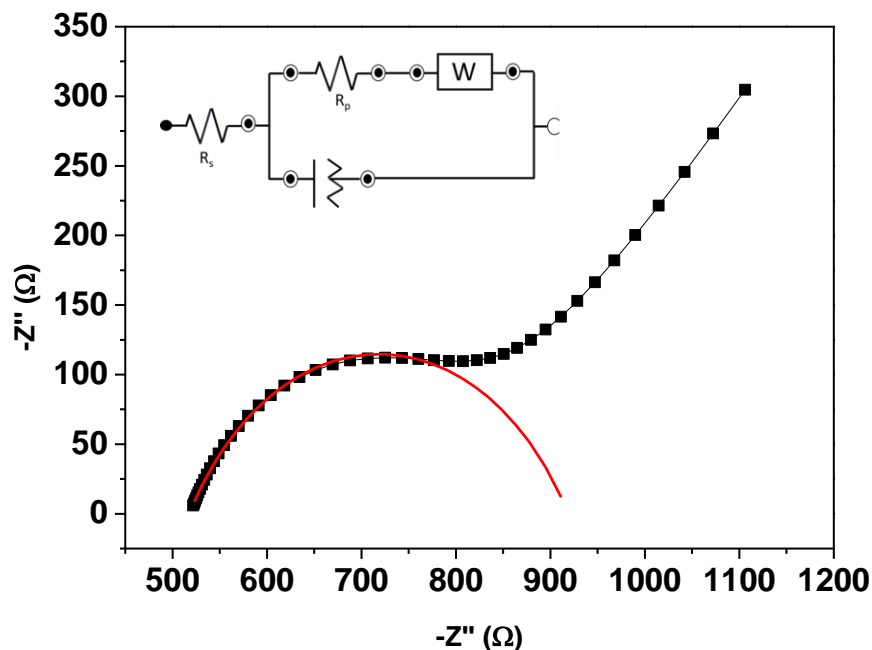
Os valores de R_{ct} obtidos variaram de modo negligenciável (Figura 87A), apresentando um desvio padrão relativo de apenas 1,23% entre as 5 repetições.

4.2.3.4. Determinação do Circuito equivalente

O software utilizado NOVA 2.1 possui uma ferramenta simples para análise de dados de medidas de impedância chamada “*electrochemical circle fit*”. Com tal ferramenta é possível fazer a estimativa dos valores dos parâmetros de interesse a partir de ajustes matemáticos de determinados pontos da porção circular do diagrama de Nyquist, referente a fenômenos de transferência de carga. O circuito equivalente apresentado na Figura 86. Os elementos do circuito são:

- i) R_s (Ohm): Simula o valor da resistência não compensada (solução);
- ii) R_p (Ohm): Simular o valor da resistência de polarização, valor referente a resistência de transferência de carga;
- iii) CPE: Trata-se valor do argumento do elemento de fase constante e n é o valor do expoente do elemento de fase constante. O CPE substitui o capacitor no circuito equivalente. Nas situações em que o CPE se encontra em paralelo com R_p para formar um semicírculo “clássico”, o valor da capacitância pode ser estimado e corresponderá ao valor do CPE na frequência máxima do eixo imaginário
- iv) Impedância de Warburg: Já mencionada anteriormente, responsável por simular características do sistema experimental, como processos faradaicos, de adsorção e reações secundárias na superfície do eletrodo (DANIELS; POURMAND, 2007; TRIBOLLET, 2008).

Figura 86: Circuito equivalente utilizado na ferramenta de análise “electrochemical circle fit”.



Fonte: Próprio autor.

Um parâmetro importante a ser avaliado é o valor de χ^2 . Valores de χ^2 altos sugerem que a qualidade dos dados é baixa. Valores baixos, por sua vez, geralmente indicam um bom ajuste. O fator determinante para pré-dizer se o valor é alto ou baixo será o número de pontos e de seus valores. Como regra geral, valores inferiores a 10^{-6} indicam um excelente ajuste, valores entre 10^{-6} e 10^{-5} ajustes bons, valores entre 10^{-5} e 10^{-4} ajustes que estão na margem do aceitável, e valores acima disso indicam ajustes ruins.

Assim sendo, os resultados obtidos nessa caracterização indicam que os dados obtidos estão bons, já que foram obtidos valores de χ^2 ao redor de 10^{-5} .

4.2.3.5. Construção da Curva analítica

A curva analítica para *L. pneumophila* foi construída no intervalo de $1,0 \times 10^2$ a $1,0 \times 10^7$ UFC mL⁻¹ usando os parâmetros otimizados anteriormente e mostrada na Figura 89. Uma relação linear entre ΔR_{ct} e a concentração de antígeno *L. pneumophilla* foi observada no intervalo de 1×10^2 a 1×10^5 UFC mL⁻¹, com saturação em

Capítulo 2: Resultados e Discussão

concentrações mais elevadas da bactéria. A relação linear segue a seguinte equação: $\Delta Rct = 217,51 + [L. pneumophila]0,56$, $R= 0,9973/ n=4$.

Os parâmetros correspondentes a um limite de detecção e quantificação calculados pela utilizando-se o método estatístico: $(3xSD/b)$ e $(10xSD/b)$, em que SD representa o desvio padrão de dez medidas do branco obtidas e b a inclinação da reta obtida para a curva analítica. Os valores obtidos foram LD mostraram valores iguais a LD= 59,91 UFC mL⁻¹e LQ =183,03 UFC mL⁻¹. Os valores obtidos são baixos o suficiente para a viabilidade de análise de *L. pneumophila* em amostras de água tratada.

