

Francine Scomparin de Moraes

**INVESTIGAÇÕES SOBRE A ADESÃO DE BACTÉRIAS A
POLÍMEROS TRATADOS A PLASMA**

Dissertação apresentada como requisito à obtenção do título de Mestre à Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – Programa de Pós graduação em Ciência e Tecnologia dos Materiais, área de concentração Ciência e Engenharia de Interfaces, sob a orientação do Prof. Dr. Nilson Cristino Cruz.

SOROCABA

2008

Dedico este trabalho aos meus pais (Edson e Mercedes), ao meu esposo Vittorio, aos meus irmãos (Tais e Edson) e aos meus avós (Agenor e Therezinha).

Agradecimentos

A Deus, por tudo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Nilson Cristino da Cruz, pela orientação na elaboração deste trabalho. Meu eterno “Muito obrigada”.

À Prof^a. Dr^a. Patrícia Santos Lopes, pela realização dos ensaios bacteriológicos, e por todo conhecimento passado. A minha eterna gratidão.

As alunas de Iniciação Científica da UNISO (Universidade de Sorocaba): Fabiana de Carvalho Borges e Verônica Maria Moysés Martins pela realização dos ensaios microbianos.

Aos meus colegas de laboratório: Rita, Felipe, Bruno, pela ajuda quando necessária.

Aos Profs.: Dr. Sandro D. Mancini, Dr. Steven Durrant, Prof. Dr. José Roberto Bortoletto e a Prof^a. Dr^a. Elidiane C. Rangel pela brilhante condução das disciplinas.

Aos meus pais, irmãos e avós por sempre acreditarem em mim.

Ao Vittorio por tornar os meus dias ainda mais felizes e prazerosos.

Ao Eng. Luis Antonio Dias da Palma pela ajuda no corte das amostras de poliuretano e pelo otimismo sempre presente.

Aos amigos Sabrina, Luis Cláudio de Oliveira, Sonia Maluf, Elaine Henna e Kátia Lessa pelos conselhos sábios em momentos apropriados.

Ao amigo André Guilherme pela prontidão em sempre ajudar.

A Andressa Castro Telon, Djanira Maria Amaral pela prontidão em ajudar.

A Amanda Diniz, João de Melo Maricato, Lucimara Kurokawa Shinoda e Janete Gonçalves Melo, por toda ajuda e compreensão.

No meio da dificuldade encontra-se a oportunidade.

Albert Einstein

MORAES, F.S. **Investigações sobre a adesão de bactérias a polímeros tratado a plasma**. 2008. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia dos Materiais) – UNESP, Faculdade de Ciências. Sorocaba. 2008.

RESUMO

O avanço tecnológico obtido através dos tempos permitiu o surgimento de uma nova classe de materiais, os biomateriais, cujas funções principais são o auxílio ou a substituição de partes do corpo humano. Para a fabricação de próteses e/ou implantes podem ser utilizados os polímeros. A utilização de tais dispositivos médicos pode ocasionar o surgimento de alguns problemas, como a incompatibilidade da prótese com o organismo e a contaminação por bactérias, sendo o último um problema grave, podendo ser fatal. A contaminação por *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* pode causar graves infecções. Uma das formas de se resolver este problema é através do tratamento de superfícies, pois a adesão das bactérias é dependente das propriedades superficiais dos biomateriais. Uma técnica de tratamento superficial bastante promissora é o tratamento a plasma de descarga luminescente. Foram realizados tratamentos de superfícies em poliuretano e silicone utilizando plasmas de SF₆ com diferentes condições de tratamento, com o objetivo de se conseguir superfícies hidrofóbicas e a não adesão de microrganismos nessas superfícies. Após o tratamento as amostras foram contaminadas com as bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Observou-se que embora o tratamento a plasma tenha conferido comportamento hidrofóbico aos polímeros, ainda não conseguiu-se chegar a superfícies ideais para inibir a adesão de microrganismos.

Palavras chaves: tratamento a plasma, poliuretano, silicone, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

MORAES, F.S. **Investigations on the bacterial adhesion onto polymers treated by plasma**. 2008. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia dos Materiais) – UNESP, Faculdade de Ciências. Sorocaba. 2008.

ABSTRACT

The technological advance attained through time, allowed the appearance of a new class of materials, the biomaterials, which main functions are: to help or to replace parts or sick organs of the human body. For the manufacture of prosthesis and/or implants, polymers can be used as biomaterials. The use of prosthesis or implants may cause the appearance of some problems, such as the incompatibility between the prosthesis and the organism and the contamination caused by bacteria. This last one is a serious problem, since it may lead to death. The contamination by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* can cause serious infections. One possible way to solve this problem is through the surface treatment, since the adhesion of the bacteria depends on the superficial properties of the biomaterial. A promising technique of superficial modification is the treatment through glow discharge plasma. In this work, polyurethane and silicone coupons were exposed to SF₆ glow discharge plasmas with different conditions of treatment. After the treatment, the coupons were contaminated with the *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Even though the plasma treatment gives a hydrophobic behavior to the polymer, it can't obtain the ideal surfaces who inhibit the bacterial adhesion.

Key Words: glow discharge, polyurethane, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	Representação esquemática da parede celular de uma bactéria gram-negativa ¹⁵	23
Figura 2.2	Representação esquemática da parede celular de uma bactéria gram-positiva ¹⁶	24
Figura 2.3	Fotografia de colônia de <i>Staphylococcus aureus</i> em meio Agar Luria, incubado a 37°C por 24 horas ¹⁹	25
Figura 2.4	Fotografia de colônia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em meio Agar Luria, incubado a 37°C por 48 horas ²¹	26
Figura 2.5	Micrografias das etapas de desenvolvimento de um biofilme de <i>Vibrio cholerae</i> ²⁶ . Escalas: célula planctônica: 1 µm, células aderidas e microcolônicas: 2 µm, biofilme: 10 µm.	28
Figura 2.6	Reação de policondensação entre 4,4-difenil metano diisocianato (MDI) e etanodiol, formando poliuretano	30
Figura 2.7	Catéter fabricado em poliuretano, para uso em hemodiálise ³⁰ .	31
Figura 2.8	Cadeia polimérica do silicone	31
Figura 2.9	Cateter nasal ³²	32
Figura 3.1	Molhabilidade de uma superfície sólida ⁶⁰ .	37
Figura 3.2	Definição do ângulo de contato θ entre uma gota líquida e uma superfície plana e horizontal ⁶¹ .	38
Figura 3.3	Representação da atenuação de um feixe de luz atravessando uma cubeta de comprimento l , contendo um meio com concentração C e coeficiente de absorção α ⁶⁷ .	46
Figura 4.1	Sistema de geração de plasma LaPTec	48
Figura 4.2	Fluxograma da primeira fase de experimentos	50
Figura 4.3	Fluxograma da segunda fase de experimentos	51
Figura 4.4	Amostra presa ao percevejo	53
Figura 4.5	Conjunto de 8 amostras no reator	54
Figura 4.6	Fotografias mostrando a sequência de operações utilizadas no Método Pour Plate	60
Figura 4.7	Representação esquemática da divisão da microplaca de 24 poços TPP®	62
Figura 4.8	Fotografia de uma microplaca de 96 poços TPP®, ⁷⁰	64
Figura 5.1	Ângulos de contato nas duas faces das amostras de poliuretano tratadas conforme condições descritas na Tabela 2.	66
Figura 5.2	Ângulos de contato de diferentes amostras tratadas em	67

	uma mesma descarga.	
Figura 5.3	Ângulo de contato em função do tempo de envelhecimento de amostras de poliuretano tratadas nas condições dadas na Tabela 3.	68
Figura 5.4	Ângulos de contatos das amostras tratadas conforme as condições descritas na Tabela 5.	69
Figura 5.5	Ângulos de contato das amostras tratadas conforme as condições descritas na Tabela 5.	70
Figura 5.6	Ângulos de contato das amostras tratadas conforme as condições descritas na Tabela 6.	70
Figura 5.7	Ângulos de contato das amostras tratadas conforme as condições descritas na Tabela 7.	71
Figura 5.8	Ângulos de contato das amostras tratadas conforme as condições descritas na Tabela 7.	72
Figura 5.9	Dez maiores ângulos de contato encontrados na série de 48 experimentos, versus a potência aplicada no respectivo experimento.	74
Figura 5.10	Ângulo de contato de amostras de poliuretano tratadas em plasmas de SF ₆ , nas condições dadas na Tabela 8.	75
Figura 5.11	Fotografia das colônias de <i>Staphylococcus aureus</i> presentes nas soluções e na amostra de poliuretano tratada na condição 1.	76
Figura 5.12	Fotografia das colônias de <i>Staphylococcus aureus</i> presentes nas soluções e na amostra de poliuretano tratada na condição 2.	77
Figura 5.13	Fotografia das colônias de <i>Staphylococcus aureus</i> presentes nas soluções e na amostra de poliuretano tratada na condição 3.	77
Figura 5.14	Fotografia das colônias de <i>Staphylococcus aureus</i> presentes nas soluções e na amostra de poliuretano tratada na condição 4.	78
Figura 5.15	Fotografia das colônias de <i>Staphylococcus aureus</i> presentes nas soluções e na amostra controle (poliuretano sem tratamento).	78
Figura 5.16	Fotografia das colônias de <i>Pseudomonas aeruginosa aureus</i> presentes nas soluções e na amostra de poliuretano tratada na condição 1.	79
Figura 5.17	Fotografia das colônias de <i>Pseudomonas aeruginosa aureus</i> presentes nas soluções e na amostra de	79

	poliuretano tratada na condição 2.	
Figura 5.18	Fotografia das colônias de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>aureus</i> presentes nas soluções e na amostra de poliuretano tratada na condição 3.	80
Figura 5.19	Fotografia das colônias de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>aureus</i> presentes nas soluções e na amostra de poliuretano tratada na condição 4.	80
Figura 5.20	Fotografia das colônias de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>aureus</i> presentes nas soluções e na amostra-controle.	81
Figura 5.21	Ângulos de contato das amostras do segundo ensaio microbiológico, tratadas a plasma de SF ₆ nas condições da Tabela 8.	83
Figura 5.22	Concentração de <i>S. aureus</i> derivada das soluções plaqueadas de cada amostra de poliuretano tratadas sob as condições descritas na Tabela 8.	84
Figura 5.23	Concentração de <i>P. aeruginosa</i> derivada das soluções plaqueadas de cada amostra de poliuretano tratadas sob as condições descritas na Tabela 8.	88
Figura 5.24	Correlação entre a absorbância em 340 nm e a densidade de <i>Staphylococcus aureus</i> em suspensão.	91
Figura 5.25	Correlação entre a absorbância em 340 nm e a densidade de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em suspensão.	92
Figura 5.26	Ângulo de contato de amostras de poliuretano em função do tempo após tratamento nas diferentes condições, dadas na Tabela 9.	93
Figura 5.27	Espectros de Absorção no infravermelho, de amostras de poliuretano como recebido e tratadas nas condições da Tabela 9.	95
Figura 5.28	Concentração de <i>S. aureus</i> derivada das soluções plaqueadas de cada amostra de poliuretano tratadas sob as condições descritas na Tabela 9.	96
Figura 5.29	Concentração de <i>P. aeruginosa</i> derivada das soluções plaqueadas de cada amostra de poliuretano tratadas sob as condições descritas na Tabela 9.	98
Figura 5.30	Ângulo de contato de amostras de silicone em função do tempo após tratamento nas diferentes condições, dadas na Tabela 9.	99
Figura 5.31	Espectros de Absorção no infravermelho, de amostras de	100

	silicone como recebido e tratadas nas condições da Tabela 9.	
Figura 5.32	Concentração de <i>S. aureus</i> derivada das soluções plaqueadas de cada amostra de silicone tratadas sob as condições descritas na Tabela 9.	101
Figura 5.33	Concentração de <i>P. aeruginosa</i> derivada das soluções plaqueadas de cada amostra de silicone tratadas sob as condições descritas na Tabela 9.	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação das espécies bacterianas de acordo com a prevalência encontrada nas amostras ⁷	14
Tabela 2	Alguns dispositivos médicos e os biomateriais utilizados para a sua fabricação	34
Tabela 3	Condições empregadas nos testes para verificação de diferenças nas superfícies do poliuretano (teste 2).	53
Tabela 4	Variáveis utilizadas nos experimentos de envelhecimento	55
Tabela 5	Testes para definição dos tratamentos a serem aplicados a amostras para os ensaios microbiológicos.	56
Tabela 6	Testes para definição dos tratamentos a serem aplicados a amostras para os ensaios microbiológicos.	56
Tabela 7	Testes para definição dos tratamentos a serem aplicados a amostras para os ensaios microbiológicos.	57
Tabela 8	Variáveis utilizadas no tratamento de amostras para os ensaios microbiológicos.	58
Tabela 9	Condições utilizadas nos tratamentos para os ensaios microbiológicos realizados em leitor Elisa.	61
Tabela 10	Os dez melhores valores de ângulo de contato, medidos nas amostras de poliuretano, conforme as condições descritas nas Tabelas 5, 6 e 7.	73

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	FUNDAMENTAÇÃO DO TRABALHO	16
	2.1. Conceituação do estado de plasma	16
	2.2. A geração do plasma	16
	2.2.1. Fonte de Energia	16
	2.2.2. Reator	18
	2.2.3. Sistema de Vácuo	19
	2.3. Processos a Plasma	19
	2.3.1. Implantação iônica por imersão em plasma (IIIP)	19
	2.3.2. Polimerização a plasma	20
	2.3.3. Tratamento de superfícies com plasma	21
	2.4. Bactérias	22
	2.4.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	24
	2.4.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
	2.4.3. Biofilme bacterianos	26
	2.4.3.1. Biofilme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
	2.4.3.2. Biofilme de <i>Staphylococcus aureus</i>	29
	2.5. Poliuretano	29
	2.6. Silicone	31
	2.7. Biomateriais	32
	2.8. Tratamento a plasma e adesão de bactérias	34
3	MÉTODOS EXPERIMENTAIS	37
	3.1. Técnicas de Caracterização	37
	3.1.1. Ângulo de contato	37
	3.1.2. Espectroscopia de Absorção no Infravermelho	41
	3.2. Métodos de Contagem Bacteriana	43
	3.2.1. Método da Contagem em Placas	43
	3.2.1.1. Método Pour Plate	44
	3.2.2. Turbidimetria	44
4	MATERIAIS E MÉTODOS	48
	4.1. Equipamento utilizado	48
	4.2. Materiais	49

	4.3. Métodos – Fluxograma dos Experimentos	49
	4.4. Tratamento superficial	51
	4.5. Tratamento a plasma e ensaios microbiológicos	57
	4.5.1. Metodologia utilizada nos ensaios microbiológicos	58
	Primeira fase – Pour Plate	58
	Segunda fase - Turbidimetria	61
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	65
	5.1. Tratamento superficial – Testes	65
	5.2. Ensaios Microbiológicos – Primeira Fase	74
	5.3. Ensaios Microbiológicos – Segunda Fase	90
6	CONCLUSOES	104
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento tecnológico da medicina e da engenharia de materiais tem possibilitado que cada vez mais materiais artificiais sejam empregados como dispositivos médicos para substituir ou auxiliar o funcionamento de órgãos humanos. Neste sentido, podem ser usados materiais cerâmicos, metálicos ou poliméricos, sendo que os últimos são os mais amplamente utilizados¹. Eles podem ser encontrados, por exemplo, em corações artificiais², catéteres³, isolantes dos fios de marcapasso⁴ e válvulas cardíacas⁵. Entretanto, um dos grandes problemas associados à utilização de polímeros como dispositivos médicos é a sua contaminação por bactérias. Segundo o Manual de Microbiologia Clínica para o controle de Infecção em Serviços de Saúde⁶ (2004, p.7) “diferentes microorganismos como bactérias, fungos e vírus causam infecções hospitalares. O grupo de patógenos, no entanto, que se destaca é o das bactérias”. Nesse mesmo estudo, são citados os agentes mais comuns de infecções nosocomiais. Dentre todos os citados estão a *Pseudomonas aeruginosa* e o *Staphylococcus aureus*. Pesquisas anteriores também já citavam tais bactérias; o programa SENTRY – Antimicrobial Surveillance Program realizou um estudo onde foram isoladas as bactérias presentes no trato respiratório de pacientes internados em 11 hospitais brasileiros. Após a análise de 525 casos, constatou-se a presença da *Pseudomonas aeruginosa* em 30,1% dos casos e *Staphylococcus auerus* em 19,6%, conforme pode ser verificado na Tabela 1.

Tabela 1: Classificação das espécies bacterianas de acordo com a prevalência encontrada nas amostras⁷:

Ordem de prevalência	%	n
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30,1	158
<i>Staphylococcus aureus</i>	19,6	103
<i>Acinetobacter spp.</i>	13	68
<i>Klebsiella spp.</i>	9,5	50
<i>Enterobacter spp.</i>	8,4	44
<i>Enterococcus spp.</i>	4	21
<i>Serratia spp.</i>	4	21
<i>Escherichia coli</i>	3,4	18
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2,5	13
<i>Proteus spp.</i>	1	5

Pacientes contaminados com tais bactérias estão sujeitos à graves infecções hospitalares, com taxas de mortalidade de 30 à 60% dos doentes. Estima-se que 15% de todas as mortes associadas à hospitalização estejam diretamente relacionadas a pneumonias hospitalares. *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* são também as bactérias que apresentaram maior resistência aos tratamentos antimicrobianos^{7, 8}.

Normalmente o desenvolvimento de colônias de bactérias pode ser erradicado pela desinfecção da superfície afetada ou tratando o organismo com antibiótico. Entretanto, bactérias podem aderir de forma irreversível a superfícies dos materiais implantados. Essas bactérias aderidas podem se multiplicar formando culturas complexas e produzir substâncias que envolvem suas células. Esta estrutura é chamada de biofilme e é na maioria das vezes impossível de ser erradicada com o uso de antibióticos. As substâncias produzidas pelas bactérias

agem como barreiras físicas e químicas que as protegem de agentes externos. Em grande parte dos casos, a presença do biofilme nas próteses e implantes leva à remoção ou substituição dos mesmos, o que é sempre uma situação traumática para o paciente. Por esse motivo é de grande interesse o desenvolvimento de materiais imunes à adesão de bactérias.

Uma possível solução para este problema pode estar na interação entre a superfície do biomaterial e a bactéria. Tem sido observado que as propriedades superficiais do biomaterial têm um efeito significativo na colonização e adesão das bactérias. Uma das possíveis soluções para este tipo de problema é o tratamento da superfície do biomaterial, tornando-a não propícia para a adesão de bactérias. Entre as diferentes formas de modificação de superfície, podem ser utilizadas aquelas baseadas em plasmas de descargas luminescentes.

Neste trabalho estudou-se o tratamento superficial de amostras de poliuretano e de silicone através da exposição a plasmas de descarga luminescente de hexafluoreto de enxofre (SF_6). Após o tratamento das superfícies foram testadas algumas metodologias para fazer a quantificação das bactérias aderidas aos materiais modificados. Em uma primeira tentativa, as amostras foram inoculadas em caldo com *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, sendo posteriormente lavadas, diluídas e plaqueadas. Em uma segunda fase do trabalho foi testada a leitura da absorbância de soluções modificadas por bactérias através de um leitor de microplacas Elisa. Paralelamente ao estudo de quantificação de bactérias aderidas, foram feitas medidas de ângulo de contato nas amostras para verificação da hidrofobicidade das superfícies e espectroscopia de absorção de infravermelho, para determinação de possíveis modificações na composição química das superfícies tratadas.

2. FUNDAMENTAÇÃO DO TRABALHO

2.1. Conceituação do estado de Plasma

A palavra plasma foi usada pela primeira vez em 1927 por Langmuir, que trabalhou com descargas em baixas pressões. Nestas descargas, a luminosidade produzida pelo gás espalhava-se pelo sistema de vácuo. Langmuir introduziu a palavra *plasma* para descrever o gás ionizado⁹.