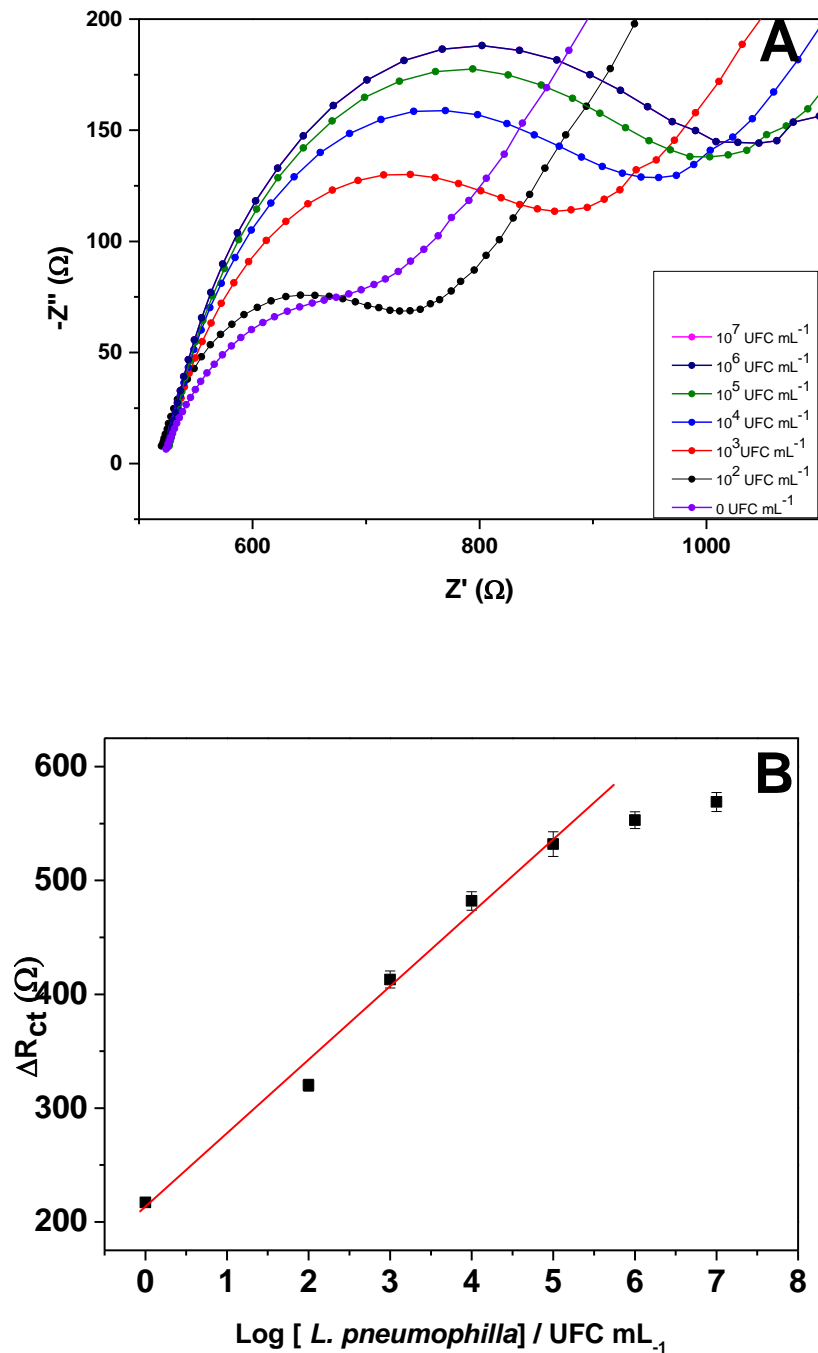
Os desvios padrão relativo das triplicatas registradas para cada concentração de *L. pneumophila*, ficaram todos abaixo de 10%, demonstrando que o imunossensor também apresenta boa repetibilidade.

Dessa forma, pode-se concluir que o biossensor teve um desempenho bem satisfatório para a finalidade proposta, desempenho este bastante superior quando comparado aos resultados obtidos com os ensaios ELISA. Adicionalmente, um gasto menor de partículas modificadas juntamente com a não necessidade de um anticorpo secundário tornam o método mais viável e requer um tempo muito menor de análise.

As interações estabelecidas entre o antígeno e o anticorpo são consideradas bastante fortes, possuindo valores de constante de dissociação relatadas no intervalo de concentração em ordem nanomolar a micromolar. Partindo dessa premissa, poder-se-ia esperar que a camada de anticorpo na superfície do eletrodo se torne saturada até mesmo em concentrações relativamente baixas de antígeno. Isto foi verificado experimentalmente pelo platô que pode ser observado na curva analítica construída, vide Figura 87.

Capítulo 2: Resultados e Discussão

Figura 87: Gráficos de Nyquist (A) e Gráfico de ΔR_{ct} em função da concentração de *L. pneumophila* expressa em escala logarítmica. As barras de erro mostram o desvio padrão obtido a partir da triplicata dos dados dos experimentos.



Fonte: Próprio autor.

Capítulo 2: Resultados e Discussão

4.2.3.6. Aplicação do imunossensor em determinação de legionella em amostra de água

O desempenho do imunossensor construído foi avaliado para determinação de *Legionella* em amostra de água de torneira, coletada do Instituto de Química da Universidade Paulista “Julio de Mesquita Filho”, localizado em Araraquara – SP. e dialisato utilizado em tratamento de hemodiálise, coletado no Centro de Tratamento Dialítico da cidade de Araraquara – SP, Brasil.

Para isto o imunossensor foi aplicado em amostras reais coletadas como descrito na parte experimental. Não foi verificada diferença significativa entre os valores de constante de transferência de carga obtidos entre a medida do eletrodo antes e após a incubação por 60 minutos na amostra, o que indicou não haver presença de *L. pneumophila* em ambas as amostras estudadas. Assim, os resultados não apontaram nenhuma detecção da bactéria.

Deste modo a seguir, a análise foi realizada tanto para a água de torneira quanto o dialisato contaminados propositalmente com concentrações de 1×10^3 , 1×10^4 e 1×10^5 UFC mL⁻¹ de *L. pneumophila*. As amostras foram então diluídas na proporção de 1:2 (v/v) em solução tampão PBS 0,1 mol L⁻¹, pH 7,5. Utilizando as condições experimentais previamente otimizadas (tempo de incubação de 1 h, 30 µL de Mps a uma concentração de $1,0 \times 10^4$ mps mL⁻¹, construiu-se a recuperação da concentração usando o par redox Fe(CN)₆^{3-/4-} como sonda eletroquímica a uma concentração de 5×10^{-3} mol L⁻¹ preparada em solução KCl 0,5 mol L⁻¹. Os respectivos valores de concentração de *L. pneumophila* encontrados em cada amostra estão apresentados na Tabela 18.

A recuperação entre a concentração da bactéria adicionada e aquela determinada pelo método proposto em ambas as amostras de água de torneira e dialisato mostraram valores entre 81 a 97 %.

Capítulo 2: Resultados e Discussão

Tabela 18: Valores adicionados e recuperados de *L. pneumophila* em amostras de água de torneira e dialisato

	Valor adicionado (UFC mL ⁻¹)	Valor encontrado (UFC mL ⁻¹)	Recuperação %
Água de Torneira	1 x 10 ³	9,3 x 10 ²	93%
	1 x 10 ⁴	8,1 x 10 ³	81%
	1 x 10 ⁵	9,7 x 10 ⁴	97%
Dialisato	1 x 10 ³	8,5 x 10 ²	85%
	1 x 10 ⁴	9,6 x 10 ³	96%
	1 x 10 ⁵	9,5 x 10 ⁴	95%

Fonte: Próprio autor.

Deste modo, é possível concluir que o magneto-imunossensor eletroquímico usando Espectroscopia de impedância eletroquímica apresenta confiabilidade, repetibilidade e sensibilidade compatível com o requerido para análise de *legionella* em amostras de dialisato usado em processo de hemodiálise. Embora a análise de interferentes não foi realizada no período, sabe-se que o anticorpo de captura utilizado reage especificamente com *L. pneumophila* por se tratar de um anticorpo monoclonal. Todavia, será realizado para publicações posteriores.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A detecção de *L. pneumophila* por métodos baseados em imunoenaios permitiu a detecção da mesma em amostras ambientais e hospitalares. Cabe ressaltar que o método em questão poderia ser estendido a detecção de outras endobactérias do mesmo gênero, uma vez que se os anticorpos escolhidos reajam de maneira específica com seu respectivo antígeno. Para os três métodos desenvolvidos, parâmetros experimentais para construção do eletrodo foram otimizados com o objetivo de obter a melhor construção de curva analítica.

A comparação entre os ensaios de ELISA e magneto-ELISA observou-se que a construção do magneto-ELISA foi alcançada um maior desempenho. O limite de detecção foi igual a $1,3 \times 10^4$ UFC mL⁻¹ e faixa linear de trabalho entre $1,0 \times 10^3$ a $1,0 \times 10^7$ UFC mL⁻¹ de *L. pneumophila*, e limite de detecção de 59,91 UFC mL⁻¹ para o magneto-ELISA. Para o método de ELISA o limite de detecção foi 100 vezes menor e uma faixa de trabalho em torno de $1,0 \times 10^2$ a $1,0 \times 10^5$ UFC mL⁻¹.

Resultados mais satisfatórios entre todos os biossensores construídos foram obtidos utilizando-se o imunossensor eletroquímico. O biossensor permitiu uma ampla faixa linear para detecção na bactéria, quando comparado aos demais biossensores. Adicionalmente, o biossensor eletroquímico, tornou o método mais barato e mais rápido, sendo mais conveniente para análise em um ambiente hospitalar. Ao ser aplicado o imunossensor em amostras de água de torneira, este possibilitou uma recuperação adequada e detectabilidade em níveis compatíveis com o requerido pela ANVISA, onde o nível máximo permitido de bactérias é de $2,0 \times 10^2$ UFC/g mostrando a viabilidade do método na aplicação em amostras reais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D. Fungal cell wall chitinases and glucanases. **Microbiology (Reading, England)**, v. 150, p. 2029–2035, 1 ago. 2004.

AFONSO, A. S. Desenvolvimento de imunossensores piezelétrico e eletroquímico para detecção de amostras de interesse agrônômico e de saúde. p. 1–105, 2012.

AGAR, J. W. M. et al. Reusing Dialysis Wastewater : The Elephant in the Room
Reusing Dialysis Wastewater : The Elephant in the Room. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 6386, n. 08, p. 10–14, 2008.

AHN, K. S. et al. The effect of thermal annealing on photoelectrochemical responses of WO₃ thin films. **Journal of Applied Physics**, v. 101, n. 9, p. 1–5, 2007.

ALENCAR, D. DE S. O. DE et al. Candidemia por especies del complejo Candida parapsilosis en un hospital de Brasil: características clínicas y perfil de sensibilidad a los antifúngicos. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 34, n. 2, p. 106–108, 2017.

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W. & BLACKWELL, M. 1996. **Introductory Mycology**. 4th ed ed. New Work: [s.n.].

AMBRÓSIO, L. A. F. DE M. Legionella: Transmissão e Controlo. 2017.

ANDREOZZI, R. et al. Advanced oxidation processes (AOP) for water purification and recovery. **Catalysis Today**, v. 53, n. 1, p. 51–59, 1999.

ANIK, M.; CANSIZOGLU, T. Dissolution kinetics of WO₃ in acidic solutions. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 36, p. 603–608, 2006.

ANJOS, C. **DESENVOLVIMENTO DE IMUNOENSAIO ELETROQUÍMICO PARA DETECÇÃO DE BIOMARCADORES PROTEICOS UTILIZANDO PARTÍCULAS MAGNÉTICAS E ARRANJO DE ELETRODOS DESCARTÁVEIS PARA O DIAGNÓSTICO DE CÂNCER DE PRÓSTATA**. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 2019.

ARRAES, A. C. P. **Detecção da diversidade molecular de Candida spp. isoladas de**

Referências Bibliográficas

- UTI neonatal. . Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - .** [s.l.] Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.
- ASHFORD, B. K. Certain Conditions of the Gastro-Intestinal Tract in Porto Rico and their Relation to Tropical Sprue. **American Journal of Tropical Medicine**, v. 8, n. 6, p. 507- 538 pp., 1928.
- BAE, Y. M. et al. Immunosensor for Detection of Yersinia enterocolitica Based on Imaging Ellipsometry. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 6, p. 1799–1803, 2004.
- BARADKAR, V. et al. Meningitis Caused by Candida parapsilosis in HIV Infected Patient. **Bombay Hospital Journal**, v. 50, n. 1, p. 94–95, 2008.
- BARBEDO, L. .; SGARBI, D. B. G. Candidiase. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 22, n. 1, p. 22–38, 2010.
- BARTLETT, P. N. Electrodeposition of Nanostructured Films Using Self-Organizing Templates. **Electrochemical Society Interface**, p. 28–33, 2004.
- BESSEGATO, G. G. et al. Enhanced photoabsorption properties of composites of Ti/TiO₂ nanotubes decorated by Sb₂S₃ and improvement of degradation of hair dye. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 276, p. 96–103, fev. 2014.
- BESSEGATO, G. G. et al. Achievements and Trends in Photoelectrocatalysis: from Environmental to Energy Applications. **Electrocatalysis**, v. 6, n. 5, p. 415–441, 2015.
- BESSEGATO, G. G. **Eletrodos de nanotubos de TiO₂ modificados com B e Sb₂S₃ e desenvolvimento de novos métodos de tratamento para corantes e efluente de tintura de cabelo usando fotoeletrocatalise e combinação com ozonização.** [s.l.] Universidade Estadual Paulista Julio de Mesaquita Filho, 2017.
- BESSEGATO, G. G.; GUARALDO, T. T.; ZANONI, M. V. B. Enhancement of Photoelectrocatalysis Efficiency by Using Nanostructured Electrodes. In: **Modern Electrochemical Methods in Nano, Surface and Corrosion Science**. Rijeka: Intech, 2014. p. 271–319.
- BIGALL, N. C. et al. Fungal templates for noble-metal nanoparticles and their

Referências Bibliográficas

application in catalysis. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 47, n. 41, p. 7876–7879, 2008.

BOZORG, A.; GATES, I. D.; SEN, A. Impact of biofilm on bacterial transport and deposition in porous media. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 183, p. 109–120, 2015.