Basicamente, o plasma é um gás ionizado. Atualmente define-se o plasma como um gás parcialmente ionizado, mas eletricamente neutro, consistindo de uma mistura de elétrons, partículas carregadas positiva e negativamente, átomos neutros e moléculas^{9, 10}.

2.2. A geração do plasma

Para a geração do tipo de plasma empregado neste trabalho, os chamados plasmas de descarga luminescente, são necessários três itens: Uma fonte de energia para que o gás seja ionizado, um reator e um sistema de vácuo¹⁰.

2.2.1. Fonte de energia

Os plasmas são gerados pelo fornecimento de energia a um gás neutro, causando a formação de espécies excitadas e ionizadas^{10, 11}, dando origem a partículas (elétrons, íons, átomos) que formam o plasma.

Para a existência de um plasma, é necessário que átomos e moléculas percam elétrons, isto é, sejam ionizados. Para que isso aconteça é necessário que os elétrons recebam energia. Há duas formas principais dos átomos ganharem

energia: através de colisões inelásticas entre partículas (átomo – átomo, átomo – íon, átomo – elétron e íon – elétron) e através da absorção de fótons¹⁰.

Quando colisões entre elétrons e partículas produzem estados excitados, as partículas que receberam energia poderão sofrer ionização.

Quando duas partículas colidem inelasticamente, a Lei de conservação de energia fornece:

$$E_{c_1} + E_{c_2} = E'_{c_1} + E'_{c_2} + \Phi \quad (2.1)$$

Onde E_{c_i} e E'_{c_i} são, respectivamente, as energias cinéticas da partícula i antes e depois da colisão. Φ é a energia absorvida pela colisão

Se Φ for maior que a energia de ionização necessária para ionizar a partícula, a colisão conduz à ionização diretamente; se Φ for menor que a energia de ionização, mas maior que a energia de excitação, os elétrons nos átomos das partículas são excitados e permanecem assim por um curto período de tempo. Posteriormente, o excesso de energia é liberado e os elétrons voltam ao seu estado original. No processo de decaimento, os elétrons emitem o excesso de energia como fótons. Se os átomos que estão em estados excitados adquirem alguma energia de outras partículas por colisões inelásticas, a ionização dos átomos pode ser possível, mesmo que a energia transferida em cada colisão seja menor que a energia de ionização. Isto ocorre quando o tempo de vida da espécie excitada é longo (estado metaestável).

Da mesma forma que as colisões inelásticas, quando os átomos absorvem um fóton de energia pode ocorrer a fotoionização se a energia absorvida for maior que a energia de ionização; pode ocorrer fotoexcitação se a energia absorvida for maior que a energia de excitação, mas menor que a energia de ionização.

Um plasma é estável quando as colisões entre as espécies do gás são suficientemente intensas para que elétrons sejam arrancados de seus átomos. Além disso, o gás é rarefeito, de maneira que os elétrons removidos têm pouca probabilidade de se recombinar com íons positivos. Finalmente a estabilidade do plasma é garantida também por fontes externas de energia, como campos elétricos e radiações intensas o suficiente para provocar freqüentes ionizações.

O fornecimento de energia para um plasma pode ser feito através de combustão, chama, descarga elétrica, reações nucleares controladas, dentre outros. Entretanto, o método mais utilizado é o da descarga elétrica por ser capaz de fornecer energia para manter o plasma por um período relativamente longo de tempo¹².

A diferença de potencial elétrico utilizado para gerar e manter o plasma pode ser contínua (CC) ou alternada (CA). Em geral, as freqüências de excitação mais utilizadas são 13,56 MHz (radiofreqüência – rf) e 2,54 GHz (microondas).

Tipicamente, o fornecimento de energia para as espécies do gás contido no reator onde será gerado o plasma é feito a partir de um par de eletrodos colocados no interior do reator e acoplados de forma capacitiva a um gerador elétrico¹².

2.2.2.Reator

A câmara ou reator onde será estabelecido o plasma pode ter várias formas. Tais formas são determinadas pela aplicação e conveniência, sendo mais comuns os reatores tubulares e aqueles em forma de sino. Os materiais mais utilizados são o aço inox e o vidro¹⁰.

2.2.3.Sistema de vácuo

Diferentes configurações podem ser empregadas para evacuar o reator. O bombeamento pode ser realizado simplesmente por bombas rotativas de palhetas ou através de sistemas mais potentes, envolvendo tipicamente bombas difusoras, turbo moleculares ou roots.

2.3.Processos a Plasma

Três processos podem ser destacados entre as diversas técnicas de tratamento superficial de materiais utilizando plasmas:

- Implantação iônica por imersão em plasma (IIIP);
- Polimerização a plasma;
- Tratamento de superfície com plasma.

2.3.1.Implantação iônica por imersão em plasma (IIIP)

A implantação iônica por imersão em plasma (IIIP)¹² é um processo de tratamento onde átomos ou moléculas são ionizados no plasma, acelerados por um campo elétrico e implantados na superfície do material alvo que também se encontra envolvido pelo plasma. Os íons penetram e transferem sua energia para o substrato, modificando as propriedades de regiões próximas à superfície. Essas modificações podem ocorrer por dois mecanismos: um envolvendo mudanças na composição química do substrato, através da incorporação de elementos do plasma e o outro resulta de rearranjos estruturais causados pela transferência de energia dos íons implantados para o substrato.

As modificações geradas pela implantação iônica são fortemente dependentes do material utilizado como substrato e dos parâmetros de bombardeamento como a energia dos íons, a fluência ou dose (número de íons incidentes por unidade de área do substrato), corrente do feixe, espécie iônica utilizada como projétil e a temperatura da amostra durante bombardeamento.

2.3.2. Polimerização a plasma

A polimerização a plasma ocorre quando o plasma é gerado a partir de um vapor ou gás orgânico (monômero) puro ou misturado a outros gases. O mecanismo de polimerização consiste na quebra de ligações químicas no monômero através do impacto de espécies do plasma, originando espécies reativas que se recombinaem e podem se depositar, na forma de filmes finos nas superfícies próximas ou expostas ao plasma.

Os polímeros formados através desse processo podem ser altamente ramificados e entrelaçados e suas características são fortemente dependentes dos parâmetros utilizados no processo de deposição como a natureza do monômero, potência e frequência de excitação, tempo de exposição ao plasma e formato do reator e dos eletrodos^{12, 13}.

As reações químicas que ocorrem no plasma são em geral muito complexas e, conseqüentemente, não específicas. Desta forma, a polimerização a plasma pode ser reconhecida como uma forma especial e única de preparação de materiais que não podem ser feitos por outros métodos.

2.3.3. Tratamento de superfícies com plasma

Quando o plasma é gerado sem a introdução de vapores orgânicos não há a deposição de filmes. Os gases mais frequentemente utilizados neste caso são: O_2 , N_2 , SF_6 , NH_3 , CO_2 , He, Ar e H_2 .

Plasmas de gases não reativos são aqueles gerados a partir de elementos que possuem baixa ou nenhuma reatividade, como por exemplo, os gases nobres. Tais plasmas podem produzir quebra de ligações químicas, mas não reagem quimicamente com o substrato.

Plasmas de gases quimicamente reativos são aqueles produzidos a partir de gases como O_2 , N_2 , SF_6 e CF_4 . Neste caso ocorrem reações químicas entre espécies do plasma e a superfície do substrato, mas não ocorre a deposição de filmes.

O impacto das moléculas do gás com o material da superfície resulta na formação de sítios ativos (radicais livres, por exemplo) na superfície. Esta superfície ativada pode sofrer um rearranjo molecular como a formação de ligações duplas e triplas ou então reagir posteriormente com espécies químicas colocadas em contato com ela.

Quando reações químicas entre íons do plasma e espécies da superfície da amostra resultam na geração de compostos voláteis, que podem ser retirados do plasma pelo sistema de vácuo, ocorre a remoção ou ablação de material do substrato. Esse processo é conhecido como *Plasma Etching* e é frequentemente empregado como um procedimento de limpeza ou preparação de substratos¹³.

O processo conhecido como *Sputtering* ocorre quando a remoção de átomos da superfície é resultado da transferência de energia pelo impacto de espécies do plasma¹⁴.

2.4.Bactérias

As bactérias são os organismos vivos mais simples encontrados na Terra. São seres unicelulares, procarióticos, que podem ser encontrados sob a forma isolada ou em colônias.

Estes microorganismos são classificados como *gram-positivos* ou *gram-negativos*, em função da estrutura de suas paredes celulares. A parede celular das bactérias *gram-negativas* é constituída por duas camadas. A camada interna é situada externamente à membrana citoplasmática e é denominada camada basal, mureína ou peptídeoglicano, uma vez que é formada por peptídeoglicano, um polissacarídeo. Essa camada também é observada na parede celular das bactérias *gram-positivas*. A segunda camada, presente somente nas bactérias gram-negativas, é denominada membrana externa. Ela é formada por fosfolipídeos, lipoproteínas, proteínas e também lipopolissacarídeos. A *Pseudomonas aeruginosa* é um exemplo de bactéria *gram-negativa*. Um esquema da parede celular das bactérias *gram-negativas* está na figura 2.1. Uma das funções da membrana externa da parede celular das bactérias é formar uma barreira molecular, o que dificulta, por exemplo, a difusão de certos antibióticos.

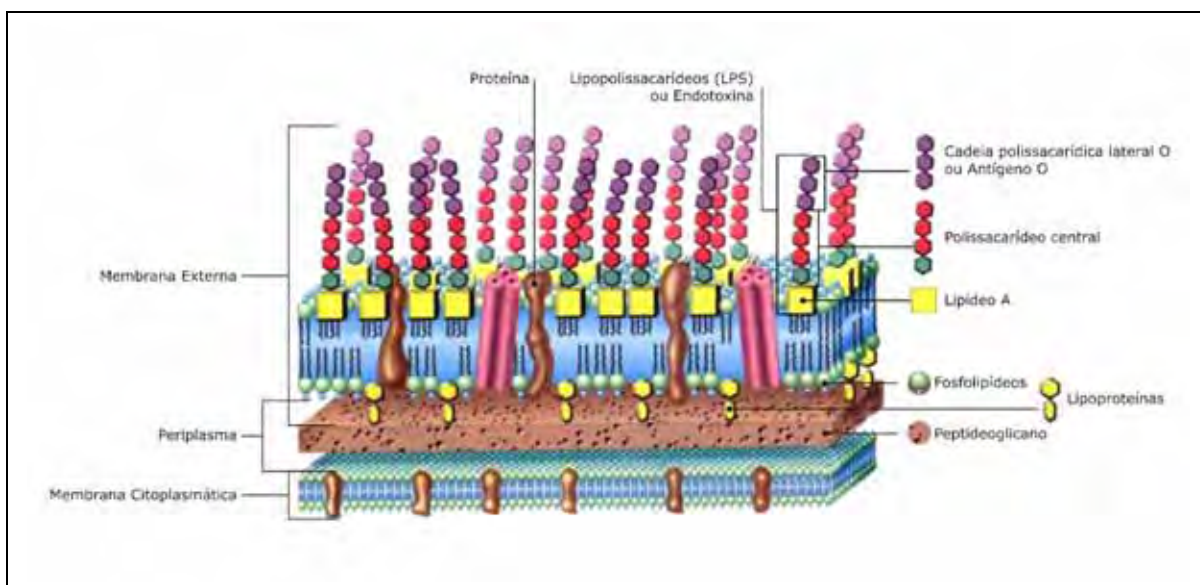


Figura 2.1. Representação esquemática da parede celular de uma bactéria gram-negativa¹⁵ (Por MADIGAN et al., Brock Biology of Microorganisms 2003, Adaptado por KYAW, C.M. Disponível em: <http://www.unb.br/ib/cel/microbiologia/morfologia1/morfologia1.html>)

A parede das bactérias *gram-positivas* consiste de uma única camada, espessa e homogênea, composta por um complexo mucoso formado essencialmente por peptidoglicano, conforme pode ser observado na Figura 2.2. Um exemplo de bactéria *gram-positiva* é o *Staphylococcus aureus*.

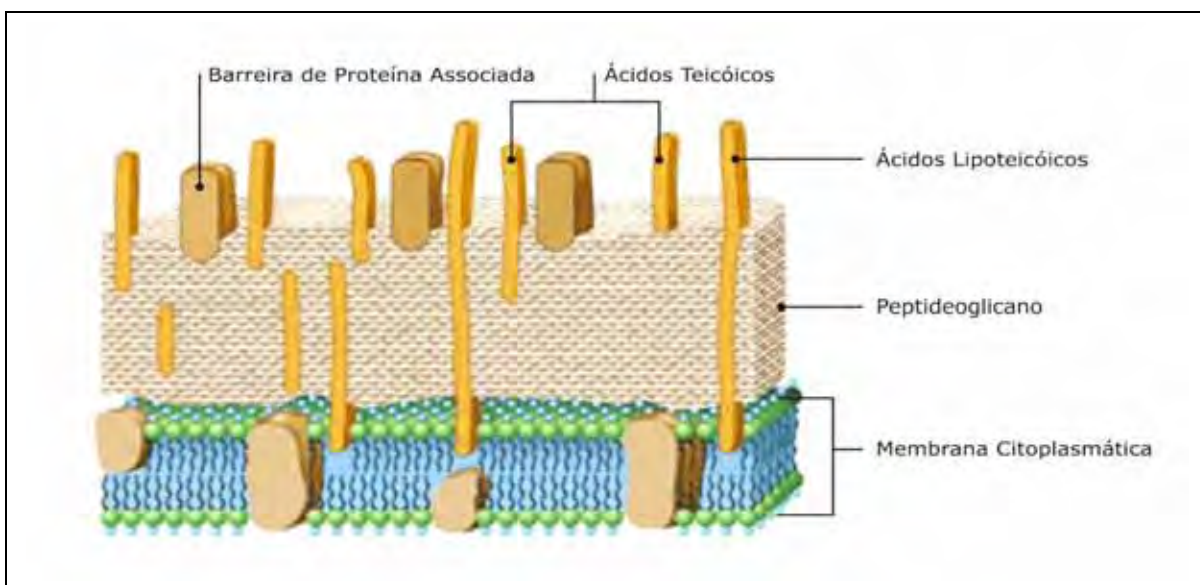


Figura 2.2. Representação esquemática da parede celular de uma bactéria gram-positiva¹⁶ (Por MADIGAN et al., Brock Biology of Microorganisms 2003, Adaptado por KYAW, C.M. Disponível em: <<http://www.unb.br/ib/cel/microbiologia/morfologia1/morfologia1.html>>)

2.4.1. *Staphylococcus aureus*

O *Staphylococcus aureus* possui células em formato esférico; que quando agrupados apresentam aspecto de cacho de uvas. É a espécie mais virulenta do seu gênero, também conhecida pela sua elevada capacidade de desenvolver resistência aos tratamentos convencionais. É o agente mais comum em infecções com formação de pus e pode ser encontrado na pele ou em regiões mais profundas. Em indivíduos debilitados este microrganismo pode causar infecções graves, como pneumonia, bacteremia, osteomielite e endocardite, entre outras^{17, 18}. A figura 2.3 apresenta colônias de *Staphylococcus aureus*.

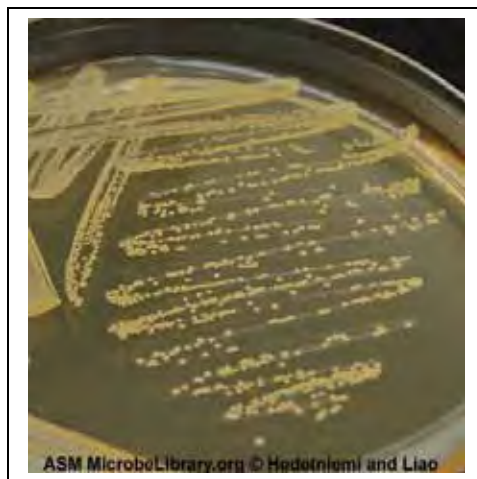


Figura 2.3: Fotografia de colônias de *Staphylococcus aureus* em meio Agar Luria, incubado à 37°C por 24 horas. (Por: MIN-KEN LIAO, Furman University¹⁹. Disponível em:<<http://www.microbelibrary.org>>)

2.4.2. *Pseudomonas aeruginosa*

A *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria bastante versátil, que pode causar diversas infecções oportunistas como pneumonia, meningite, endocardite e infecções respiratórias. Elas também são encontradas em infecções hospitalares, sendo capazes de aderir a diversos materiais, contaminando catéteres, ventiladores para respiração artificial, próteses e outros dispositivos médicos. Devido à alta resistência a antibióticos, as infecções causadas por essas bactérias são de difícil controle²⁰. A figura 2.4 mostra colônias de *Pseudomonas aeruginosa*²¹.



Figura 2.4: Fotografia de colônias de *Pseudomonas aeruginosa* em meio Agar Luria, incubado à 37°C por 48 horas. (Por: MIN-KEN LIAO, Furman University²¹. Disponível em: <<http://www.microbelibrary.org>>).

2.4.3. Biofilmes bacterianos

As bactérias, seja no organismo humano, na água ou em alimentos, não ocorrem como células individualizadas e sim organizadas em “comunidades”, com diferentes graus de complexidade, associadas às diversas superfícies. Geralmente elas formam um *biofilme*, isto é, um ecossistema estruturado altamente dinâmico, que atua de maneira coordenada²². Os biofilmes podem ser formados por populações desenvolvidas a partir de uma ou múltiplas espécies, podendo ser encontrados em uma variedade de superfícies bióticas e/ou abióticas²². Os biofilmes mais comuns na natureza são heterogêneos, compostos por duas ou mais espécies, podendo os produtos do metabolismo de uma dada espécie fornecer elementos que promovam a ligação das outras. Inversamente, a competição pelos nutrientes e o acúmulo de metabólitos tóxicos produzidos pelas espécies colonizadoras poderão limitar a diversidade de espécies em um biofilme²³. A densidade e complexidade do biofilme aumentam à medida que as células se dividem e os componentes extracelulares gerados pelas bactérias interagem com moléculas orgânicas e inorgânicas do ambiente circundante. O crescimento de qualquer biofilme é limitado

pela disponibilidade de nutrientes no ambiente circundante e pela sua difusão às células localizadas no interior do biofilme^{22, 23}. A arquitetura de um biofilme em uma superfície pode ser descrita pelas direções de crescimento do biofilme, as quais podem ser: horizontal, vertical ou as duas direções combinadas.

O crescimento horizontal ocorre quando a bactéria coloniza um substrato disponível, porém com escassez de nutrientes, o que força o biofilme a se estender para procurar novas fontes de nutrientes²⁴. Com isso há o crescimento da área do substrato coberta pelo biofilme, porém sem aumento significativo da espessura do biofilme.

Quando as bactérias já colonizaram toda a área disponível do substrato, o biofilme cresce verticalmente, aumentando dessa forma a espessura do biofilme. O crescimento vertical dará origem a uma importante barreira física contra a ação terapêutica dos antibióticos²⁵.

As etapas de formação de um biofilme são^{23, 26}:

- a) Adesão a uma superfície: é a etapa inicial, bastante complexa e ainda não conhecida completamente. Os organismos, denominados colonizadores, aderem a uma superfície, geralmente contendo proteínas ou outros compostos orgânicos²³.
- b) Maturação do biofilme: as células aderidas passam a se desenvolver, originando microcolônias que sintetizam uma matriz exopolissacarídica (EPS) que passa a atuar como substrato para a aderência de microrganismos, denominados colonizadores secundários, que podem se fixar diretamente aos colonizadores primários.
- c) Ruptura: quando o biofilme atinge uma determinada massa crítica e o equilíbrio dinâmico é alcançado, as camadas mais externas do biofilme

começam a liberar células em estado planctônico, que podem rapidamente dispersar e multiplicar, colonizando novas superfícies e organizando novos filmes em outros locais. Com a ausência de nutrientes e/ou oxigênio ou dificuldades na sua difusão, entre outros fatores, inicia-se um processo de morte celular junto à superfície e a subsequente desintegração do biofilme^{22, 23}.