BRADLEY, B. T.; BRYAN, A. Emerging respiratory infections: The infectious disease pathology of SARS, MERS, pandemic influenza, and Legionella. **Seminars in Diagnostic Pathology**, v. 36, n. 3, p. 152–159, 2019.

BRANDT, M.; LOCKHART, S.; WARNOCK, D. Laboratory Aspects of Medical Mycology. In: **Essentials of Clinical Mycology: Second Edition**. [s.l.: s.n.]. p. 3–25.

BRUGNERA, M. F. et al. Inactivation and disposal of by-products from *Mycobacterium smegmatis* by photoelectrocatalytic oxidation using Ti/TiO₂-Ag nanotube electrodes. **Electrochimica Acta**, v. 85, p. 33–41, 2012.

BRUGNERA, M. F. **MÉTODOS ELETROANALÍTICOS E CROMATOGRÁFICOS APLICADOS NA ANÁLISE DE MICOBACTÉRIAS E DESINFECÇÃO FOTOELETROCATALÍTICA DE MICOBACTÉRIAS E CÂNDIDAS UTILIZANDO ELETRODOS DE NANOTUBOS DE Ti/TiO₂ E Ti/TiO₂-Ag**. [s.l.] Universidade Estadual Julio de Mesquita Filho, 2013.

BRUGNERA, M. F. et al. A photoelectrocatalytic process that disinfects water contaminated with *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium avium*. **Water Research**, v. 47, n. 17, p. 6596–6605, 2013a.

BRUGNERA, M. F. et al. A photoelectrocatalytic process that disinfects water contaminated with *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium avium*. **Water research**, v. 47, n. 17, p. 6596–605, nov. 2013b.

BRUGNERA, M. F. et al. Ti/TiO₂ nanotubes enhance *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium abscessus* inactivation in water. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 89, n. 11, p. 1686–1696, nov. 2014.

BUCH, V. R.; CHAWLA, A. K.; RAWAL, S. K. Review on electrochromic property for WO₃ thin films using different deposition techniques. **Materials Today**:

Referências Bibliográficas

Proceedings, v. 3, n. 6, p. 1429–1437, 2016.

BURILLO, A.; PEDRO-BOTET, M.; BOUZA, E. Microbiology and Epidemiology of Legionnaire's Disease. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 31, p. 7–27, 1 mar. 2017.

BUTTERFIELD, I. M. et al. Water Disinfection using a immobilised Titanium Dioxide film in a photochemical reactor with electric field enhancement. **Water Research**, v. 31, n. 3, p. 675–677, 1997.

BYRNE, J. A.; EGGINS, B. R. Photoelectrochemistry of oxalate on particulate TiO₂ electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 457, n. July, p. 61–72, 1998.

CAICEDO, C. et al. Legionella occurrence in municipal and industrial wastewater treatment plants and risks of reclaimed wastewater reuse: Review. **Water Research**, v. 149, p. 21–34, 2019.

CAPPELLI, G.; TETTA, C.; CANAUD, B. Is biofilm a cause of silent chronic inflammation in haemodialysis patients? A fascinating working hypothesis. **Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 20, p. 266–270, 1 mar. 2005.

CARDOSO, J. C.; BESSEGATO, G. G.; ZANONI, M. V. B. Efficiency comparison of ozonation, photolysis, photocatalysis and photoelectrocatalysis methods in real textile wastewater decolorization. **Water Research**, v. 98, p. 39–46, 2016.

CARDOSO, S. J. Desenvolvimento de ensaios imunoenzimáticos do tipo ELISA para pesquisa de Legionella pneumophila em suporte de papel utilizando a tecnologia Lab-on-Paper. p. 85, 2016.

CARNEIRO, LUIZ C. ; JUNQUEIRA, L. . **BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**. 8ª Edição ed. Rio de Janeiro: [s.n.].

CASTILHO, M. DE S. et al. Magneto immunoassays for Plasmodium falciparum histidine-rich protein 2 related to malaria based on magnetic nanoparticles. **Analytical chemistry**, v. 83, n. 14, p. 5570–5577, jul. 2011.

Referências Bibliográficas

- CHAMBERLAIN, A. H. L. The role of adsorbed layers in bacterial adhesion. In: PUBLISHERS, A. (Ed.). . **Biofilms – Science and Technology**. [s.l: s.n.]. p. 59–67.
- CHANG, H.-S. et al. The methods of identification, analysis, and removal of endocrine disrupting compounds (EDCs) in water. **Journal of Hazardous Materials**, v. 172, n. 1, p. 1–12, 2009.
- CHO, M. et al. Linear correlation between inactivation of E. coli and OH radical concentration in TiO₂ photocatalytic disinfection. **Water Research**, v. 38, n. 4, p. 1069–1077, 2004.
- CHRISTENSEN, P. A. et al. Photoelectrocatalytic and photocatalytic disinfection of E. coli suspensions by titanium dioxide. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 41, n. 4, p. 371–386, 2003.
- CIRILLO, J. D.; FALKOW, S.; TOMPKINS, L. S. Growth of Legionella pneumophila in Acanthamoeba castellanii enhances invasion. **Infection and immunity**, v. 62, n. 8, p. 3254–3261, ago. 1994.
- CLARK, L. C. J.; LYONS, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 102, p. 29–45, out. 1962.
- CLARK, T. A. et al. Epidemiologic and molecular characterization of an outbreak of Candida parapsilosis bloodstream infections in a community hospital. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 10, p. 4468–4472, out. 2004.
- COLTON, R. J.; GUZMAN, A. M.; RABALAIS, J. W. Electrochromism in some thin-film transition-metal oxides characterized by x-ray electron spectroscopy. **Journal of Applied Physics**, v. 49, n. 1, p. 409–416, 1978.
- COSTERTON, J. W.; LAPPIN-SCOTT, H. M. No Title. In: [s.l: s.n.].
- CRISTEA, C. et al. Immunosensors. [s.d.].
- DANIELS, J. S.; POURMAND, N. Label-Free Impedance Biosensors: Opportunities and Challenges. **Electroanalysis**, v. 19, n. 12, p. 1239–1257, maio 2007.
- DEACON, J. W. **Fungal Biology**. 4th. ed. Orford: Blackwell Publishing, 2006.

Referências Bibliográficas

- DÍAZ-FLORES, Á. et al. Comparing methods of determining *Legionella* spp. in complex water matrices. **BMC microbiology**, v. 15, p. 91, abr. 2015.
- DITOMMASO, S. et al. *Legionella* in water samples: How can you interpret the results obtained by quantitative PCR? **Molecular and Cellular Probes**, v. 29, n. 1, p. 7–12, 2015.
- EGERTON, T. A. Does photoelectrocatalysis by TiO₂ work? **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 86, n. 8, p. 1024–1031, ago. 2011.
- EGERTON, T. A.; KOSA, S. A M.; CHRISTENSEN, P. A. Photoelectrocatalytic disinfection of *E. coli* suspensions by iron doped TiO₂. **Physical chemistry chemical physics : PCCP**, v. 8, n. 3, p. 398–406, 2006.
- FERREIRA, A. A. P.; FUGIVARA, C. S.; YAMANAKA, H.; BENEDETTI, A.; V. Preparation and characterization of immunosensors for disease diagnosis. In: ACCESS PUBLISHER (Ed.). . **Biosensors for health, environment and biosecurity**. [s.l.] Rijeka: Intech Open, 2011. p. 183–214.
- FERREIRA, A. P.; CUNHA, C. D. L. N. DA. Pesquisa de *Legionella pneumophila* nas redes de abastecimento hospitalar. **Reciis**, v. 1, n. 2, p. 208–214, 2007a.
- FERREIRA, A. P.; CUNHA, C. D. L. N. DA. Pesquisa de *Legionella pneumophila* nas redes de abastecimento hospitalar. **Reciis**, v. 1, n. 2, p. 208–214, 2007b.
- FINKLEA, H. O. **Semiconductor electrodes**. New York: [s.n.].
- FRAGA, L. E. et al. Evaluation of the photoelectrocatalytic method for oxidizing chloride and simultaneous removal of microcystin toxins in surface waters. **Electrochimica Acta**, v. 54, n. 7, p. 2069–2076, 2009.
- FRAGA, L. E. et al. Semi-permanent hair dyes degradation at W/WO₃ photoanode under controlled current density assisted by visible light. **Journal of Advanced Oxidation Technologies**, v. 20, n. 2, 2017.
- FRAGA, L. E.; ZANONI, M. V. B. Nanoporous of W/WO₃ thin film electrode grown by electrochemical anodization applied in the photoelectrocatalytic oxidation of the basic red 51 used in hair dye. **Journal of the Brazilian Chemical**

Referências Bibliográficas

Society, v. 22, n. 4, p. 718–725, 2011.

FRANCO, D. L. Programa de Pós-Graduação em Química – Doutorado Instituto de Química - UFU Desenvolvimento de biossensores eletroquímicos , utilizando de câncer de próstata e hepatite C. [s.d.].

FRANK GESSLER, KATRIN HAMPE , MICHAELA SCHMIDT, H. B.

Immunomagnetic beads assay for the detection of botulinum neurotoxin types C and D.

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, v. 53, n. 3, p. 225–232, 2006.

GAN, L. et al. Silver nanoparticle-functionalized polydopamine nanotubes for highly sensitive nanocomposite electrode sensors. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 861, p. 113961, 2020.

GAUTAM, P.; KUMAR, S.; LOKHANDWALA, S. Advanced oxidation processes for treatment of leachate from hazardous waste landfill: A critical review. **Journal of Cleaner Production**, v. 237, p. 117639, 2019.

GIOIA, M. L. DI et al. SPE-GC-MS Analysis of Chloroform in Drinking Water. **Chromatographia**, v. 60, n. 5–6, p. 319–322, 2004.

GLAZE, W. H.; KANG, J. W.; CHAPIN, D. H. The chemistry of water treatment processes involving ozone, hydrogen peroxide and ultraviolet radiation. **Ozone: Science & Engineering**, v. 9, n. 4, p. 335–352, 1987.

GOLDBLUM, E.S.; REED, W. Host defences and immunologic alterations associated with chronic hemodialysis. **Annals of Internal Medicine**, v. 93, n. 4, p. 597–613, 1980.

GONZÁLEZ-BORRERO, P. P. et al. Optical band-gap determination of nanostructured WO₃ film. **Applied Physics Letters**, v. 96, n. 6, p. 4–6, 2010.

GRANADO, R. C. et al. Effluent Volume in Continuous Renal Replacement Therapy Overestimates the Delivered Dose of Dialysis. v. i, n. February 1999, p. 467–475, 2011.

GUARALDO, T. T. et al. On the application of nanostructured electrodes prepared by Ti/TiO₂/WO₃ “ template” : A case study of removing toxicity of indigo using visible irradiation. **Chemosphere**, v. 91, n. 5, p. 586–593, 2013.

GUARALDO, T. T. et al. Hydrogen production and simultaneous photoelectrocatalytic

Referências Bibliográficas

pollutant oxidation using a TiO₂/WO₃ nanostructured photoanode under visible light irradiation. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 765, p. 188–196, 2016.

GUARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGEL, A. M. Developments in Fungal Taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 3, p. 454 LP – 500, 1 jul. 1999.

GUTIÉRREZ, F. et al. The influence of age and gender on the population-based incidence of community-acquired pneumonia caused by different microbial pathogens. **Journal of Infection**, v. 53, n. 3, p. 166–174, 2006.

HERVÁS, M.; LÓPEZ, M. Á.; ESCARPA, A. Electrochemical immunoassay using magnetic beads for the determination of zearalenone in baby food: An anticipated analytical tool for food safety. **Analytica Chimica Acta**, v. 653, n. 2, p. 167–172, 2009.

HO, T. D. et al. Ionic liquids in analytical chemistry: Fundamentals, advances, and perspectives. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 1, p. 262–285, 2014.

HUANG, Y. C. et al. Outbreak of *Candida parapsilosis* fungemia in neonatal intensive care units: clinical implications and genotyping analysis. **Infection**, v. 27, n. 2, p. 97–102, 1999.

IBGE. **Pesquisa Nacional de Saneamento Básico, 2008. Ministério do Planejamento Orçamento e Gestão**, 2010.

IBRAHIM, R. et al. Mannans in primary and secondary plant cell walls. **New Zealand Journal of Forestry Science**, v. 39, p. 153–160, 1 jan. 2009.

JUSTINO, C. I. L.; DUARTE, A. C.; ROCHA-SANTOS, T. A. P. Critical overview on the application of sensors and biosensors for clinical analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 85, p. 36–60, 2016.

KECSENOVITY, E. et al. Decoration of ultra-long carbon nanotubes with Cu₂O nanocrystals : a hybrid platform for enhanced. **Journal of Materials Chemistry A**, n. 4, p. 3139–3147, 2016.

KIM, J. Y. U. et al. Efficient treatment of swimming pool water by photoelectrocatalytic ozonation: Inactivation of *Candida parapsilosis* and mineralization of Benzophenone-3 and urea. **Chemical Engineering Journal**, v. 378, n. April, p.

Referências Bibliográficas

122094, 2019.

KIRK, P. et al. **Ainworth and Bisby's Dictionary of the Fungi**. [s.l: s.n.].