A figura 2.5 resume o processo de formação de um biofilme:

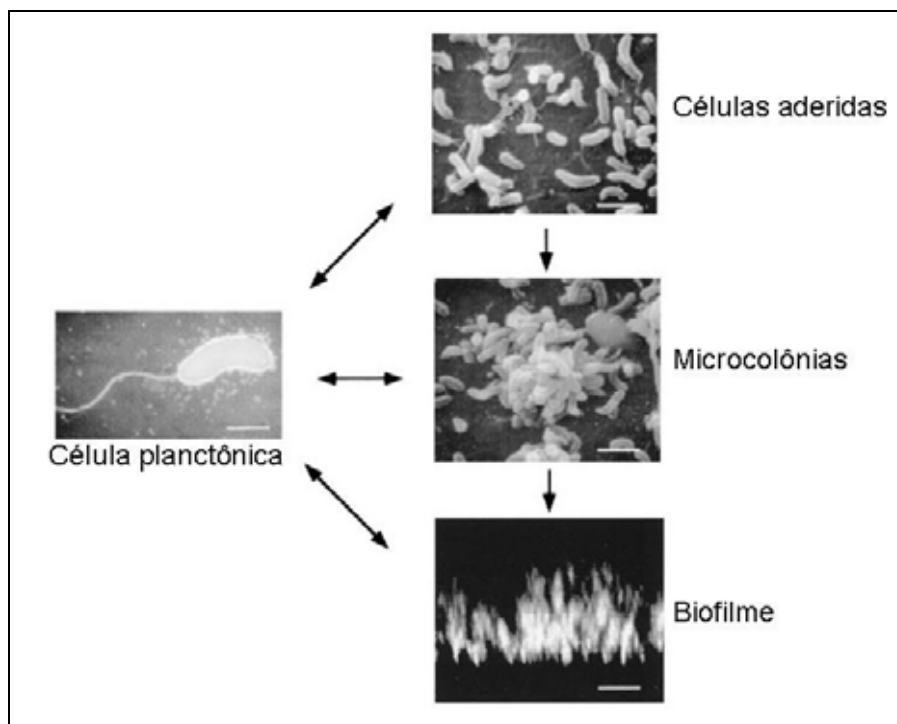


Figura 2.5: Micrografias das etapas de desenvolvimento de um biofilme de *Vibrio cholerae*²⁶. (Adaptado de WATNICK, P.; KOLTER, R. Biofilm, City of Microbes). Escalas: célula planctônica: 1 µm, células aderidas e microcolônias: 2 µm, biofilme: 10 µm.

2.4.3.1. Biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*

A *Pseudomonas aeruginosa* sofre intensa diversificação genética quando cresce em um biofilme e possui uma grande capacidade de resistir a terapias com

antibióticos. Ela secreta uma grande variedade de pigmentos incluindo piocianina (que confere ao biofilme uma cor azulada), pioverdina (cor verde amarelada fluorescente) e piorrubina (pigmento avermelhado), que formam um muco amarelo esverdeado. A identificação do biofilme dessa bactéria se baseia na produção de piocianina e pioverdina e também na sua habilidade de crescimento a temperaturas de até 42° C.

2.4.3.2. **Biofilme de *Staphylococcus aureus***

Assim como a *Pseudomonas aeruginosa*, o *Staphylococcus aureus* também apresenta resistência aos antibióticos e capacidade de formar biofilmes cujos mecanismos ainda não foram totalmente esclarecidos. O *Staphylococcus aureus* produz enterotoxinas termoestáveis, que são proteínas de cadeia simples, não-ramificada, com grandes quantidades de lisina, tirosina, ácido aspártico e glutâmico. Seu biofilme é amarelado e pode crescer em temperaturas entre 15 e 45°C, produzindo a enzima coagulase.

2.5.Poliuretano

O poliuretano é um polímero obtido através da policondensação em massa dos seus monômeros – diisocianato e um poliol – e catalisadores, conforme a reação mostrada na figura 2.6.

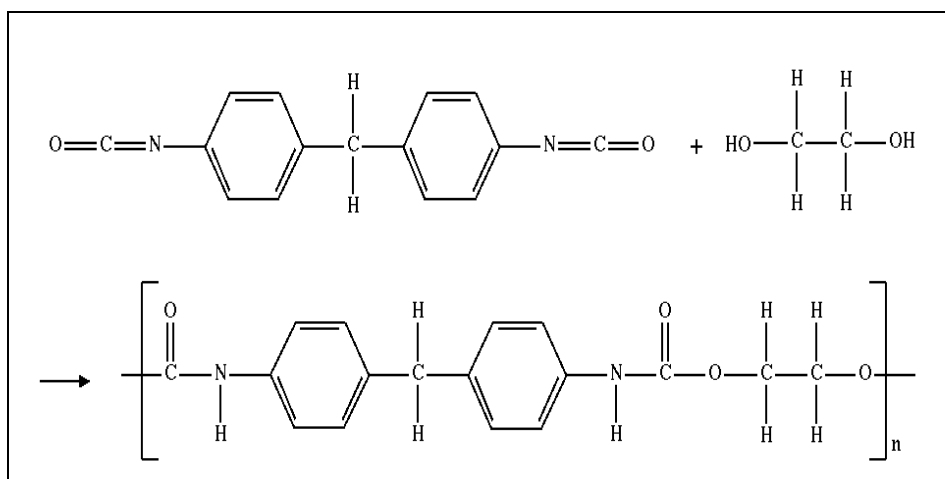


Figura 2.6: Reação de policondensação entre 4,4-difenil metano diisocianato (MDI) e etanodiol, formando um tipo de poliuretano

O poliuretano é um material versátil. Dependendo dos monômeros e do catalisador, uma variedade de produtos pode ser obtida, incluindo textura maciça ou celular (quando há bolhas de ar), rígidos, flexíveis ou mesmo em forma de fibras, de natureza termoplástica ou termofixa²⁷. Os poliuretanos têm sido largamente usados como biomateriais, por serem quimicamente inertes e, por possuírem alta longevidade, excelentes propriedades mecânicas, são biocompatíveis e não trombogênicos^{28, 29}.

O poliuretano pode ser utilizado como catéteres, tubos, sondas, entre outras aplicações médicas. Na figura 2.7, é apresentado um exemplo de catéter para hemodiálise com partes fabricadas em poliuretano³⁰.



Figura 2.7: Cateter com partes fabricadas em poliuretano, para uso em hemodiálise³⁰ (Disponível em: <http://www.iedyt.com>)

2.6.Silicone

O silicone é resultado da polimerização do dimetilsiloxano ($\text{SiO}(\text{CH}_3)_2$), cuja cadeia principal é formada de átomos alternados de oxigênio e silício, de modo semelhante ao dos compostos orgânicos. Uma vez que não possuem átomos de carbono em sua cadeia principal, os silicones não são considerados orgânicos, embora haja átomos de carbono nos radicais ligados ao silício da cadeia principal. A cadeia do silicone pode ser vista na figura 2.8.

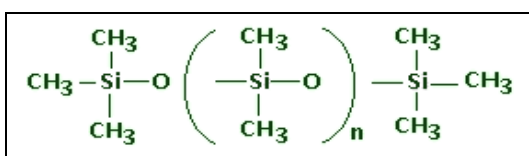


Figura 2.8: Cadeia polimérica de um tipo de Silicone

As características físicas dos silicones podem ser alteradas pela variação de tamanho da cadeia principal. Desta forma, é possível ter-se silicone sólido, gelatinoso e líquido.

Os silicones apresentam inúmeras utilizações, como por exemplo, impermeabilizantes, óleos e lubrificantes, ceras residenciais para polimento, hidratantes corporais. Na medicina são empregados como próteses e substituintes de tecidos moles e cartilagens³¹, lentes de contato, cateteres nasais, cânulas traqueais, válvulas para hidrocefalia, próteses nasais, dentre outros. Eles são quimicamente inertes, estáveis mesmo sob condições extremas de temperatura, isolantes elétricos, resistentes a intempéries e a agentes oxidantes.

A figura 2.9 mostra um cateter nasal, cuja parte transparente é produzida em silicone.



Figura 2.9: Cateter nasal³² (Disponível em: <<http://www.atosmedical.com>>).

2.7.Biomateriais

Os biomateriais são materiais utilizados na fabricação de implantes e dispositivos médicos. Devido à habilidade desses materiais em promover melhorias à qualidade de vida das pessoas e o aumento do investimento econômico feito em

medicina, houve um crescimento significativo das pesquisas feitas sobre biomateriais³³. Em 2000, o mercado mundial de biomateriais foi estimado em 23 bilhões de dólares. A participação dos EUA se situa entre 35 – 45% do mercado mundial e o mercado europeu é responsável por 25%. Não há dados da participação do Brasil. Entretanto, apenas em 2004 os gastos do SUS (Sistema Único de Saúde) com próteses utilizadas para artroplastia total de quadril foi de R\$ 30 milhões³⁴. Devido à sua aplicação, os biomateriais devem possuir propriedades tais como:

- a) Biocompatibilidade, ou seja, ele não deve causar nenhuma reação adversa ou rejeição pelo organismo.
- b) Resistência à fadiga quando submetidos à esforços repetitivos.
- c) Resistência a impacto para evitar rupturas e fraturas durante o uso;
- d) Estabilidade química e biológica para que não ocorram reações envolvendo componentes fisiológicos;
- e) Não devem apresentar variações significativas de propriedades, quando expostos ao calor ou ao frio;
- f) Devem apresentar coeficiente de absorção de água nulo ou muito pequeno;
- g) Não conter substâncias com potencial cancerígeno.

Os biomateriais podem ser cerâmicos, metálicos ou poliméricos. Os polímeros mais utilizados são poliuretano (PU), silicone, polimetilmetacrilato (PMMA), poliéster (fibra), polietileno de ultra-alto peso molecular (UHMWPE), polipropileno e o policloreto de vinila (PVC). A Tabela 2 mostra alguns dispositivos médicos e os biomateriais utilizados para a sua fabricação³³.

Tabela 2: Alguns dispositivos médicos e os biomateriais utilizados para a sua fabricação³³.

Dispositivos médicos	Biomaterial utilizado
Lentes Intraoculares	PMMA – Polimetilmetacrilato
Lentes de Contato	Silicone
Enxertos Vasculares	Politetrafluoretileno
Próteses de joelho e quadril	Titânio; Polietileno
Válvulas cardíacas	Carbono pirolítico
Implantes mamários	Silicone
Próteses Endovasculares	Aço Inoxidável, Titânio
Implantes Dentários	Titânio
Próteses para o ventrículo esquerdo	Poliuretano

2.8.Tratamento a plasma e a adesão de bactérias

Alguns estudos têm mostrado que as propriedades superficiais dos biomateriais interferem na adesão e colonização das bactérias³⁵⁻⁴⁰. Através destes estudos é possível perceber que, embora a superfície do biomaterial afete diretamente a formação do biofilme, não há uma regra que determine o comportamento da adesão do microrganismo. Reid³⁵, por exemplo, mostrou que o mecanismo de adesão dos microrganismos às superfícies dos biomateriais é bastante complexo. Em alguns casos, os componentes dos polímeros atuaram como receptores das bactérias e a adesão pôde ocorrer devido a ligações físico-químicas ou eletrostáticas. Jen et al⁴¹ demonstraram que hidrogéis quando adsorvidos pela superfície dos biomateriais podem aumentar a imobilização das células, causando com isso a morte das bactérias, pois sem mobilidade não há como buscar nutrientes. Ong et al³⁶ mostraram que em alguns casos a adesão está diretamente relacionada ao caráter hidrofílico/hidrofóbico das superfícies. A cepa D21f2 da bactéria *Escherichia coli* foi atraída pelas superfícies de Teflon (superfície sabidamente hidrofóbica) e poliestireno (superfície intermediária). Entretanto houve

baixa afinidade entre as bactérias e o vidro (superfície hidrofílica). Essa repulsão pode estar ligada a cargas eletrostáticas. Comportamento parecido das bactérias sobre o vidro foi observado por Richter et al³⁷. Porém nesse estudo houve formação de biofilme em 6% da área do vidro.

Para se adequar a superfície do biomaterial deixando-o com as características desejadas (melhor biocompatibilidade, baixa aderência plaquetária, dentre outras), pode-se fazer uso de diferentes tipos de tratamentos superficiais. Entre eles merecem destaque aqueles que utilizam descargas de plasmas luminescentes, seja revestindo o biomaterial com polímeros, seja tratando a superfície. Tais tratamentos têm sido muito utilizados em biomateriais⁴²⁻⁴⁷. Piskin⁴⁴ usou membranas microporosas de PP (polipropileno) e as revestiu com hexadimetildisiloxane (HMDS) para eliminar alguns problemas que ocorrem nessas membranas utilizadas para oxigenação sanguínea, como por exemplo, interações das plaquetas com a superfície da membrana. Observou-se que nas membranas expostas ao plasma, as interações plaquetárias foram reduzidas em comparação com as membranas não revestidas. Favia et al⁴⁷ verificaram que é possível tratar a superfície de diferentes tipos de polímeros para melhorar a compatibilidade com o sangue.

Na década de 1990, estudos já acenavam com a possibilidade de tratar superfícies de biomateriais com plasmas de descargas luminescentes para evitar a formação de biofilmes. Estudos realizados para correlacionar a formação de biofilmes microbianos em tubos endotraqueais de PVC^{43, 48}, cateteres urinários de poliuretano⁴³ e próteses de voz de silicone⁴⁸ tratados com plasmas conseguiram alterar as características superficiais dos polímeros (PVC, poliuretano e silicone) porém não conseguiram evitar a formação de biofilmes. Estudos posteriores

intensificaram a busca pelo entendimento dos mecanismos que governam a adesão inicial e a conseqüente formação do biofilme⁴⁹⁻⁵³. Observa-se também nestes estudos que mesmo as superfícies tratadas a plasma foram colonizadas por bactérias. Entretanto, parece não haver um comportamento universal como Everaert et al⁴⁸ observaram com estudos *in vitro* e *in vivo* da adesão de *Candida albicans* em próteses de voz de silicone. Eles observaram respostas contraditórias em ambos os casos. Os testes realizados *in vitro* indicaram que a maior adesão de bactérias ocorreu em superfícies hidrofóbicas enquanto nos testes *in vivo* a maior adesão ocorreu nas superfícies hidrofílicas. Contudo, os resultados de vários estudos⁵⁴⁻⁵⁷ indicam que há relação entre o caráter hidrofóbico/hidrofílico das superfícies e a formação de biofilmes e que é possível alterar-se esse caráter através de tratamentos com plasmas de descargas luminescentes. Everaert et al⁴⁸ utilizaram plasmas de argônio para tornar hidrofóbica a superfície do silicone. Triandafillu et al⁵² utilizaram plasmas de oxigênio para tratar PVC, tornando-o hidrofílico. Rangel et al⁵⁸ aumentaram a hidrofobicidade de silicone e poliuretano com plasmas de hexafluoreto de enxofre (SF₆). Essa versatilidade dos tratamentos a plasma tem sugerido seu uso em aplicações médicas^{57, 59}.

3. MÉTODOS EXPERIMENTAIS

3.1. Técnicas de Caracterização

3.1.1. Ângulo de Contato

Para a melhor compreensão da medida do ângulo de contato faz-se necessário o entendimento prévio dos conceitos de Tensão Superficial, Tensão Interfacial, Molhabilidade.

Basicamente a tensão superficial é o efeito que ocorre na camada superficial de um líquido. Moléculas no interior de uma substância líquida atraem umas às outras (força de coesão); uma molécula do interior será atraída por outras moléculas ao seu redor e, na média, não será observada nenhuma força resultante. Entretanto, as moléculas da superfície do líquido sofrem apenas forças laterais e inferiores, o que gera uma força resultante não nula no sentido do interior do líquido. Em virtude dessa resultante, as moléculas superficiais tendem a penetrar no interior do líquido e, em conseqüência a superfície tende a contrair-se espontaneamente para adquirir a menor área possível. Essa é a razão pela qual pequenas gotas de líquido ou bolhas de gás possuem a forma esférica.

Em uma superfície sólida, as partículas encontram-se em posições praticamente fixas, deste modo as propriedades superficiais devidas à mobilidade das partículas não são observadas. Desta forma, contrariamente as superfícies líquidas, as superfícies sólidas não se contraem, porém possuem energia superficial.

O conceito de tensão superficial também se aplica à superfície de separação entre duas substâncias quaisquer, sendo então denominada tensão interfacial.

Colocando uma gota de um líquido sobre uma superfície sólida o líquido pode espalhar-se inteiramente sobre a superfície sólida ou permanecer na forma de

gota, caso não molhe a superfície do sólido. Nos casos em que o líquido se espalha inteiramente sobre a superfície sólida, as forças coercivas (forças entre as moléculas do líquido) são maiores que as forças adesivas (forças entre sólido e líquido); o oposto acontece com os líquidos que permanecem na forma de gota. Desta forma, conclui-se que a adesão de um líquido sobre um sólido será melhor quanto maior for a força de coesão. Na figura 3.1 são mostradas 3 situações: na figura *a* ocorre o espalhamento total do líquido sobre a superfície sólida; na figura *b* ocorre o espalhamento parcial e na figura *c* não ocorre espalhamento.

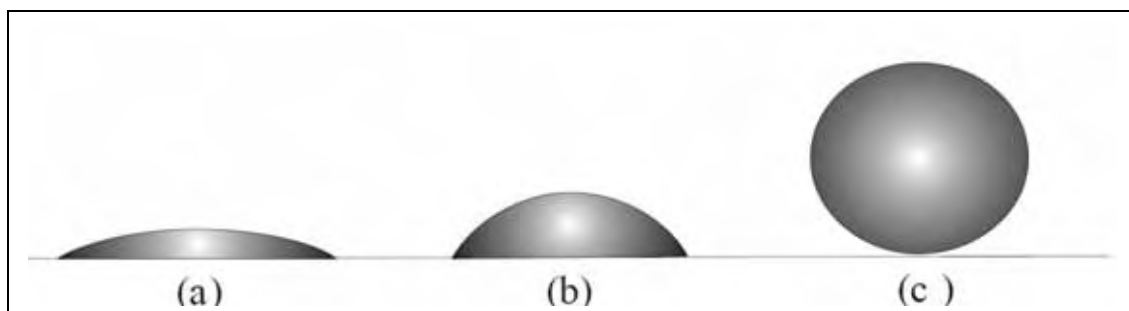


Figura 3.1: Molhabilidade em uma superfície sólida. Na *a* ocorre o molhamento total, na *b* o molhamento é parcial e na *c* não há molhamento⁶⁰. (Disponível em: <<http://www.lepten.ufsc.br/disciplinas/emc5416/aulas/aula02.pdf>>)

Uma das formas utilizadas para se conhecer a interação entre as superfícies de um sólido e um líquido pode ser feita através da medida de ângulo de contato (θ) que é definido como o ângulo entre um plano tangente a uma gota do líquido e um plano contendo a superfície onde o líquido se encontra depositado, conforme esquematizado na Figura 3.2.

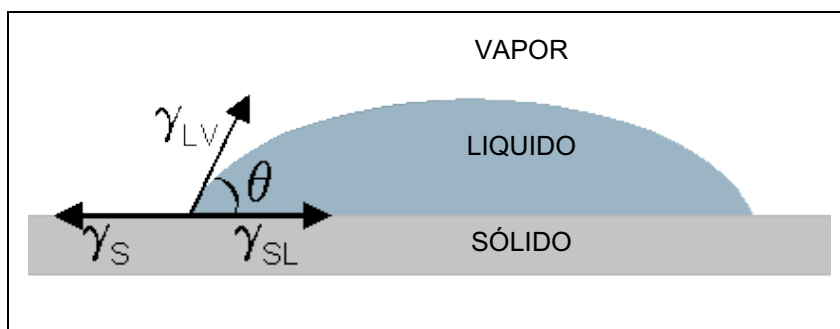


Figura 3.2: Definição do ângulo de contato θ entre uma gota líquida e uma superfície plana e horizontal. Na figura, γ_{LV} , γ_{SL} e γ_S significam respectivamente tensão superficial do líquido em equilíbrio com o vapor, tensão da interface sólido-líquido e tensão superficial do sólido-vapor⁶¹ (Disponível em: <<http://www.sorocaba.unesp.br/gpm/angulo%20cont%20energia%20superf.htm>>)

O ângulo de contato de uma interface líquida depende das propriedades físicas dos três meios de contato (sólido líquido e vapor). As tensões superficiais resultantes da interação entre os três meios, representadas por γ_{SL} (sólido-líquido), γ_S (sólido-vapor) e γ_{LV} (líquido vapor) são as responsáveis pelas forças superficiais que agem na interface. O ângulo de contato θ é determinado a partir de um balanço de forças na direção horizontal que deve ser igual a zero para uma gota em equilíbrio estático. Desta forma:

$$\gamma_S = \gamma_{SL} + \gamma_{LV} \cos \theta \quad (3.1)$$

A equação 3.1 é conhecida como Fórmula de Neumann ou Equação de Young.

Em virtude da atração existente entre as moléculas das fases sólida e líquida, é necessário realizar trabalho para separar as duas fases, denominado

trabalho de adesão (τ_A). Esse trabalho irá separar as duas fases em duas interfaces: sólida-vapor e líquida-vapor. Desta forma, o trabalho de adesão é dado por:

$$\tau_A = \gamma_{LV} + \gamma_S - \gamma_{SL} \quad (3.2)$$

A equação 3.2 é conhecida como Equação de Dupré. Esta equação contém termos (γ_S, γ_{SL}) que são de medidas difíceis e inexatas.

Combinando as equações 3.1 e 3.2 obtêm-se:

$$\tau_A = \gamma_{LV}(\cos\theta + 1) \quad (3.3)$$

Esta equação é conhecida como Equação Young-Dupré.

Assim, conhecendo a tensão superficial do líquido e medindo o ângulo de contato entre a gota de líquido e a superfície sólida é possível determinar o trabalho de adesão para a interface líquido-sólido. O trabalho de adesão será maior quanto maior for a molhabilidade do líquido, isto é, quanto maior for a afinidade do líquido com a superfície sólida.

Quando $\theta = 0^\circ$, $\cos \theta = 1$ e, portanto, $\tau_A = 2\gamma_{LV}$. Neste caso, o trabalho de adesão líquido-sólido iguala ou supera o trabalho de coesão do líquido. O ângulo de contato igual à 0° é um caso extremo de máxima afinidade química entre a superfície e o líquido e, portanto, haverá espalhamento completo do líquido no sólido.

Para $\theta = 180^\circ$, $\cos \theta = -1$ e, portanto, $\tau_A = 0$. Neste caso, o líquido não possui qualquer interação com a superfície sólida.

A modificação química da superfície, por reação ou adsorção pode ser usada para aumentar ou diminuir o ângulo de contato, influenciando assim no molhamento do sólido pelo líquido, visando atingir a característica superficial desejada.

Há vários métodos para se fazer medidas de ângulo de contato. Para os experimentos realizados θ foi determinado por um goniômetro automatizado (Ramé-Hart 100-00) que, através de uma câmera CCD (dispositivo de carga acoplado), captura a imagem da gota depositada sobre o material. Um programa de tratamento de imagens determina o perfil desta gota e então calcula o ângulo de contato.

3.1.2. Espectroscopia de Absorção no Infravermelho

A radiação infravermelha se encontra no espectro magnético entre as regiões correspondentes às microondas e a luz visível, isto é, entre 200 a 12500 cm^{-1} . A região compreendida entre 400 e 4000 cm^{-1} é a de maior importância para a Espectroscopia de Absorção no Infravermelho, por corresponder à faixa de energia das vibrações de um grande número de ligações químicas.

Qualquer ligação entre dois átomos vibra fazendo com que a separação interatômica oscile. Esse tipo de movimento é chamado de estiramento. As moléculas podem também realizar vibrações de dobramento nas quais os ângulos entre ligações ou entre planos atômicos variam periodicamente. A frequência com que uma ligação vibra depende da massa dos átomos envolvidos e da força da ligação. Desta forma, uma molécula constituída de átomos leves unidos por ligações fracas tem frequência vibracional mais alta do que uma molécula constituída de átomos pesados unidos por ligações fortes. Sendo assim a primeira molécula irá

absorver radiações de frequências mais altas que a última. Movimentos de dobramento das moléculas tendem a envolver energias menores que os movimentos de estiramento. Assim as vibrações de dobramento normalmente ocorrem em frequências mais baixas que as vibrações de estiramento⁶².

A absorção da radiação infravermelha depende do aumento da amplitude de vibração ou de rotação associado a uma ligação covalente, desde que esse aumento resulte em uma variação do momento dipolar da molécula. Isso significa que quase todas as moléculas contendo ligações covalentes apresentarão algum grau de absorção seletiva no infravermelho⁶³. Cada grupo funcional vibra com frequências características resultando em um espectro de absorção no infravermelho. Uma das formas mais comuns de realizar a identificação de um composto através de seu espectro de absorção no infravermelho se dá através da comparação das frequências das absorções com frequências observadas em espectros de padrões⁶⁴. Outras formas envolvem o estudo de absorção separadamente em determinadas frequências (picos ou bandas) e até cálculos matemáticos sobre a posição estimada da absorção de determinado segmento molecular. Através disso é possível que se identifique a composição química e a estrutura molecular de amostras sólidas, líquidas e gasosas⁶⁵.

Para as medidas feitas nesse trabalho, foi utilizado o Espectrômetro Jasco FTIR 410 pertencente ao LaPTeC – Laboratório de Plasmas Tecnológicos da UNESP, campus de Sorocaba. Esse equipamento é equipado com acessórios para medidas de transmitância, refletância total atenuada (ATR), refletância difusa (DRIFT) e refletância espectral com polarização e ângulo de incidência variáveis.

3.2.Método de Contagem Bacteriana

Existem diferentes métodos para quantificar o crescimento de uma população bacteriana. Os mais comuns são o Método da contagem em placas, filtração, método do número mais provável e contagem direta ao microscópio⁶⁶,e Turbidimetria.

3.2.1.Método da Contagem em Placas

Este método é o mais utilizado para determinação do tamanho de uma população bacteriana. Possui como vantagem a quantificação de células viáveis. A principal a desvantagem desta técnica é o tempo, em geral de 24 horas, para o aparecimento de colônias visíveis em meios de cultura depositados em placas de petri⁶⁶.

O método da contagem em placas considera que cada colônia é formada a partir do crescimento e multiplicação de uma única bactéria. Entretanto isso nem sempre é verdade, pois as bactérias podem crescer em cadeias ou como aglomerados. Portanto uma colônia pode ser resultante não de uma bactéria, mas de uma cadeia ou aglomerado de bactérias. Em função disso, o que se observa nas placas é chamada de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)⁶⁶.

Existem duas metodologias para se realizar a contagem de bactérias em placa, o método de espalhamento em placa e o Pour Plate.

3.2.1.1.Método Pour Plate

O método Pour Plate é uma técnica bastante utilizada. O inóculo (bactérias em suspensão em meio nutriente) pode ser produzido a partir de um volume de 1 ml ou 0,1 ml da suspensão nutritiva que contém as bactérias e aplicada diretamente na placa de petri. O meio nutriente, mantido em banho-maria a 50° C para impedir a solidificação do agar, é vertido sobre a alíquota de bactérias e meio nutritivo e homogeneizada através de agitação suave da placa. Após a solidificação do agar, a placa é incubada na temperatura de crescimento da bactéria. Essa metodologia permite o crescimento das colônias derivadas das células que foram misturadas no agar durante a solidificação assim como na superfície do agar nutriente⁶⁶.

Na primeira fase dos ensaios microbiológicos deste trabalho utilizou-se a metodologia de pour plate para a contagem das bactérias. Resumidamente, o procedimento era constituído pelas seguintes etapas:

- a)** Adição do inóculo em uma placa de petri sem meio de cultura;
- b)** Adição do agar levemente fundido (aproximadamente a 45 °C) à placa;
- c)** Agitação suave da placa para misturar o agar e o inóculo;

Simultaneamente a essas etapas, foi feito o mesmo procedimento para as amostras, tanto as amostras de poliuretano tratadas quanto o controle. Para isso, repetiu-se as etapas b e c.

3.2.2.Turbidimetria

A Turbidimetria é um método de análise quantitativa de soluções coloidais ou de suspensões, baseado na medição da absorção de luz. As medidas podem ser

realizadas em espectrofotômetros de leitor do teste Elisa. Esta técnica é baseada nos conceitos teóricos da Espectrofotometria. É bastante precisa e mede a quantidade de bactérias que estão na solução onde está a amostra do polímero. Se a concentração inicial de bactérias colocadas na solução é conhecida, a diferença entre esta quantidade inicial e a quantidade que está na solução nos dará a quantidade que está na placa. Quanto maior a concentração de bactérias na solução a ser analisada, menor será a absorbância da luz.

A espectrofotometria é um método de quantificação baseada na comparação entre a intensidade de radiação absorvida por uma solução que contém uma quantidade desconhecida de soluto e a intensidade absorvida por uma solução padrão da mesma substância^{62,63}.

A transmitância exprime a fração da energia luminosa que consegue atravessar uma determinada espessura de um material, sem ser absorvida por ele. Analogamente, a absorbância é a razão entre as intensidades absorvida e incidente.

Transmitância e absorbância tendem a ser grandezas complementares. Isto é, a soma delas (para a mesma energia e comprimento de onda incidente) é aproximadamente igual a 1. A diferença entre esta soma e a unidade é devida ao espalhamento da radiação nas interfaces envolvidas^{62,63}.

A relação entre absorbância e as propriedades de um material pode ser compreendida através da Lei de Beer-Lambert. Simplificadamente, esta lei mostra que há uma relação exponencial entre a intensidade de luz transmitida através de uma substância e a concentração desta substância, assim como também entre a transmissão e a distância percorrida pela radiação no meio. Se l (comprimento da cubeta) e α (coeficiente de absorção da substância) são conhecidos, a concentração da substância pode ser deduzida a partir da intensidade de luz transmitida⁶⁷.

A figura 3.3 ilustra a atenuação de um feixe com intensidade inicial I_0 ao percorrer uma distância l em um meio com concentração e coeficiente de absorção α .

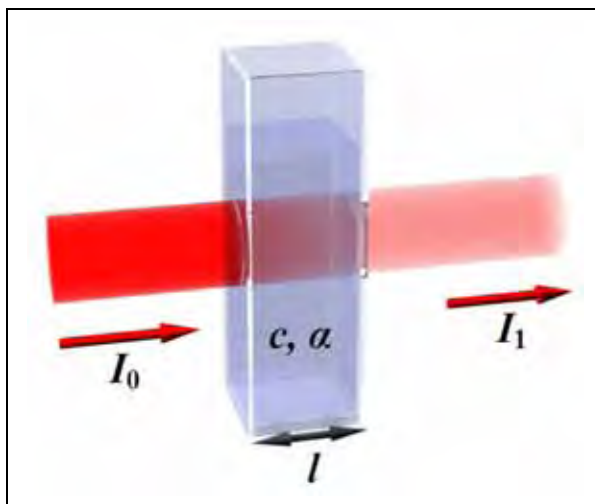


Figura 3.3: Representação da atenuação de um feixe de luz atravessando uma cubeta de comprimento l , contendo um meio com concentração C e coeficiente de absorção α ⁶⁷.
(Disponível em: http://pt.wikipedia.org/wiki/Lei_de_Beer-Lambert).

Matematicamente a Lei de Beer Lambert pode ser escrita como:

$$A = -\log \frac{I_1}{I_0} = \alpha l c \quad (3.4)$$

Onde A é a absorbância; I_0 e I_1 são as intensidades da luz incidente e transmitida pela amostra⁶⁷.

Em microbiologia, a análise espectrofotométrica relaciona a turbidez (absorbância) de uma cultura com a concentração de células. Quanto mais turva a cultura, maior a concentração celular. A Turbidimetria mede a intensidade de luz transmitida em diferentes comprimentos de onda. Quanto menor a intensidade, maior é a concentração celular da suspensão⁶⁶.

Neste trabalho utilizou-se o Espectrofotômetro leitor Elisa (marca Bio Tek Instruments®, modelo ELX 800), existente no Laboratório de Biomateriais, da PUC (Pontifícia Universidade Católica), em Sorocaba.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Equipamento utilizado

A figura 4.1 mostra o sistema que foi empregado nos tratamentos e se encontra em operação no Laboratório de Plasmas Tecnológicos – LaPTec, no Campus Experimental da Unesp em Sorocaba. O sistema consiste de um reator cilíndrico feito em aço inoxidável com capacidade de 6 litros, evacuado por uma bomba rotativa de palhetas de 18 m³/h. A bomba permanece em funcionamento durante toda a operação mantendo a renovação dos gases no interior do reator. A pressão no reator é monitorada por um medidor de membrana capacitiva e o fluxo de gás é controlado por válvulas agulha. A energia para gerar o plasma é fornecida por uma fonte de radiofrequência (13,56 MHz, com até 150 W de potência). No interior da câmara, há dois eletrodos de aço inoxidável com formato de discos, sendo que o eletrodo inferior também desempenha a função de porta-amostras. Um dos eletrodos recebe a radiofrequência e o outro é aterrado.

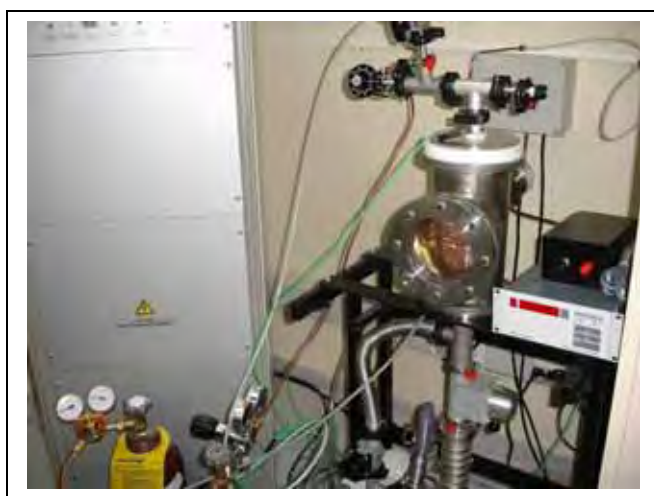


Figura 4.1: Sistema de geração de plasma - LaPTec.

4.2.Materials

No tratamento a plasma utilizou-se o gás SF₆ (hexafluoreto de enxofre) da White Martins (com pureza mínima de 99,9%). Em uma primeira fase de experimentos foram utilizadas como amostras discos de poliuretano cortados com um gabarito com diâmetro de 1,5 cm. Na segunda e última fase de experimentos, foram utilizadas amostras de poliuretano e silicone comercialmente puros, da Manneflon Indústria e Comercio Ltda, cortadas de forma retangular com área de 0,25 cm².

As análises microbiológicas foram feitas pela equipe da Prof^a. Dr^a. Patrícia Santos Lopes, da UNISO (Universidade de Sorocaba). Para essas análises foram utilizadas cepas do *Staphylococcus aureus* ATCC6538 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Em um segundo conjunto de experimentos foi utilizado dois tipos de equipamento para medidas de absorbância, um Quick Elisa e o Leitor Elisa Bio-Tek Instruments, este último pertencente ao Laboratório de Biomateriais da PUC (Pontifícia Universidade Católica) de Sorocaba, coordenado pela Prof^a. Dr^a. Eliana Duek.

4.3.Métodos – Fluxograma dos experimentos

A seguir estão dois fluxogramas que mostram os experimentos realizados e os métodos de análise e quantificação das bactérias.