KIRSCHNER, A. K. T. Determination of viable legionellae in engineered water systems: Do we find what we are looking for? **Water Research**, v. 93, p. 276–288, 2016.

KLIS, F. M.; BOORSMA, A.; DE GROOT, P. W. J. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 23, n. 3, p. 185–202, 2006.

KRAJINA, B. A. et al. Biotemplated synthesis of inorganic materials: An emerging paradigm for nanomaterial synthesis inspired by nature. **Progress in Materials Science**, v. 91, p. 1–23, 2018.

KÜHN, K. P. et al. Disinfection of surfaces by photocatalytic oxidation with titanium dioxide and UVA light. **Chemosphere**, v. 53, n. 1, p. 71–77, 2003.

LEHNINGER, A. L. **Principles of Biochemistry**. 4th Editio ed. [s.l: s.n.].

LEVIN, A. S. S. et al. An outbreak of nosocomial Legionnaires' disease in a renal transplant unit in São Paulo, Brazil. **Journal of Hospital Infection**, v. 18, n. 3, p. 243–248, 1 jul. 1991.

LI, G. et al. Enhanced visible-light-driven photocatalytic inactivation of *Escherichia coli* using g-C₃N₄/TiO₂ hybrid photocatalyst synthesized using a hydrothermal-calcination approach. **Water research**, v. 86, p. 17–24, dez. 2015.

LIN, C. C. et al. Antimicrobial susceptibility and clinical outcomes of *Candida parapsilosis* bloodstream infections in a tertiary teaching hospital in Northern Taiwan. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 48, n. 5, p. 552–558, 2015.

LIN, Y. S. et al. Disinfection of water distribution systems for *Legionella*. **Seminars in respiratory infections**, v. 13, n. 2, p. 147–159, jun. 1998.

LINSEBIGLER, A. L.; LU, G.; YATES, J. T. Photocatalysis on TiO₂ Surfaces: Principles, Mechanisms, and Selected Results. **Chemical Reviews**, v. 95, n. 3, p. 735–758, 1995.

Referências Bibliográficas

- LÓPEZ, R.; GÓMEZ, R. Band-gap energy estimation from diffuse reflectance measurements on sol–gel and commercial TiO₂: a comparative study. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 61, n. 1, p. 1–7, 2012.
- MACHADO, A. P. S. **Uso de técnicas de detecção rápidas de fungos filamentosos na água**. [s.l.] Universidade do Minho, 2006.
- MACHADO, C. K. et al. **Potential environmental toxicity from hemodialysis effluent** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2014.
- MARCELINO, M. Y. **Desenvolvimento de derivados nitrofuranos antifúngicos para o controle de infecções por Candida spp.** [s.l.: s.n.].
- MARTÍNEZ-HUITLE, C. A.; BRILLAS, E. Decontamination of wastewaters containing synthetic organic dyes by electrochemical methods: A general review. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 87, n. 3–4, p. 105–145, abr. 2009.
- MEDRANO, D. J. A. et al. Candidemia in a Brazilian hospital: The importance of Candida parapsilosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 48, n. 1, p. 17–20, 2006.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria n. 36 de 12 de dezembro de 2011. v. Brasília, 2011.
- MOBED, A. et al. Bioassays: The best alternative for conventional methods in detection of Legionella pneumophila. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 121, p. 1295–1307, 2019.
- MOKHTAR MOHAMED, M.; OSMAN, G.; KHAIROU, K. S. Fabrication of Ag nanoparticles modified TiO₂–CNT heterostructures for enhanced visible light photocatalytic degradation of organic pollutants and bacteria. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 3, n. 3, p. 1847–1859, 2015.
- MOLLAHOSSEINI, A.; ABDELRA SOUL, A.; SHOKER, A. A critical review of recent advances in hemodialysis membranes hemocompatibility and guidelines for future development. **Materials Chemistry and Physics**, v. 248, p. 122911, 2020.
- MONTANARI, L. B. et al. Microbiological contamination of a hemodialysis center

Referências Bibliográficas

water distribution system. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 51, n. 1, p. 37–43, 2009.

MORAWSKA, L. Droplet fate in indoor environments, or can we prevent the spread of infection? **Indoor Air**, v. 16, n. 5, p. 335–347, 2006.

MOURA, S. L. et al. Electrochemical immunosensing of nanovesicles as biomarkers for breast cancer. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 150, p. 111882, 2020.

NOGUEIRA, R. F. P.; JARDIM, W. F. A fotocatalise heterogênea e sua aplicação ambiental. **Química Nova**, v. 21, n. 3, p. 69–72, 1998.

NOSAKA, Y.; NOSAKA, A. Y. Generation and Detection of Reactive Oxygen Species in Photocatalysis. **Chemical Reviews**, v. 117, n. 17, p. 11302–11336, 2017.

NOSEK, J. et al. Biology and genetics of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. **Current Genetics**, v. 55, n. 5, p. 497–509, 2009.

NUCCI, M. et al. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 51, n. 5, p. 561–570, set. 2010.

NYSTRAND, R. Microbiology of water and fluids for hemodialysis. **Journal of Chinese Medical Journal Association**, v. 71, p. 223–229, 2008.

ÖZYILDIZ, F. et al. Antimicrobial activity of TiO₂-coated orthodontic ceramic brackets against *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 15, n. 4, p. 680–685, 2010.

PABLOS, C. et al. Performance of TiO₂ photoanodes toward oxidation of methanol and *E. coli* inactivation in water in a scaled-up photoelectrocatalytic reactor. **Electrochimica Acta**, v. 258, p. 599–606, 2017.

PARAMASIVAM, I. et al. A review of photocatalysis using self-organized TiO₂ nanotubes and other ordered oxide nanostructures. **Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)**, v. 8, n. 20, p. 3073–103, out. 2012.

PARRA, K. **Degradação de tetracilina em meio de urina artificial**. [s.l.] Universidade de São Paulo, São Carlos., 2013.

Referências Bibliográficas

PASCHOAL, F. M. M.; ANDERSON, M. A.; ZANONI, M. V. B. Simultaneous removal of chromium and leather dye from simulated tannery effluent by photoelectrochemistry. **Journal of Hazardous Materials**, v. 166, n. 1, p. 531–7, jul. 2009.

PAYAGALA, T. et al. Trigonal Tricationic Ionic Liquids : A Generation of Gas Chromatographic Stationary Phases. **Analytical chemistry**, v. 81, n. 1, p. 160–173, 2009.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEGEL, N. R. **Microbiology**. 5th. ed. New York: [s.n.].

PEREIRA GOMES, J. C. et al. Legionella pneumophila associada a insuficiência respiratória aguda. Primeiro isolamento no Brasil (1). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 31, n. 6, p. 368–376, 1989.