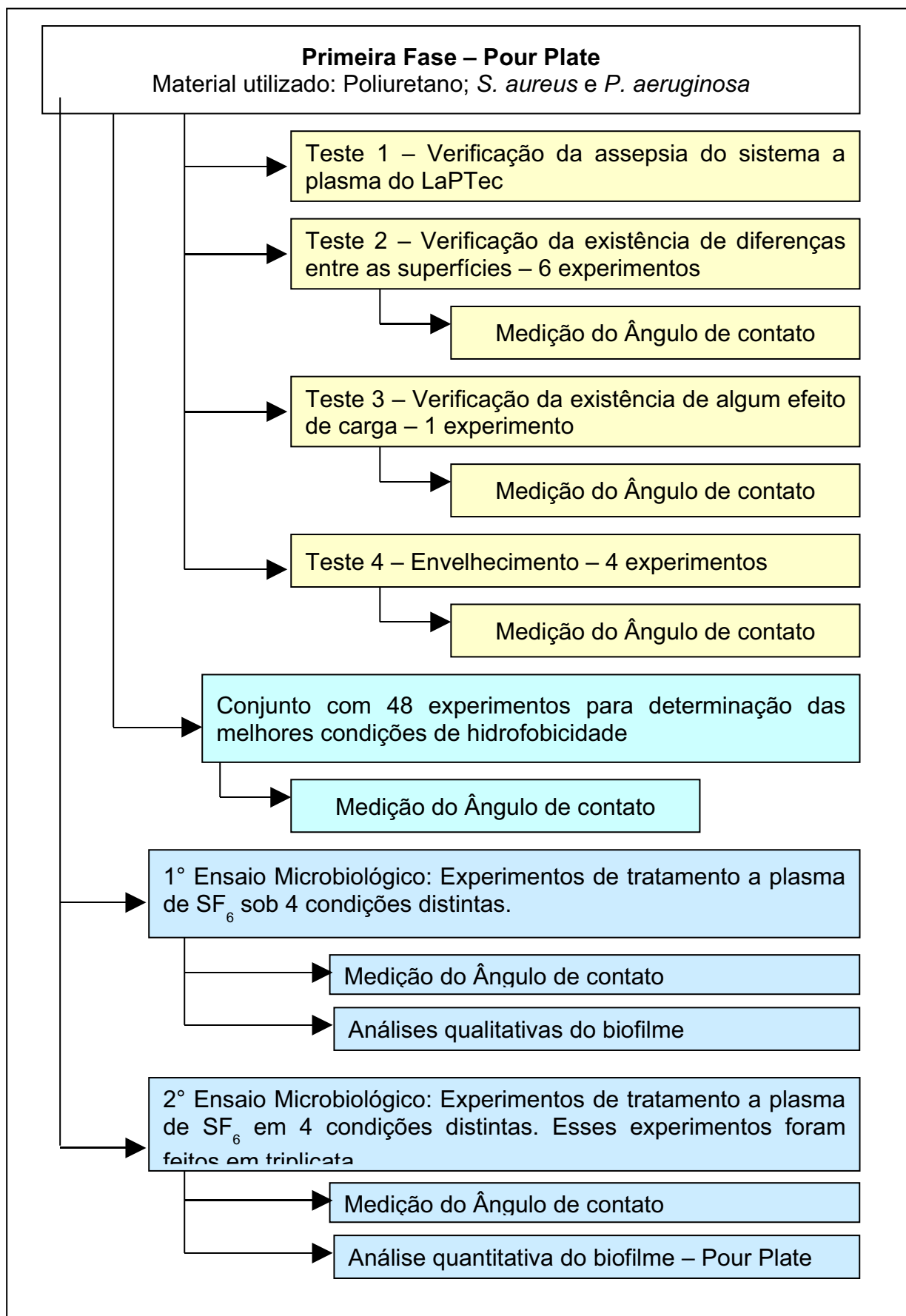


Figura 4.2: Fluxograma da primeira fase de experimentos

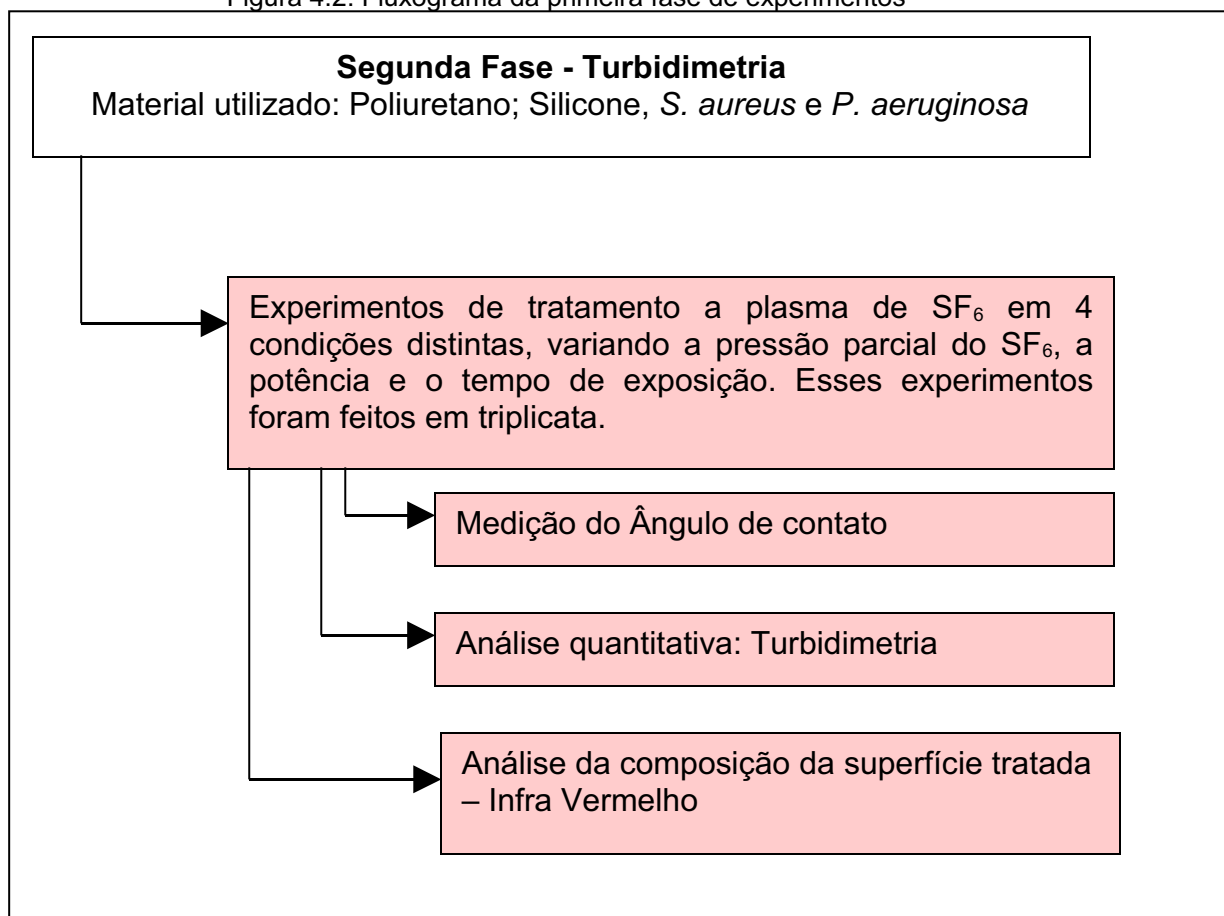


Figura 4.3: Fluxograma da segunda fase de experimentos

4.4. Tratamento superficial

Neste trabalho, foram feitos diversos tratamentos a plasma utilizando SF₆ para que fossem obtidas superfícies com diferentes níveis de hidrofobicidade.

Antes de qualquer tratamento, as amostras eram cuidadosamente lavadas em banhos ultrasônicos durante 15 minutos com detergente, água corrente, água destilada e álcool isopropílico, nesta seqüência. Após a agitação com detergente, as amostras eram enxaguadas individualmente em água corrente. Após o banho com álcool isopropílico, as amostras eram secadas com um soprador de ar quente e então acondicionadas em placas de petri estéreis.

As amostras limpas eram posicionadas sobre o eletrodo inferior, a câmara era evacuada até pressão da ordem de 4,8 Pa, a pressão do gás era ajustada e então era ligada à fonte de radiofrequência por um período pré-determinado.

Para garantir a eficiência dos tratamentos foram feitos quatro testes no sistema de plasma. Nos testes 2, 3 e 4 foram utilizados amostras de poliuretano de 1,5 cm de diâmetro.

Teste 1: Verificação da assepsia do reator: para verificar a assepsia do reator foi posto dentro do reator uma placa de petri com meio de cultura e deixado durante 30 minutos, tempo necessário para, se houvesse bactérias, o meio de cultura fosse contaminado. Esse teste foi feito em triplicata.

Teste 2: Verificação de possíveis diferenças entre as superfícies da mesma amostra: este segundo teste foi feito para verificar se as duas superfícies de um mesmo disco apresentavam diferenças após os tratamentos. As amostras de poliuretano apresentavam duas faces diferentes uma da outra. Uma delas era mais brilhante que a outra. A superfície mais brilhante foi chamada de superfície 1 e a opaca de superfície 2. Foram realizados seis experimentos, variando-se a pressão de SF₆, potência do plasma e tempo de exposição conforme resumido na Tabela 3:

Tabela 3: Condições empregadas nos testes para verificação de diferenças nas superfícies do poliuretano (teste 2). No experimento 1 a pressão de SF₆ foi de 6,67 Pa enquanto nos demais experimentos usou-se 13,33 Pa desse gás.

Condição	Potência (W)	Tempo de Tratamento (s)
1	70	180
2	50	180
3	70	120
4	70	180
5	100	180
6	70	300

As amostras foram presas a percevejos como mostra a figura 4.4. Desta forma elas podiam ser posicionadas sobre o eletrodo com as duas faces simultaneamente expostas ao plasma.

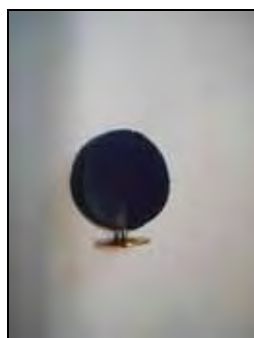


Figura 4.4: Amostra presa ao percevejo

Após os ensaios, foram feitas medidas de ângulo de contato em ambas as superfícies de cada amostra testada. Os valores apresentados para os ângulos de contato são a média aritmética de 10 medidas.

Teste 3: Verificação da existência de algum efeito de carga: como eram necessárias no mínimo seis amostras para os testes microbiológicos, uma amostra

para medição do ângulo de contato e outra para reserva, para que um conjunto de corpos-de-prova fosse produzido em uma mesma descarga, as amostras estariam distribuídas sobre todo o eletrodo. Com isso, dependendo da posição ocupada no eletrodo as amostras poderiam receber tratamentos diferentes, o que foi chamado de efeito de carga. Para se verificar a homogeneidade no tratamento oito amostras presas a percevejos foram dispostas sobre a superfície do eletrodo, conforme mostrado na figura 4.5. O tratamento foi realizado na condição 1 do teste 2.



Figura 4.5: Conjunto de 8 amostras no reator.

Para verificar os possíveis desvios de tratamento entre as superfícies de oito amostras tratadas, foram feitas medições dos ângulos de contato.

Teste 4: Envelhecimento: alguns estudos sugerem que, algum tempo após a exposição do polímero ao plasma, há aumento da hidrofobicidade da superfície tratada⁶⁸. Como o caráter hidrofóbico é o desejado, testaram-se amostras de poliuretano para observar a variação da hidrofobicidade em função do tempo após o tratamento. Para esse teste foram realizados quatro experimentos; as condições empregadas nos tratamentos são apresentadas na Tabela 4:

Tabela 4: Variáveis utilizadas no experimento de envelhecimento, a pressão parcial de SF₆ foi mantida constante e igual a 13,33 Pa.

Condição	Potência (W)	Tempo de Tratamento (s)
1	70	180
2	70	120
3	80	180
4	120	180

Foram feitas medidas de ângulo de contato imediatamente após o tratamento, 7, 14, 21 e 29 dias após a exposição ao plasma.

Após a realização destes testes e com a análise dos dados obtidos, deu-se início a um conjunto de experimentos para verificação das melhores condições para posteriormente se fazer os ensaios microbiológicos. Foram feitos 48 experimentos, cujas condições se encontram resumidas nas Tabelas 5, 6 e 7. Sete dias após a realização dos tratamentos foram feitas medidas de ângulo de contato em todas as amostras.

Tabela 5: Condições dos testes para definição dos tratamentos a serem aplicados a amostras para os ensaios microbiológicos. Pressão parcial de SF₆ constante e igual a 6,67 Pa em todos os tratamentos.

Condição	Potência (W)	Tempo de Tratamento (s)
1	70	60
2	70	120
3	50	180
4	60	180
5	70	180
6	80	180
7	90	180
8	100	180
9	70	240
10	70	300
11	80	300
12	90	300
13	100	300
14	120	300
15	70	360
16	70	420
17	70	450
18	70	480
19	70	510
20	70	540
21	70	570
22	70	600

Tabela 6: Condições dos testes para definição dos tratamentos a serem aplicados a amostras para os ensaios microbiológicos. Em todos os casos a potência foi mantida em 70 W.

Condição	Tempo de Tratamento (s)	Pressão Parcial de SF₆ (Pa)
23	180	8,00
24	180	9,33
25	180	10,67
26	180	12,00
27	300	20,00
28	60	133,30

Tabela 7: Condições dos testes para definição dos tratamentos a serem aplicados a amostras para os ensaios microbiológicos. Em todos os casos a pressão parcial de SF₆ foi mantida constante e igual a 13,33 Pa.

Condição	Potência (W)	Tempo de Tratamento (s)
29	70	60
30	70	120
31	10	180
32	20	180
33	30	180
34	40	180
35	50	180
36	60	180
37	70	180
38	80	180
39	90	180
40	100	180
41	110	180
42	120	180
43	70	240
44	70	300
45	70	360
46	70	420
47	70	480
48	70	540

4.5.Tratamento a plasma e ensaios microbiológicos

Baseado nas medidas de ângulo de contato resultante da série de 48 experimentos, realizou-se então um novo conjunto com 4 experimentos. Utilizando amostras de poliuretano com diâmetro de 1,5 cm, as condições empregadas listadas na Tabela 8, foram aquelas que resultaram em superfícies mais hidrofóbicas.

Tabela 8: Variáveis utilizadas no tratamento de amostras para os ensaios microbiológicos.

Condição	Potência (W)	Tempo de Tratamento (s)	Pressão Parcial de SF₆
1	70	180	6,67
2	120	180	13,33
3	70	240	13,33
4	70	540	13,33

Para evitar a contaminação antes do processo de inoculação, as amostras foram manipuladas utilizando-se pinça e vestimenta (avental, touca e máscara) assépticas. Após o tratamento as amostras eram colocadas em placas de petri estéreis abertas no momento do uso.

Os testes microbiológicos eram iniciados sete dias após a exposição ao plasma.

4.5.1. Metodologia utilizada nos ensaios microbiológicos

Os ensaios microbiológicos foram feitos pela aluna de Iniciação Científica do curso de Farmácia da UNISO (Universidade de Sorocaba) Fabiana de Carvalho Borges e pela aluna de Iniciação Científica do curso de Biotecnologia da UNISO Verônica Maria Moysés Martins, sob supervisão e orientação da Prof^a. Dr^a. Patrícia Santos Lopes.

Primeira fase – Pour Plate

Primeiro ensaio microbiológico: Amostras em triplicata com os diferentes tipos de tratamentos, assim como a amostra-controle, isto é, um disco de poliuretano

como recebido, foram inoculadas em tubos com 100ml de BHI (Brain Heart Infusion, marca Oxoid®) caldo contendo 10^6 UFC/ml de *Staphylococcus aureus*. Os tubos foram incubados a 37° C por até 7 dias, sendo que no segundo, quarto e sétimo dias após a incubação as amostras de poliuretano de cada condição e a amostra controle foram transferidas para uma placa petri com agar para análise qualitativa da formação do biofilme. O mesmo procedimento foi feito simultaneamente para a *Pseudomonas aeruginosa*.

Segundo ensaio microbiológico: Amostras em triplicata com os diferentes tipos de tratamentos, assim como a amostra-controle, isto é, um disco de poliuretano como recebido, foram inoculadas em tubos com 100ml de BHI (Brain Heart Infusion, marca Oxoid®) caldo contendo 10^6 UFC/ml de *Staphylococcus aureus*. Os tubos foram incubados a 37° C por até 7 dias. Ao final do segundo dia foi retirada uma amostra de poliuretano de cada condição e a amostra controle dos tubos com BHI. As amostras eram então levemente enxaguadas e transferidas para um enlenmeyer contendo solução salina estéril e incubadas novamente por 48 horas. Após este período plaqueou-se em profundidade as soluções derivadas de cada amostra tratada e também o controle. Repetiu-se esse procedimento após quatro e sete dias da incubação com BHI. Este procedimento também foi aplicado para a *Pseudomonas aeruginosa*. A Figura 4.6 ilustra a seqüência das operações realizadas nesse procedimento.

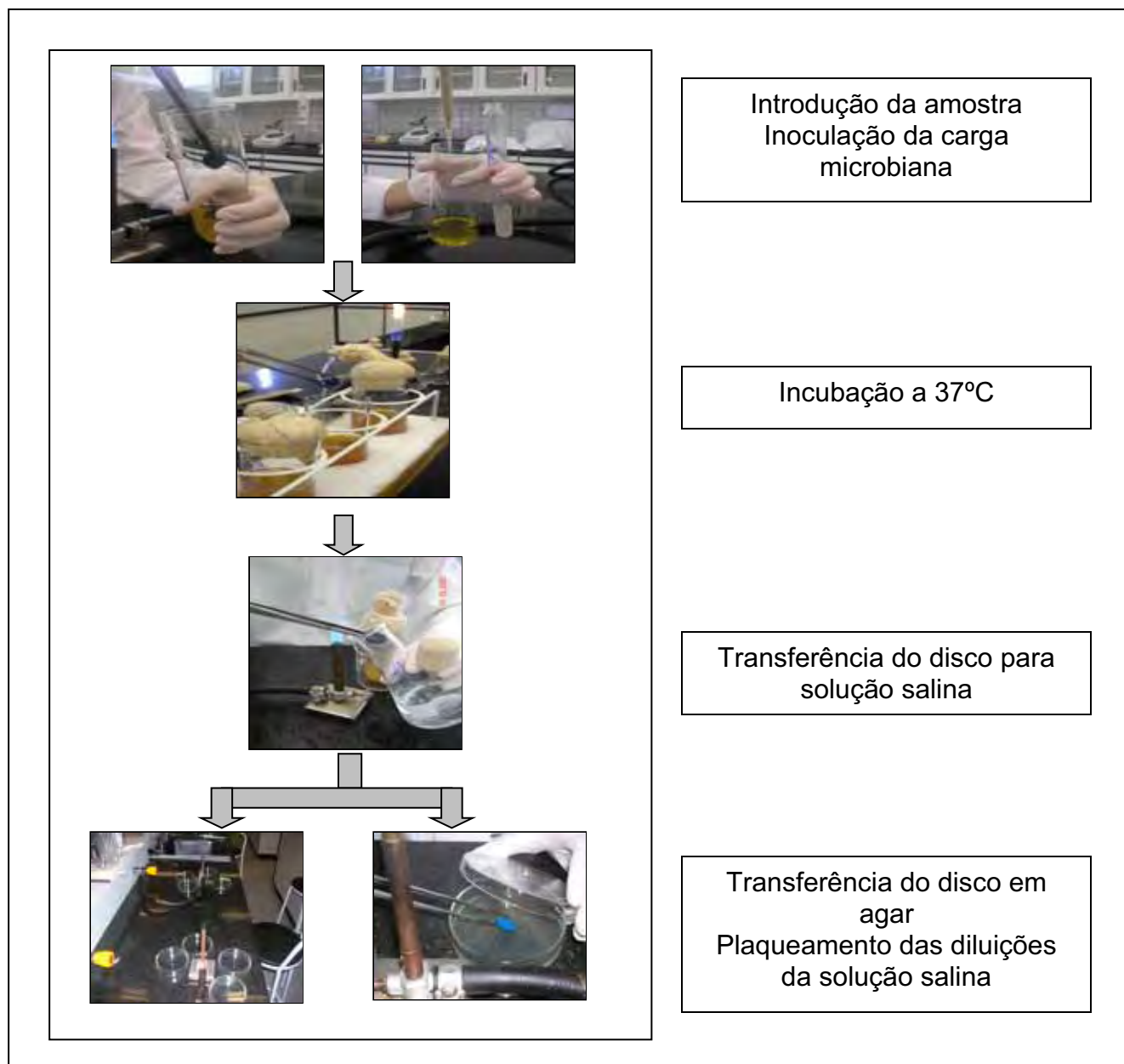


Figura 4.6: Fotografias mostrando a sequência de operações utilizadas no Método Pour Plate

Nesta fase do trabalho, a contagem dos microrganismos foi feita de forma direta, ou seja, conta-se microscopicamente o número de células presentes em um determinado material ou superfície. Esse método requer o uso de câmeras de contagem especiais, chamada contador de colônia. Uma alíquota de uma suspensão de cultura bacteriana é contada e o número de células é calculado matematicamente.

A partir dos resultados obtidos nessa primeira fase dos ensaios microbiológicos e de uma pesquisa bibliográfica que indicou a ausência de uma metodologia padrão para quantificação das bactérias aderidas, optou-se por substituir o método Pour Plate pela Turbidimetria.

Segunda fase – Turbidimetria

Para esta fase do trabalho, foram escolhidas as mesmas condições de tratamento utilizadas para as amostras que foram inoculadas para o método Pour Plate. As condições utilizadas são listadas na Tabela 9.

Tabela 9: Condições utilizadas nos tratamentos para os ensaios microbiológicos realizados em leitor Elisa.

Condição	Potência (W)	Tempo de Tratamento (s)	Pressão Parcial de SF₆
1	70	180	6,67
2	120	180	13,33
3	70	240	13,33
5	70	540	13,33

A partir deste momento decidiu-se tratar também silicone, além do poliuretano. Essa decisão foi feita com base na diversidade de dispositivos médicos que utilizam silicone como principal matéria prima⁶⁹. Amostras retangulares de poliuretano e silicone foram fixadas em percevejo e posicionadas sobre o eletrodo inferior para os tratamentos. Após cada tratamento era repetido o procedimento asséptico para retirada e armazenamento das amostras.

Os estudos do envelhecimento do tratamento mostraram que os maiores valores de ângulo de contato foram obtidos logo após o tratamento. Em função disso, optou-se pela inoculação das amostras de poliuretano e silicone um dia após a realização dos tratamentos.

Paralelamente aos tratamentos a plasma, foi realizada a padronização das suspensões de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* determinando a concentração microbiana destas suspensões. Para o *S. aureus* foi obtida uma carga de $1,11 \times 10^6$ UFC por gota de suspensão. Para a suspensão de *P. aeruginosa* verificou-se a presença de $3,8 \times 10^6$ UFC/gota.

Para obtenção de uma solução contendo 10^6 UFC/ml dos microrganismos anteriormente citados, dois erlenmeyers contendo 40 ml de caldo enriquecido (Tryptona de Soja – TSB, Oxoid®) cada um, receberam uma alíquota de 18 µl e 53 µl das suspensões padronizadas de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente.

Os caldos contendo *Staphylococcus aureus* ou *Pseudomonas aeruginosa* foram distribuídos separadamente, em uma microplaca de 24 poços (TPP®) na quantidade de 1,5 ml por poço, conforme mostra a Figura 4.7. Dos 24 poços, quatro não foram utilizados.

AC – PU - Pa	A1 – PU – PA	A2 – PU - Pa	A3 – PU - Pa	A4 – PU - Pa
AC – SI - Pa	A1 – SI – PA	A2 – SI - Pa	A3 – SI - Pa	A4 – SI - Pa
AC – PU - Sa	A1 – PU – As	A2 – PU - Sa	A3 – PU - Sa	A4 – PU - Sa
AC – SI - Sa	A1 – SI – As	A2 – SI - Sa	A3 – SI - Sa	A4 – SI - Sa

Figura 4.7: Representação esquemática da divisão da microplaca de 24 poços TPP®

Legenda:

AC: Amostra Controle

A1: Amostra tratada na condição 1

A2: Amostra tratada na condição 2

A3: Amostra tratada na condição 3

A4: Amostra tratada na condição 4

PU: Poliuretano

SI: Silicone

Pa: *Pseudomonas aeruginosa*

Sa: *Staphylococcus aureus*

Essa divisão foi feita para que não houvesse contaminação ou troca das bactérias e amostras.

Com o auxílio de uma pinça, três amostras tratadas de cada condição de cada polímero e a amostra-controle foram transferidas para seus respectivos poços na microplaca. Cada amostra corresponde ao período de incubação (24, 48 e 120 horas).

A microplaca foi incubada a 35° C em estufa bacteriológica (marca Quimis® Q-316.24) por um período de sete dias. Ao longo deste período uma amostra foi retirada da estufa 24 horas após o início da incubação; as outras permaneceram na estufa, sendo que a segunda amostra foi retirada após 48 horas e a terceira após 120 horas da incubação. Imediatamente após cada retirada, com o auxílio de uma pinça estéril transferiu-se uma amostra tratada e o controle para tubos de ensaio (um tubo para cada amostra) contendo 4 ml de solução salina (NaCl 0,85% vol., marca Synth®). Este procedimento foi realizado para os dois microrganismos e os dois polímeros.

Os tubos de ensaio contendo as amostras foram submetidos a agitação ultrassônica (UNIQUE®, Modelo USC-2800 A) por cinco minutos. Logo após, retirou-

se de cada tubo de ensaio uma alíquota de 100 µl que foi distribuída em poços de uma microplaca de 96 poços (TPP®). A disposição da microplaca permitiu a distribuição de quatro alíquotas de cada tubo de ensaio (quadruplicata). A Figura 4.8 mostra uma microplaca de 96 poços.

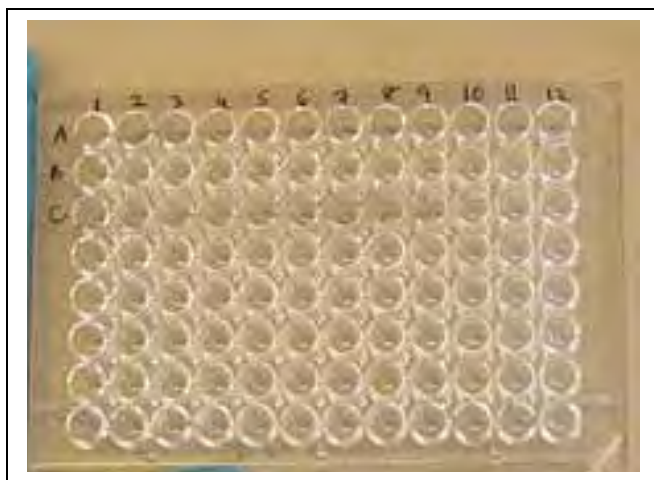


Figura 4.8: Fotografia de uma microplaca de 96 poços (TPP®). (Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Microplaca>).

Posteriormente à essa preparação, mediu-se a transmitância de cada poço em 340 nm com um leitor de Elisa.

Todos os materiais utilizados foram esterilizados em calor úmido (autoclave, modelo AV50, Phoenix®) ou calor seco (estufa esterilizante, modelo EL 1.6, Odontobrás®) de acordo com a natureza de cada um. A água utilizada para o preparo dos meios de cultura ou soluções salinas foi purificada por destilação (Destilador modelo Q-316.14, Quimis®).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1.Tratamento Superficial – Testes

Teste 1: Verificação da Assepsia do Reator

Após a retirada das placas de petri com agar do reator, elas foram incubadas à 37° C por 24 horas e não foi observada a presença de colônias de bactérias em nenhuma das placas. Isso mostra que o sistema de plasma do LaPTec é asséptico e portanto não contamina as amostras durante o tratamento.

Teste 2: Verificação de possíveis diferenças entre as superfícies da mesma amostra

A figura 5.1 mostra os ângulos de contato das duas superfícies das amostras tratadas em diferentes condições. Como pode ser observado, com exceção das condições 3, 4 e 6 não há grandes discrepâncias entre os ângulos de contato das duas faces. As variações, quando presentes, podem ser atribuídas à diferentes rugosidades entre as superfícies devido ao processo de usinagem do polímero original. Importante ressaltar que as variações nas condições 3, 4 e 6 não foram maiores que 15%.

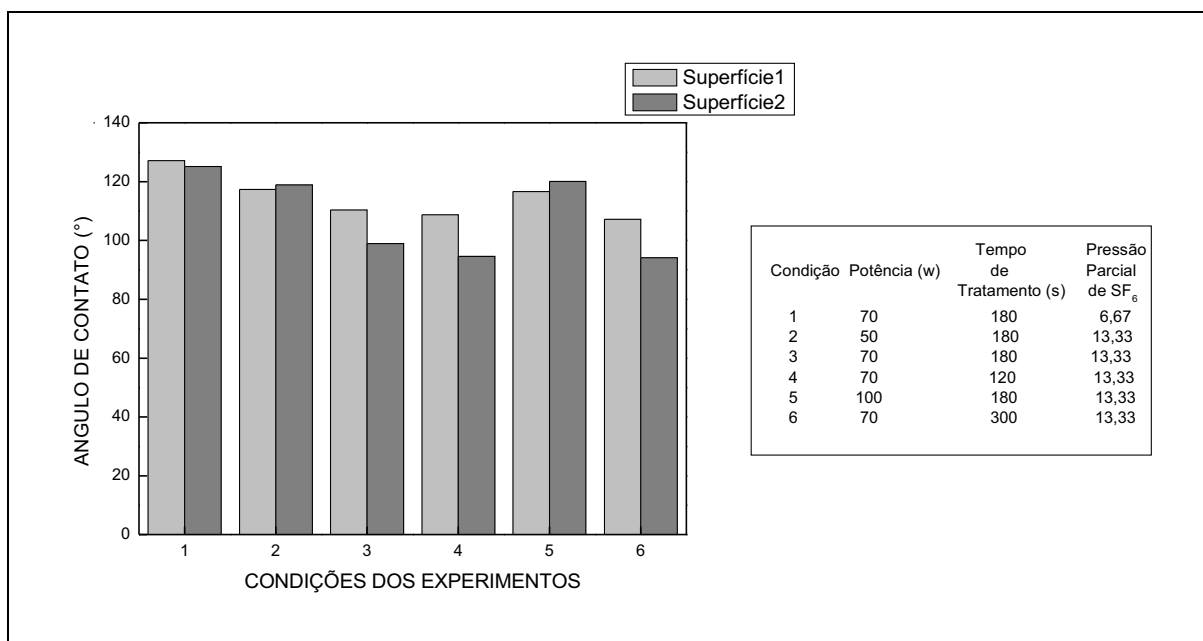


Figura 5.1: Ângulo de contato nas duas faces das amostras de poliuretano tratadas conforme as condições descritas na Tabela 2. As medidas encontradas nas superfícies 1 e 2 no poliuretano como recebido foram 89,25° e 90,89°, respectivamente.

Teste 3: Verificação da existência de algum efeito de descarga

A figura 5.2 mostra os valores dos ângulos de contato das oito amostras tratadas em uma mesma descarga, conforme descrito no Teste 3.

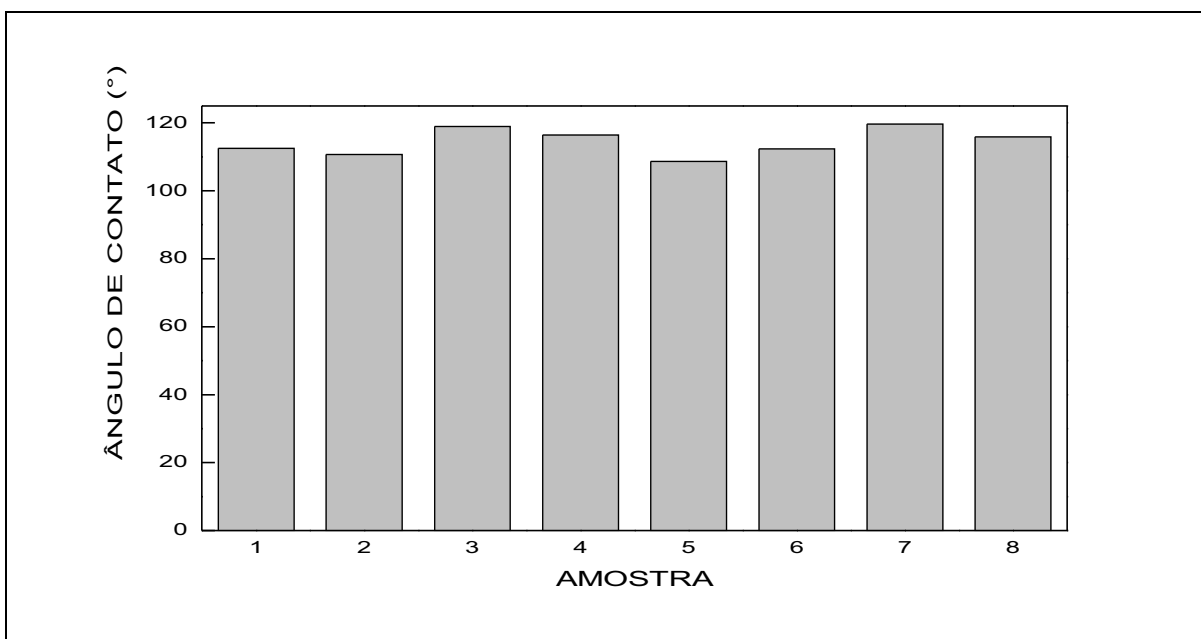


Figura 5.2: Ângulos de contato de diferentes amostras tratadas em uma mesma descarga. Os parâmetros utilizados nesse teste foram: pressão parcial de SF_6 6,67 Pa, potência 70 W, tempo de exposição ao plasma 180 s.

De acordo com esses resultados, constata-se que a dispersão entre os valores dos ângulos de contato é menor que 10%. Desta forma, pode se considerar, sem que se cometa grandes erros, que as amostras tratadas em uma mesma descarga são idênticas.

Teste 4: Envelhecimento

Foram feitas medidas de ângulo de contato imediatamente após o tratamento, 7, 14, 21 e 29 dias após exposição ao plasma.

A Figura 5.3 mostra a variação do ângulo de contato com o decorrer do tempo após exposição ao plasma.

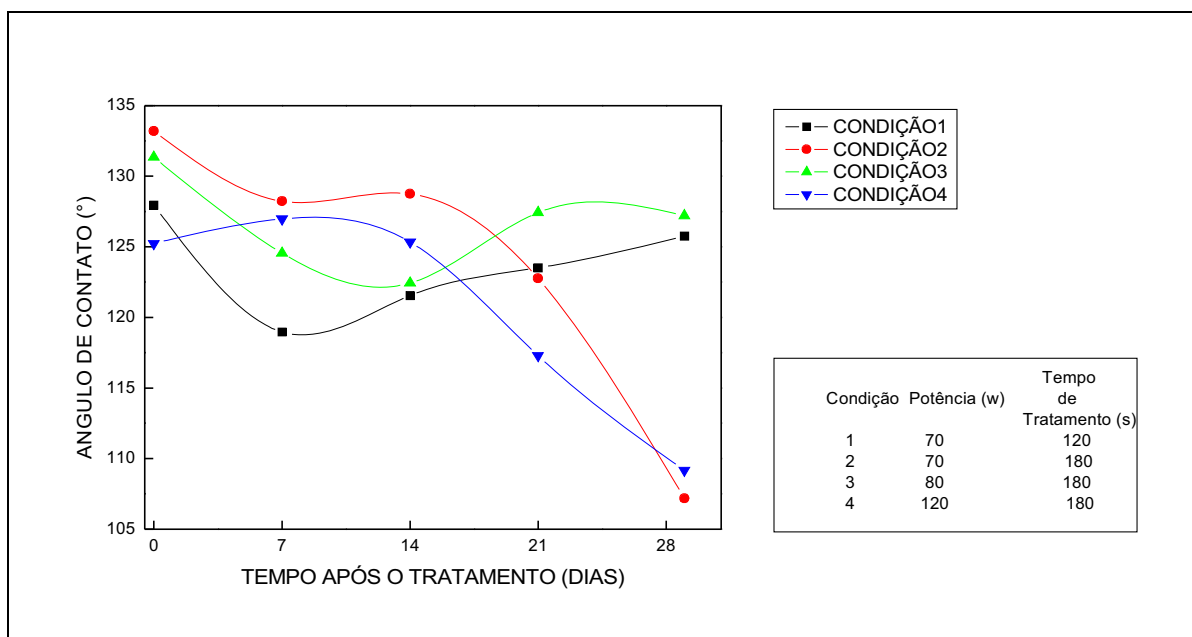


Figura 5.3: Ângulo de contato em função do tempo de envelhecimento de amostras de poliuretano tratadas nas condições dadas na Tabela 3. A pressão parcial de SF_6 foi mantida constante e igual a 13,33 Pa. O ângulo de contato medido na amostra sem tratamento foi de 92,7°

Com a figura acima é possível constatar que todos os tratamentos conferiram característica hidrofóbica à superfície. Os maiores valores de ângulo de contato foram obtidos nas medidas feitas imediatamente após o tratamento. Isso pode ser explicado pela provável incorporação de flúor na superfície das amostras. Sete dias após o tratamento houve uma redução inferior a 10% dos valores de θ . É interessante comentar que não se observa nenhuma relação clara entre as tendências de variação dos ângulos de contato e as condições de tratamento. Todavia deve-se ressaltar que mesmo após 29 dias todas as amostras ainda apresentavam ângulos de contato maiores do que o valor medido no polímero como recebido.

Como já exposto, após a realização destes 4 testes, foi feito um conjunto com 48 experimentos para definição das melhores condições para se realizar os

ensaios microbiológicos. As figuras 5.4, 5.5, 5.6, 5.7 e 5.8 mostram os valores do ângulo de contato das amostras sete dias após os tratamentos descritos.

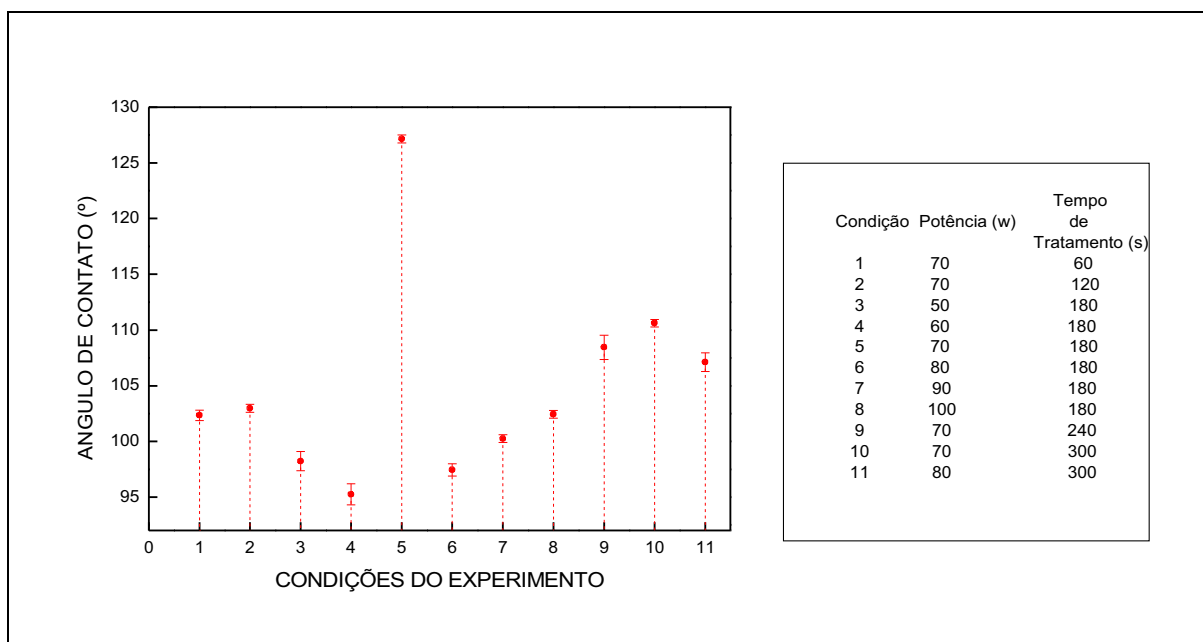


Figura 5.4: Ângulos de contato das amostras tratadas conforme as condições descritas na Tabela 5, com pressão parcial de SF_6 constante e igual a 6,67 Pa em todos os tratamentos, medidos 7 dias após o tratamento.

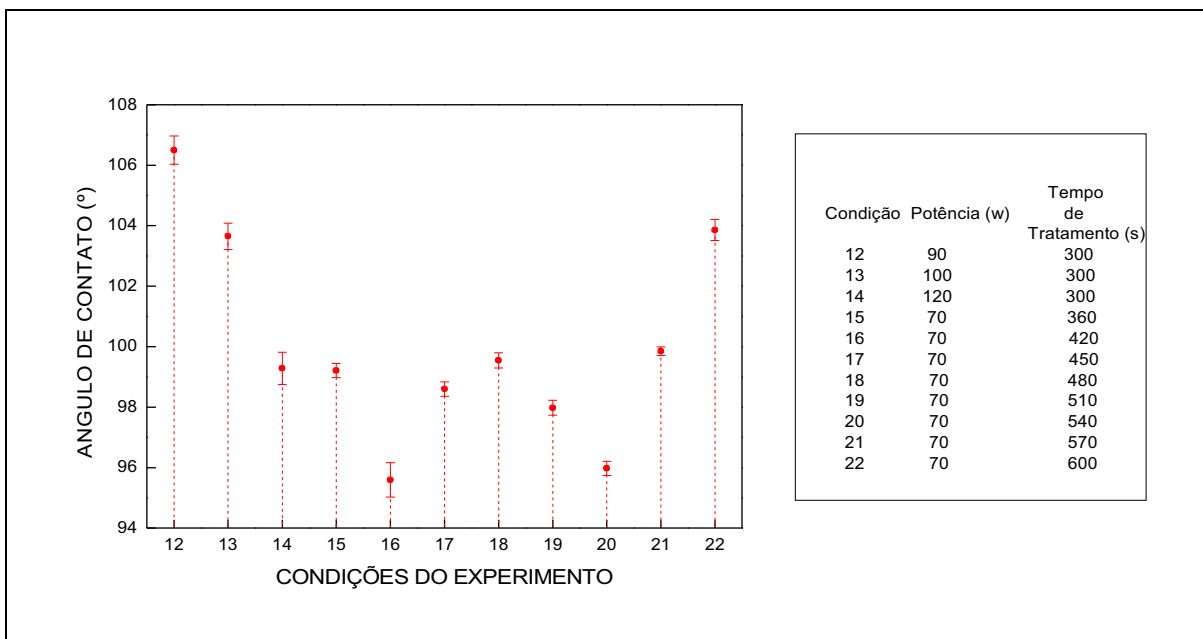


Figura 5.5: Ângulos de contato das amostras tratadas conforme as condições descritas na Tabela 5, com pressão parcial de SF_6 constante e igual a 6,67 Pa em todos os tratamentos, medidos 7 dias após o tratamento.