PERINI, J. A. L. et al. Ag/polydopamine-modified Ti/TiO₂ nanotube arrays: A platform for enhanced CO₂ photoelectroreduction to methanol. **Journal of CO₂ Utilization**, v. 34, p. 596–605, 2019.

PETRIE, B.; BARDEN, R.; KASPRZYK-HORDERN, B. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. **Water research**, v. 72, p. 3–27, set. 2014.

PHILIPPE, C.; BLECH, M. F.; HARTEMANN, P. [Intra-amoebal development of Legionella pneumophila and the potential role of amoebae in the transmission of Legionnaires' disease]. **Medecine et maladies infectieuses**, v. 36, n. 4, p. 196–200, abr. 2006.

PIRES, R. H. et al. Effectiveness of photoelectrocatalysis treatment for the inactivation of Candida parapsilosis sensu stricto in planktonic cultures and biofilms. **Applied Catalysis A: General**, v. 511, p. 149–155, 2016a.

PIRES, R. H. et al. Effectiveness of photoelectrocatalysis treatment for the inactivation of Candida parapsilosis sensu stricto in planktonic cultures and biofilms. **Applied Catalysis A: General**, v. 511, p. 149–155, fev. 2016b.

Referências Bibliográficas

- PIVIDORI, M. I.; MERKOÇI, A.; ALEGRET, S. Dot-blot amperometric genosensor for detecting a novel determinant of β -lactamase resistance in *Staphylococcus aureus*. **Analyst**, v. 126, n. 9, p. 1551–1557, 2001.
- POSSIN, G. E. A method for forming very small diameter wires. **Review of Scientific Instruments**, v. 41, n. 5, p. 772–774, 1970.
- POSTHUMA-TRUMPIE, G. A.; KORF, J.; VAN AMERONGEN, A. Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, n. 2, p. 569–582, 2009.
- RAJESHWAR, K. Fundamentals of Semiconductor Electrochemistry and Photoelectrochemistry. In: **Encyclopedia of Electrochemistry**. [s.l.] American Cancer Society, 2007.
- RAMANATHAN, K.; DANIELSSON, B. Principles and applications of thermal biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 16, n. 6, p. 417–423, 2001.
- RAO, M. Structure and properties of WO₃ thin films for electrochromic device application. **J. Non-Oxide Glasses**, v. 5, n. 1, p. 1–8, 2013.
- RATHER, R. A.; LO, I. M. C. Photoelectrochemical sewage treatment by a multifunctional g-C₃N₄/Ag/AgCl/BiVO₄ photoanode for the simultaneous degradation of emerging pollutants and hydrogen production, and the disinfection of *E. coli*. **Water Research**, v. 168, p. 115166, 2020.
- REYES, T. J. L. **Sepsis Por Cateter De Hemodialisis : Etiologia Y Resistencia Grado De Médico**. [s.l.] Universidad De Guayaquil Escuela De Medicina Humana, 2016.
- RICCARDI, SANTOS; YAMANAKA, H. IMUNOSENSOR AMPEROMÉTRI. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 316–320, 2002.
- RIGO, F. PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E IMUNOLÓGICA DE LIPOPOLISSACARÍDEOS DE DIFERENTES CEPAS DE *Salmonella enterica* LIPOPOLISSACARÍDEOS DE DIFERENTES CEPAS DE *Salmonella enterica*. 2016.

Referências Bibliográficas

ROCHA, C. Desenvolvimento de imunossensor impedimétrico para detecção do corante disperso Red 1. **Aleph**, p. 110 f. : il.-, 2014.

SANCHES, S. M.; VIEIRA, E.M.; PRADO, E. L.; BENETTI, F. .; TAKAYANAGUI, A. M. M. Estudo da presença da toxina microcistina-LR em água utilizada em clínica de hemodiálise e validação de um método analítico. **Ecletica Química**, v. 32, n. 4, p. 43–48, 2007.

SCHULZ, D. et al. Doença dos Legionários : uma Revisão LEGIONNAIRE ' S DISEASE : A REVIEW. v. 37, n. 4, p. 251–255, 2005.

SCHULZE, J.; SONNENBORN, U. Yeasts in the gut: from commensals to infectious agents. **Deutsches Arzteblatt international**, v. 106, n. 51–52, p. 837–842, dez. 2009.

SELVAKUMAR, R. et al. Recent advances in the synthesis of inorganic nano/microstructures using microbial biotemplates and their applications. **RSC Adv.**, v. 4, n. 94, p. 52156–52169, 2014.

SEPPANEN, O.; FISK, W. Association of ventilation system type with SBS symptoms in office workers. **Indoor air**, v. 12, p. 98–112, 2002.

SHAH, M. P. **Advanced Oxidation Processes for Effluent Treatment Plants**. 1st Edição ed. [s.l: s.n.].

SIAVASH ETEMADINEZHAD, A. A. Spirometric reference values for healthy adults in the Mazandaran province of Iran*. **J Bras Pneumol**, v. 63, n. 2, p. 159–166, 2012.

SILVA, A. T. P. **Infection by Candida Parapsilosis: Multifatorial analysis of an emerging medical problem**. [s.l.] Universidade do Porto, 2012.

SKINNER, N. G.; HALL, E. A. H. The relevance of an equivalent circuit for polyaniline using immittance spectroscopy. **Synthetic Metals**, v. 63, n. 2, p. 133–145, 1994.

SKLÁDAL, P. Piezoelectric quartz crystal sensors applied for bioanalytical assays and characterization of affinity interactions. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 4, p. 491–502, 2003.

SOUZA, B. **Desinfecção de águas contaminadas com Candida parapsilosis**

Referências Bibliográficas

utilizando eletrodos de W/WO₃ em tratamento fotoeletrocatalítico. [s.l.] UNESP, 2015.

SOUZA, B. A. et al. Fast removal of *Candida parapsilosis* from hemodialysis dialysate using ultraviolet or visible light at nanoporous W/WO₃ electrodes. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, n. 4, p. 103104, 2019.

SOUZA, B. C. A. et al. Antifungal Properties of High Efficient W/WO₃ Electrodes Acting under UV-Vis and Visible Light and Chloride Medium. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 28, n. 11, p. 2084–2093, 2017.

STOODLEY, P. et al. Biofilms as Complex Differentiated Communities. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 187–209, 2002.

STOUT J., MUDER RR, MIETZNER S, WAGENER MM, PERRI MB, DEROOS K, GOODRICH D, ARNOLD W, WILLIAMSON T, RUARK O, TREADWAY C, ECKSTEIN EC, MARSHALL D, RAFFERTY ME, SARRO K, PAGE J, JENKINS R, ODA G, SHIMODA KJ, ZERVOS MJ, BITTNER M, CAMHI SL, PANWALKER AP, DON, Y. V. L. S. G. Role of Environmental Surveillance in Determining the Risk of Hospital-Acquired Legionellosis: A National Surveillance Study With Clinical Correlations. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 28, n. 7, p. 818–824, 2007.

SUGUNAN, A. et al. Nutrition-driven assembly of colloidal nanoparticles: Growing fungi assemble gold nanoparticles as microwires. **Advanced Materials**, v. 19, n. 1, p. 77–81, 2007.

TAMURA, N. K. et al. Fatores de virulência de *Candida* spp isoladas de cateteres venosos e mãos de servidores hospitalares. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 1, p. 91–93, 2007.

TARRASS, F.; BENJELLOUN, M.; BENJELLOUN, O. Recycling Wastewater After Hemodialysis : An Environmental Analysis. v. 52, n. 1, p. 154–158, 2008.

TAVANTI, A. et al. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 1, p. 284–292, jan. 2005.

Referências Bibliográficas

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 5. ed. ed. Porto Alegre: [s.n.].

TRIPATHY, J. et al. Polydopamine-Coated TiO₂/Nanotubes for Selective Photocatalytic Oxidation of Benzyl Alcohol to Benzaldehyde Under Visible Light. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 16, n. 5, p. 5353–5358, 2016.

TROFA, D.; GÁCSEK, A.; NOSANCHUK, D. J. Candida parapsilosis, An emerging fungal pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 4, p. 606–625, 2008.

VALLE, G. C.; RENDE, J. C.; OKURA, M. H. Estudo da Incidência do Gênero Candida em Hospital Público Universitário. **NewsLab**, v. 17, n. 101, p. 202–222, 2010.

VAN HAANDEL, M. J. H. **Structure, function and operational stability of peroxidases**. [s.l: s.n.].

VAN KENHOVE, E. et al. Overview and comparison of Legionella regulations worldwide. **American Journal of Infection Control**, v. 47, n. 8, p. 968–978, 2019.

VECCHIA, A. et al. Assessment of enteric viruses in a sewage treatment plant located in Porto Alegre, southern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 4, p. 839–846, 2012.

VENKATANARAYANAN, A.; KEYES, T. E.; FORSTER, R. J. Label-Free Impedance Detection of Cancer Cells. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 4, p. 2216–2222, 19 fev. 2013.

VICKERS, A. J. et al. A panel of kallikrein marker predicts prostate cancer in a large, population-based cohort followed for 15 years without screening. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 20, n. 2, p. 255–261, fev. 2011.

WAINWRIGHT, M. Some highlights in the history of fungi in medicine – A personal journey. **Fungal Biology Reviews**, v. 22, n. 3, p. 97–102, 2008.

WALDNER, G. et al. Photoelectrocatalytic degradation of 4-chlorophenol and oxalic

Referências Bibliográficas

acid on titanium dioxide electrodes. **Chemosphere**, v. 50, n. 8, p. 989–998, 2003.

WALKER, R. C.; HOWARD, K.; MORTON, R. L. Home hemodialysis: a comprehensive review of patient-centered and economic considerations.

ClinicoEconomics and outcomes research : CEOR, v. 9, p. 149–161, 16 fev. 2017.

WANG, F.; DI VALENTIN, C.; PACCHIONI, G. Semiconductor-to-metal transition in WO_{3-x}: Nature of the oxygen vacancy. **Physical Review B - Condensed Matter and Materials Physics**, v. 84, n. 7, p. 1–5, 2011.

WANG, H.; SHEN, G.; YU, R. Aspects of Recent Development of Immunosensors.pdf. In: **Electrochemical sensors, Bbosensors and their biomedical applications**. [s.l: s.n.]. p. 237–260.

WANG, J. et al. Disinfection technology of hospital wastes and wastewater: Suggestions for disinfection strategy during coronavirus Disease 2019 (COVID-19) pandemic in China. **Environmental Pollution**, v. 262, p. 114665, 2020.

WARD, R. A. Avoiding Toxicity From Water-Borne Contaminants in Hemodialysis: New Challenges in an Era of Increased Demand for Water. **Advances in Chronic Kidney Disease**, v. 18, n. 3, p. 207–213, 2011.

WHILEY, H. et al. Uncertainties associated with assessing the public health risk from Legionella. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 501, 2014.

WILLIAMS, W. D.; GIORDANO, N. Fabrication of 80 Å metal wires. **Review of Scientific Instruments**, v. 55, n. 3, p. 410–412, 1984.

XU CHUN SONG, XIA WANG, Y. F. Z. AND H. Y. Y. Electrochromic Properties of WO₃-MoO₃ Nanocomposite Films Prepared by Electrodeposition Method. **Current Nanoscience**, v. 9, n. 3, p. 330–334, 2013.

XU, J. et al. Polydopamine coatings embedded with silver nanoparticles on nanostructured titania for long-lasting antibacterial effect. **Surface and Coatings Technology**, v. 320, p. 608–613, 2017.

YANG, G. J. et al. A reusable capacitive immunosensor for detection of Salmonella spp. based on grafted ethylene diamine and self-assembled gold nanoparticle

Referências Bibliográficas

monolayers. **Analytica Chimica Acta**, v. 647, n. 2, p. 159–166, 2009.

YE, Q.; ZHOU, F.; LIU, W. Bioinspired catecholic chemistry for surface modification. **Chem. Soc. Rev.**, v. 40, n. 7, p. 4244–4258, 2011.

YOU, J. et al. A review of visible light-active photocatalysts for water disinfection: Features and prospects. **Chemical Engineering Journal**, v. 373, p. 624–641, 2019.

YU, J. et al. Microfluidic paper-based chemiluminescence biosensor for simultaneous determination of glucose and uric acid. **Lab on a Chip**, v. 11, n. 7, p. 1286–1291, 2011.

ZACCO, E. et al. Electrochemical magneto immunosensing of antibiotic residues in milk. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, n. 9–10, p. 2184–2191, 2007.

ZANONI, MARIA VALNICE B.; SENE, J.; SELCUK, H.; ANDERSON, M. A. Photoelectrocatalytic Production of Active Chlorine on Nanocrystalline Titanium Dioxide Thin-Film Electrodes. **Environmental Science & Technology**, v. 38, n. 11, 2004.

ZANONI, M. V. B.; GUARALDO, T. T. Photoelectrochemical Hydrogen Generation and Concomitant Organic Dye Oxidation under TiO₂ Nanotube. **ECS Transactions**, v. 50, n. 36, p. 63–70, maio 2013.

ZHANG, Q. et al. Role of surface roughness in the algal short-term cell adhesion and long-term biofilm cultivation under dynamic flow condition. **Algal Research**, v. 46, p. 101787, 2020.