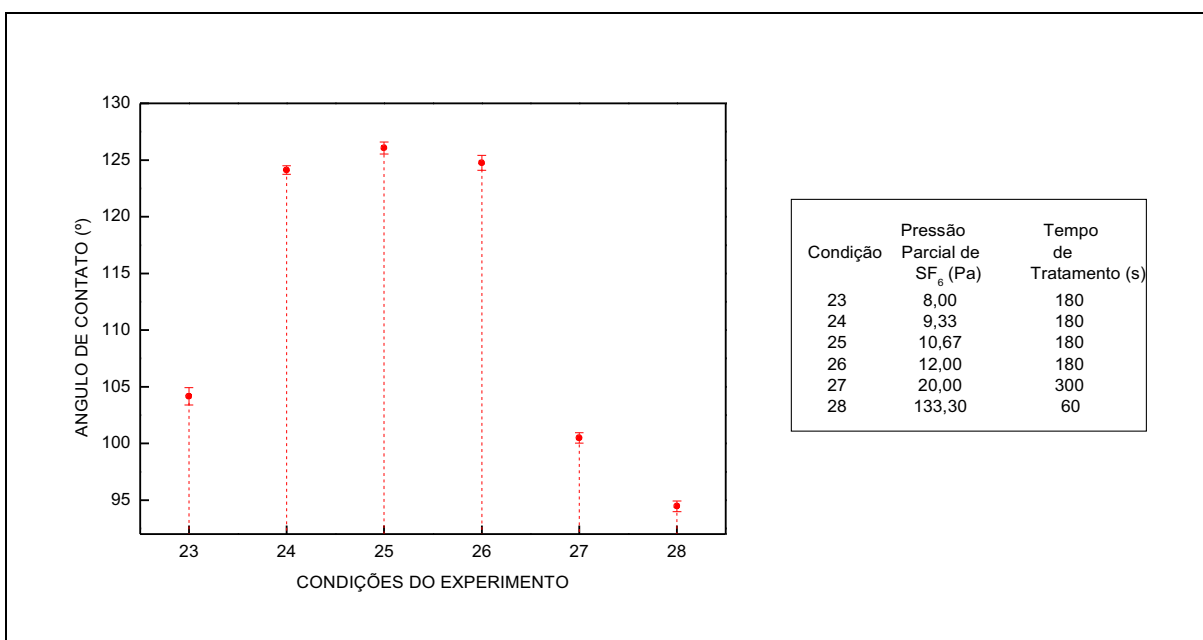


Figura 5.6: Ângulos de contato das amostras tratadas conforme as condições descritas na Tabela 6, com potência constante e igual a 70 W em todos os tratamentos, medidos 7 dias após o tratamento.

A Figura 5.6 revela que os dois experimentos realizados sob as condições 27 e 28 obtiveram os menores valores de ângulo de contato. Verificando os parâmetros

utilizados nessas condições, observa-se a alta pressão em ambos tratamentos (20 Pa para a condição 27 e 133 Pa para a 28, conforme Tabela 6). A pressão parcial afeta diretamente o tratamento superficial. Quando altas pressões são utilizadas há um aumento nas colisões elásticas e inelásticas entre elétrons e moléculas¹². O aumento da frequência de colisões elásticas conduz à um aumento na temperatura do gás devido ao aumento da transferência de energia dos elétrons para as moléculas do gás¹². Isto resulta em um decréscimo de energia no elétron; este fato conduz à redução no número de elétrons energéticos e conseqüentemente ao baixo bombardeamento do eletrodo e nas amostras nele depositado. Pode-se sugerir que uma menor frequência de bombardeamento limita a criação de sítios ativos que reagiriam com espécies do plasma, alterando as características da superfície da amostra.

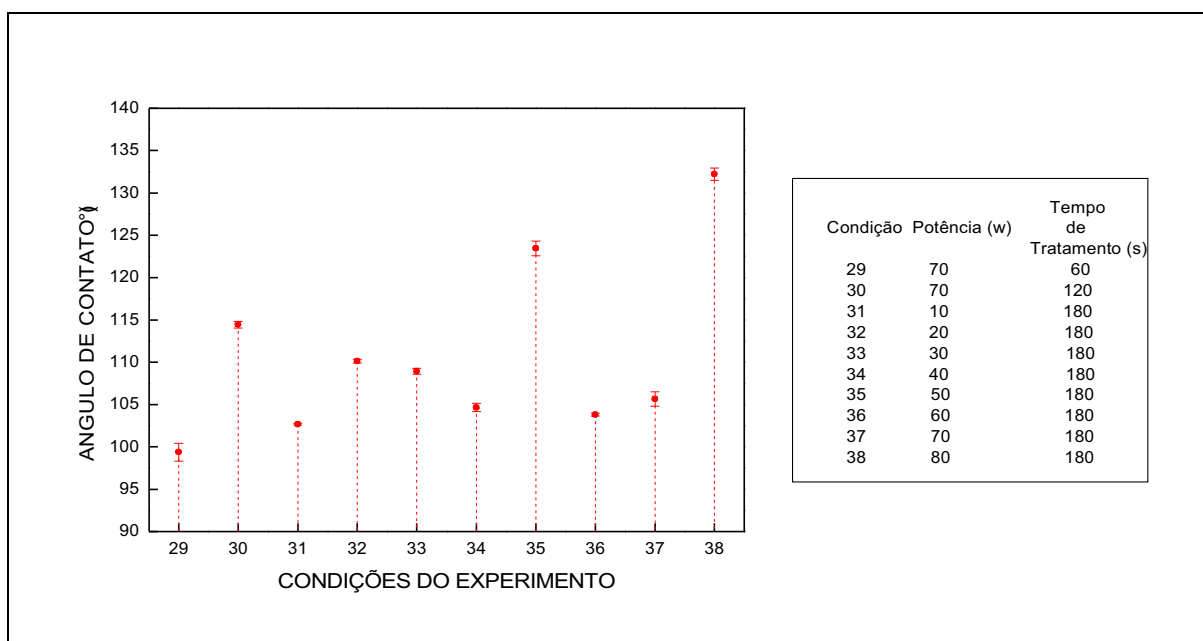


Figura 5.7: Ângulos de contato das amostras tratadas conforme as condições descritas na Tabela 7, com pressão parcial de SF_6 constante e igual a 13,33 Pa em todos os tratamentos, medidos 7 dias após o tratamento.

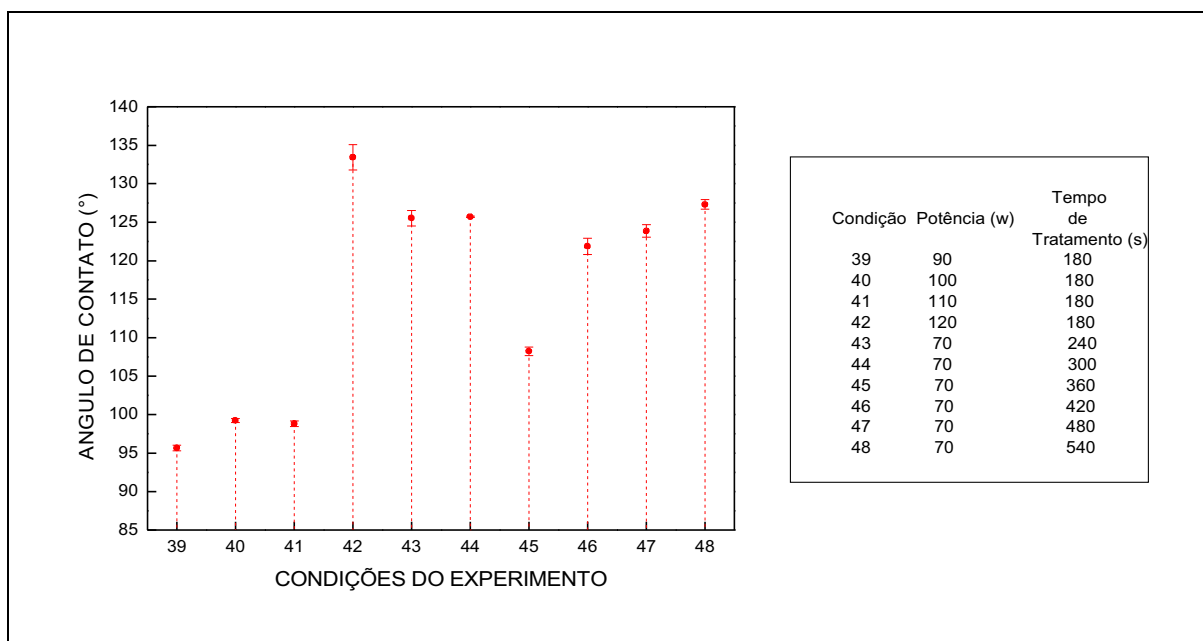


Figura 5.8: Ângulos de contato das amostras tratadas conforme as condições descritas na Tabela 7, com pressão parcial de SF_6 constante e igual a 13,33 Pa em todos os tratamentos, medidos 7 dias após o tratamento.

Os experimentos que apresentaram os 10 melhores resultados, ou seja, altos valores de ângulos de contato estão listados na Tabela 10.

Tabela 10: Os dez maiores valores de ângulo de contato, medidos nas amostras de poliuretano conforme as condições descritas nas Tabelas 5, 6 e 7. O valor do ângulo de contato no poliuretano como recebido foi 89,25°.

Ângulo de contato (°)	Condição	Potência (W)	Tempo de tratamento (s)	Pressão parcial de SF ₆ (Pa)
133,43	42	120	180	13,33
133,23	38	80	180	13,33
127,31	48	70	540	13,33
127,15	5	70	180	6,67
126,08	25	70	180	10,67
125,69	44	70	300	13,33
125,53	43	70	240	13,33
124,75	26	70	180	12
124,12	24	70	180	9,33
123,83	47	70	480	13,33

Analisando os dados da Tabela 10, nota-se uma possível influência da potência, uma vez que os maiores valores deste parâmetro geraram as superfícies mais hidrofóbicas. Plotando os valores dos ângulos de contato versus a potência utilizada no tratamento é possível ter uma clara visão da influência da potência, conforme pode ser visto na Figura 5.9.

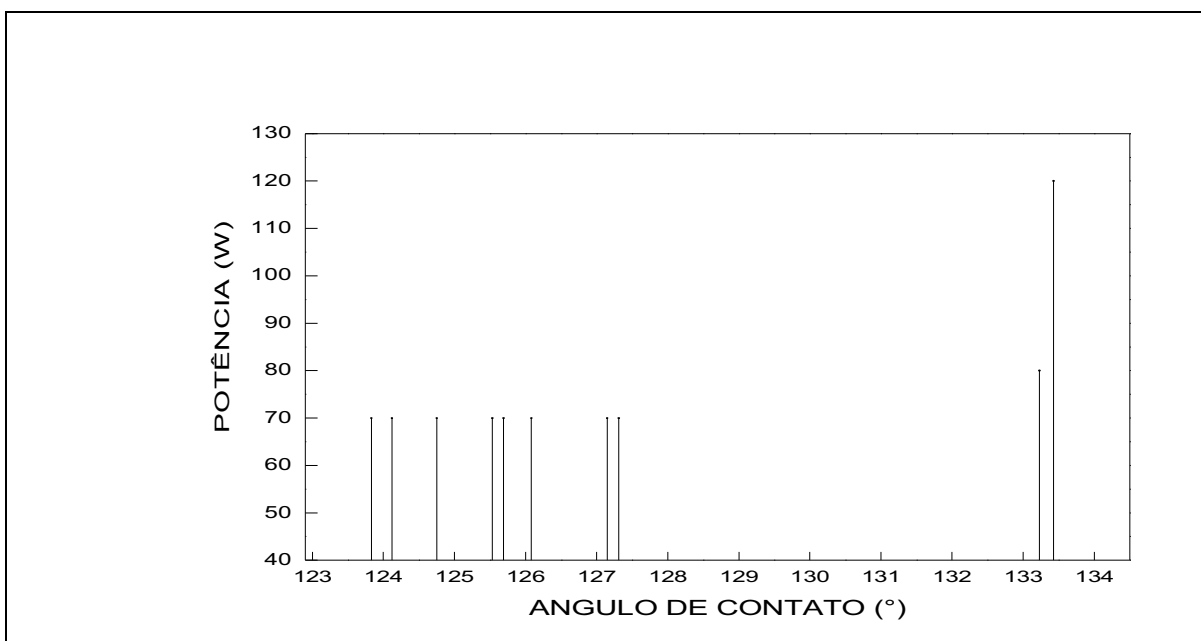


Figura 5.9: Dez maiores ângulos de contato encontrados na série de 48 experimentos versus a potência aplicada no respectivo experimento.

Segundo Morosoff¹² o aumento da potência pode levar à um aumento na densidade de elétrons energéticos, consequentemente elevando o bombardeamento do eletrodo e das amostras nele situadas por íons energéticos. O impacto desses íons energéticos do plasma pode gerar quebra das ligações poliméricas da superfície da amostra. A quebra das ligações ocasionaria a formação de radicais livres, os quais podem reagir com espécies fluoretadas do plasma, gerando desta forma uma superfície com caráter hidrofóbico devido a presença de flúor.

5.2. Ensaaios Microbiológicos – Primeira Fase

Primeiro ensaio microbiológico: após a realização dos testes e da série com 48 experimentos, optou-se por escolher 4 condições que apresentaram ângulos de contato acima de 125° para a realização dos ensaios microbiológicos. Essas condições estão descritas na Tabela 8, página 57.

As amostras de poliuretano foram submetidas a medidas de ângulo de contato após 7 dias do tratamento. A Figura 5.10 mostra os valores dos ângulos de contato obtidos nas amostras de poliuretano tratadas segundo as condições listadas na Tabela 8, da página 57.

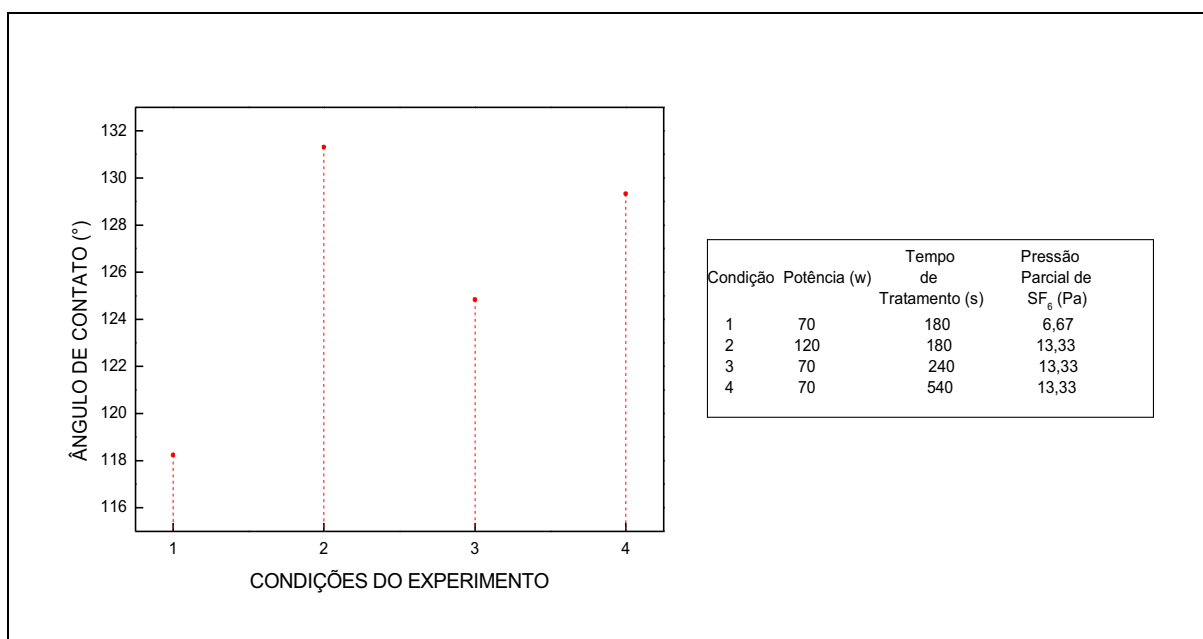


Figura 5.10: Ângulo de contato de amostras de poliuretano tratadas em plasmas de SF₆, nas condições dadas na Tabela 8, da página 57. O ângulo de contato do poliuretano como recebido é igual a 89,25°.

Como pode ser observado na Figura 5.10, todas as amostras apresentaram ângulo de contato com valores acima de 115°, isto é, as superfícies de poliuretano após o tratamento a plasma de SF₆ se tornaram hidrofóbicas. O maior valor de ângulo de contato foi obtido no tratamento cuja potência foi a maior (condição 2, potência 120 W). Este resultado está de acordo com o exposto por Morosoff¹². Outro ponto importante a ser notado é que o segundo maior ângulo de contato é aquele pertencente as amostras que permaneceram mais tempo expostas

ao plasma. Esse período maior pode ter propiciado aumento na densidade de sítios ativos na superfície que podem reagir com compostos fluoretados, conferindo caráter hidrofóbico à superfície.

Embora as superfícies obtiveram caráter hidrofóbico após o tratamento, ocorreu a formação de colônias ao redor das amostras de poliuretano, como pode ser observado nas Figuras 5.11 (amostra tratada na condição 1, submetida a ensaio com a bactéria *S.aureus*), 5.12 (amostra tratada na condição 2, submetida a ensaio com a bactéria *S.aureus*), 5.13 (amostra tratada na condição 3, submetida a ensaio com a bactéria *S.aureus*), 5.14 (amostra tratada na condição 4, submetida a ensaio com a bactéria *S.aureus*) e amostra controle (Figura 5.15).

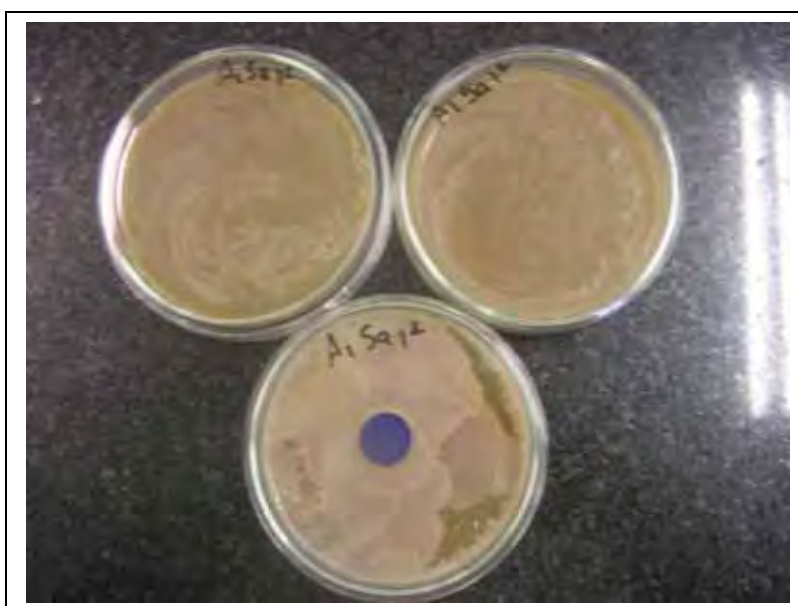


Figura 5.11: Fotografia das colônias de *Staphylococcus aureus* presentes nas soluções e na amostra de poliuretano (disco azul) tratada na condição 1.

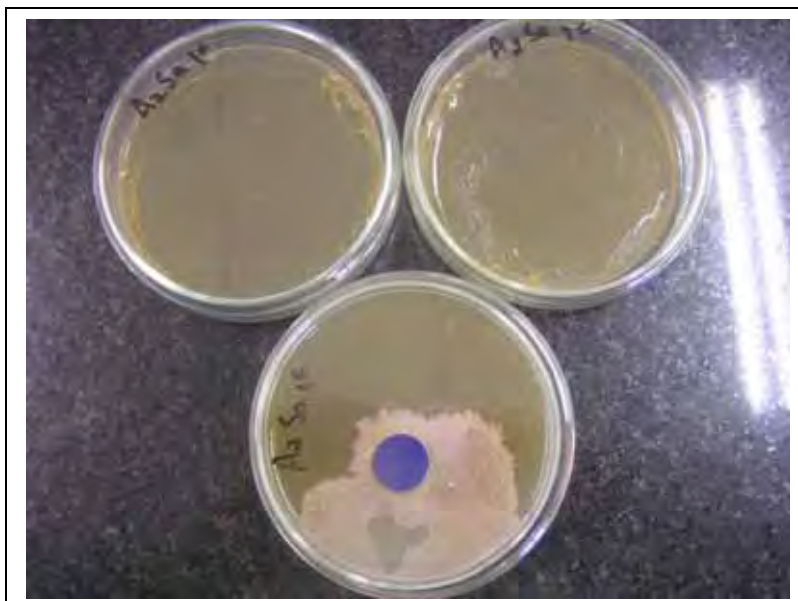


Figura 5.12: Fotografia das colônias de *Staphylococcus aureus* presentes nas soluções e na amostra de poliuretano tratada na condição 2.

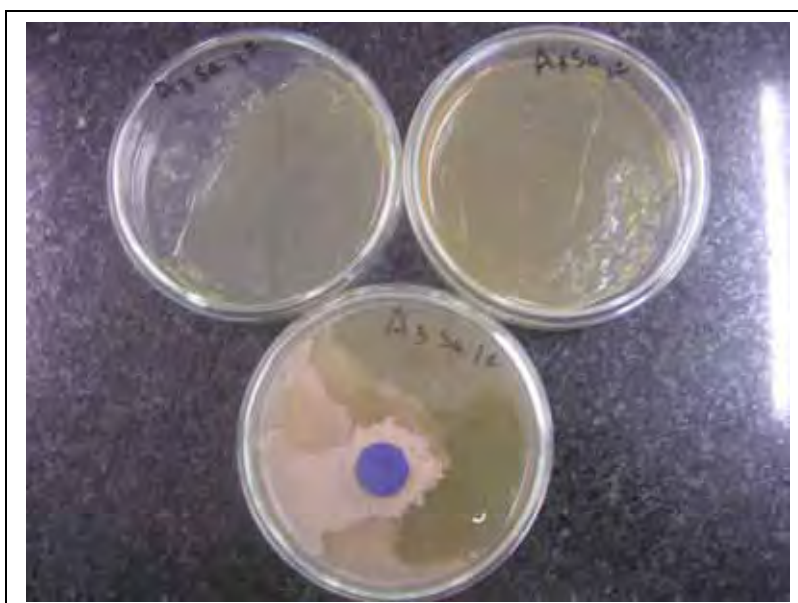


Figura 5.13: Fotografia das colônias de *Staphylococcus aureus* presentes nas soluções e na amostra de poliuretano tratada na condição 3.

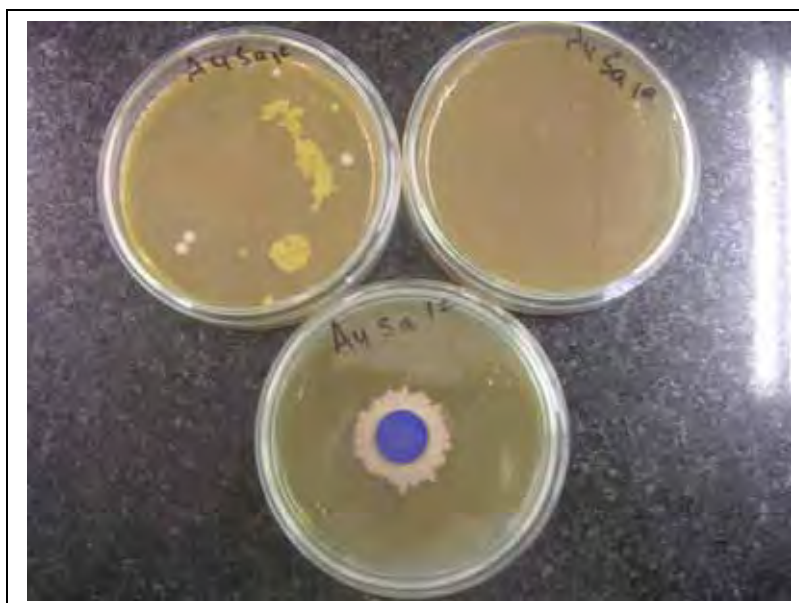


Figura 5.14: Fotografia das colônias de *Staphylococcus aureus* presentes nas soluções e na amostra de poliuretano tratada na condição 4.

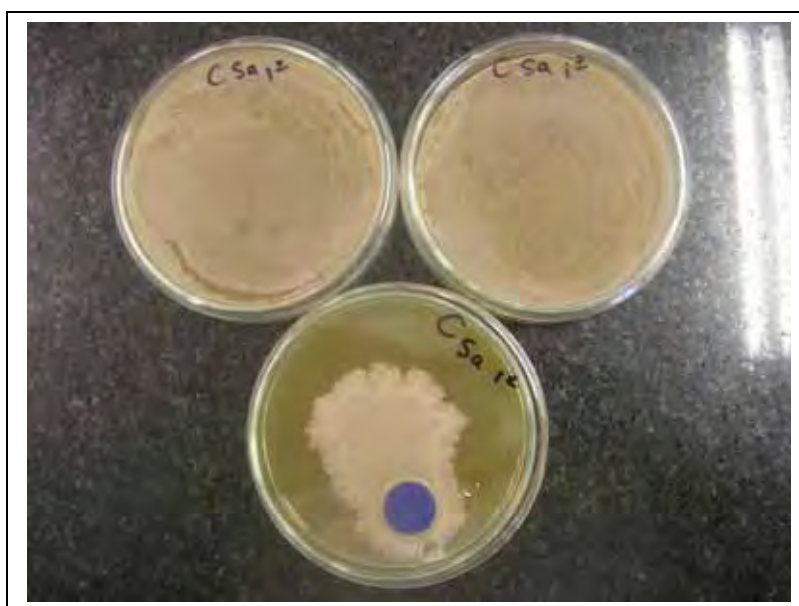


Figura 5.15: Fotografia das colônias de *Staphylococcus aureus* presentes nas soluções e na amostra controle (poliuretano sem tratamento).

Houve também formação de colônias em todas as amostras tratadas e na amostra-controle submetidas a ensaios com a *Pseudomonas aeruginosa*, como pode ser observado nas Figuras 5.16 (amostra tratada na condição 1), 5.17 (amostra

tratada na condição 2), 5.18 (amostra tratada na condição 3), 5.19 (amostra tratada na condição 4) e 5.20 (amostra-controle).

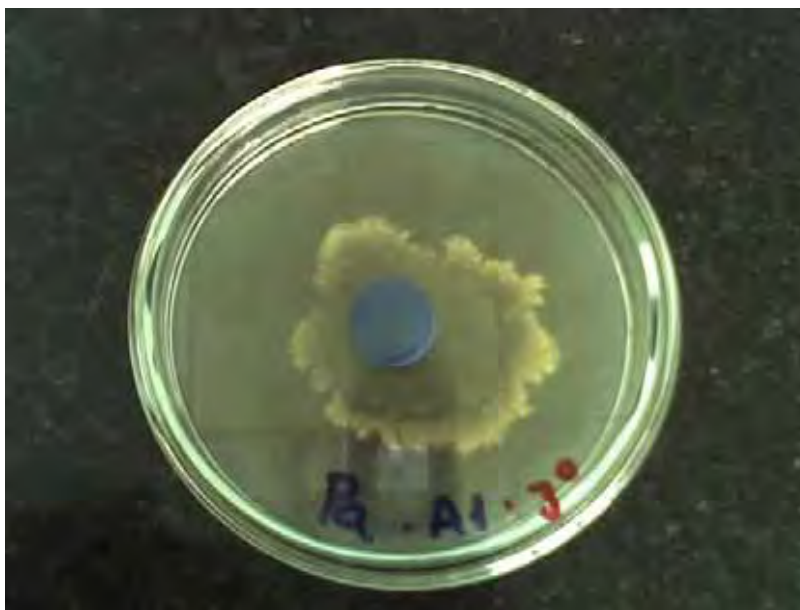


Figura 5.16: Fotografia das colônias de *Pseudomonas aeruginosa* presentes na amostra de poliuretano (disco azul) tratada na condição 1.

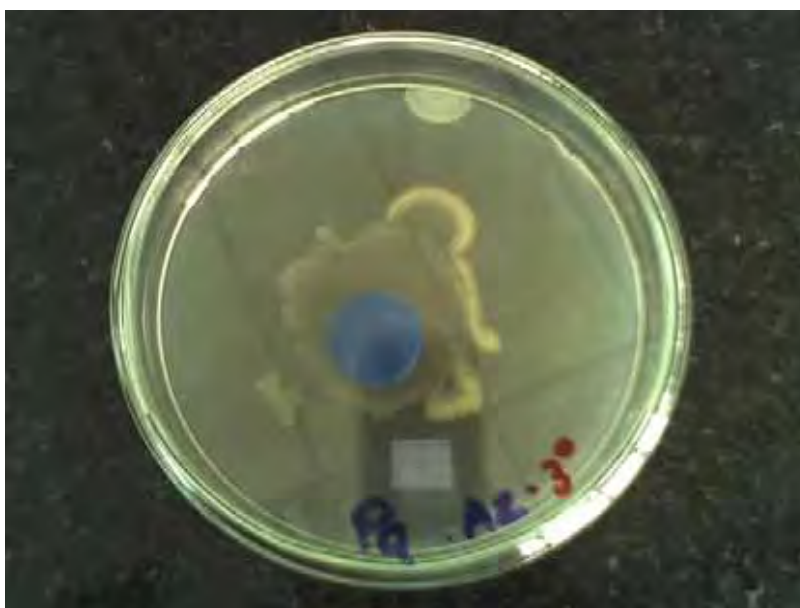


Figura 5.17: Fotografia das colônias de *Pseudomonas aeruginosa* presentes na amostra tratada na condição 2.

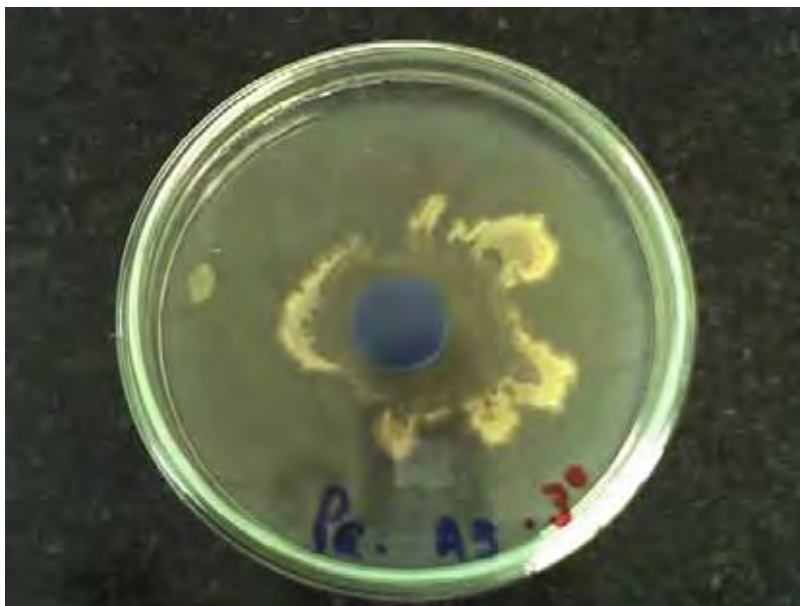


Figura 5.18: Fotografia das colônias de *Pseudomonas aeruginosa* presentes na amostra tratada na condição 3.

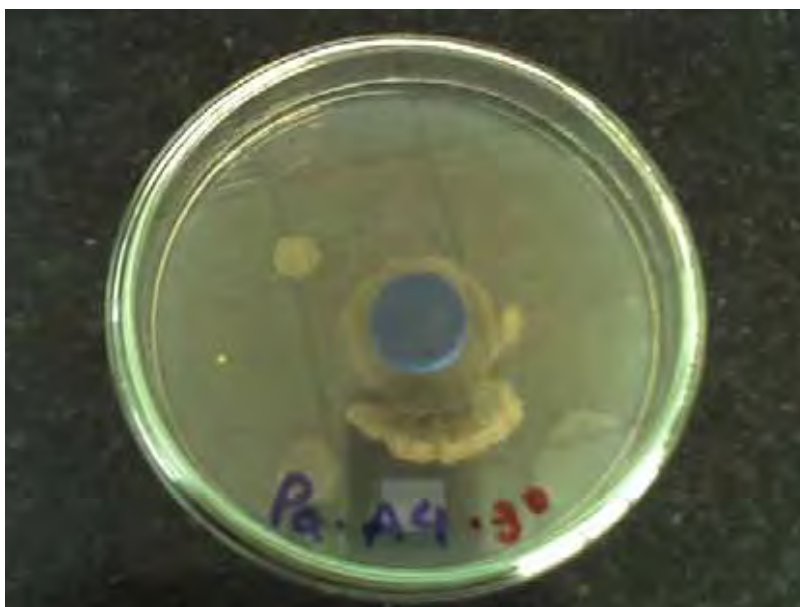


Figura 5.19: Fotografia das colônias de *Pseudomonas aeruginosa* presentes na amostra tratada na condição 4.

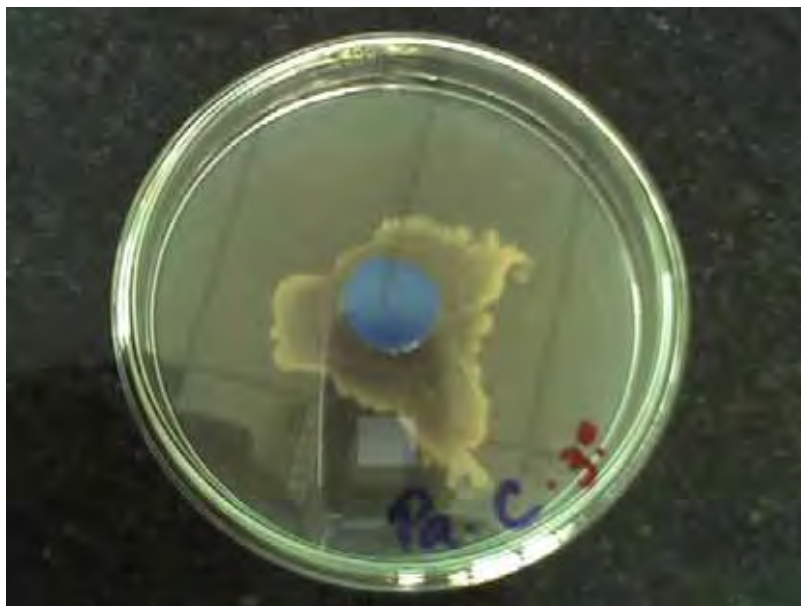


Figura 5.20: Fotografia das colônias de *Pseudomonas aeruginosa* presentes na amostra-controle.

Essas primeiras análises forneceram apenas resultados qualitativos. A olho nu eram perceptíveis as diferenças entre o comportamento das colônias das duas bactérias: enquanto o biofilme produzido pela *Pseudomonas aeruginosa* apresentava-se de forma viscosa e esverdeado, o do *Staphylococcus aureus* era mais seco e esbranquiçado. Essa diferença nas características do biofilme é devido à *P. aeruginosa* ser uma bactéria gram-negativa e seu biofilme excretar pigmentos que conferem aparência mucosa esverdeada, enquanto que o *S. aureus* por ser uma bactéria gram-positiva secreta proteínas e coagulase, obtendo aparência menos viscosa e branca.

Não é possível estabelecer uma relação entre a dimensão do halo do biofilme formado ao redor das amostras de poliuretano com a hidrofobicidade das superfícies, uma vez que nesse ensaio não houve a utilização de nenhum método de quantificação de UFCs (Unidades Formadoras de Colônias), sendo apenas qualitativo.

Segundo ensaio microbiológico: Optou-se por repetir a metodologia utilizada no primeiro ensaio, utilizando-se as mesmas condições de tratamento para o poliuretano apresentadas na Tabela 8, da página 57. Segundo relatos na literatura^{71, 72, 73}, o desenvolvimento do biofilme possui três estágios (adesão, maturação e ruptura), entretanto a duração destes estágios ainda não é completamente sabida, devido aos complexos e desconhecidos mecanismos de aderência e desenvolvimento e à diversidade de microrganismos e suas cepas. Por esses mesmos motivos, é também difícil prever um padrão de comportamento, porém é sabido que em média um ciclo total do biofilme para a grande maioria das bactérias pode levar entre cinco e sete dias. Com este novo conjunto de testes aspirava-se avaliar se os polímeros tratados impediam a adesão e os estágios subsequentes do desenvolvimento do biofilme. Para isso, as amostras foram submetidas a medidas de ângulo de contato após 7 dias do tratamento. A Figura 5.21 mostra os valores dos ângulos de contato obtidos nas amostras tratadas conforme as condições da Tabela 8, página 57.

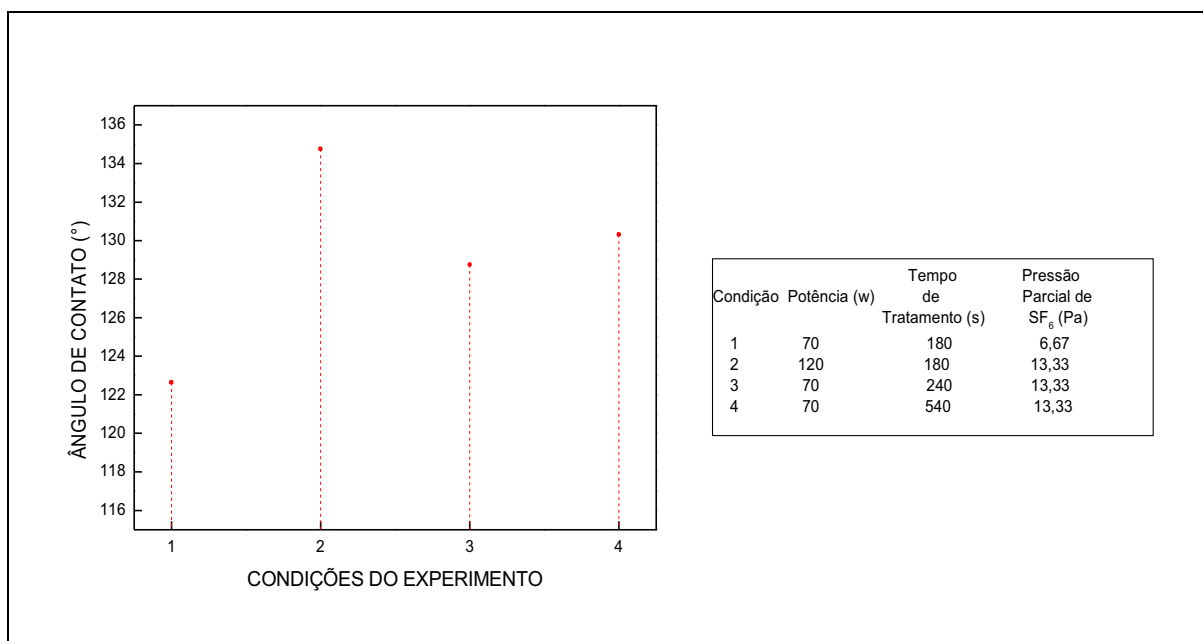


Figura 5.21: Ângulo de contato das amostras de poliuretano do segundo ensaio microbiológico, tratadas a plasma de SF₆ nas condições da Tabela 8. O valor do ângulo de contato encontrado para a amostra sem tratamento (controle) foi de 89,25°.

Como pode ser observado na Figura 5.21, todas as amostras apresentaram θ acima de 120°, o que caracteriza as superfícies como hidrofóbicas. É possível notar que o maior valor obtido de θ novamente foi na superfície na qual a condição de tratamento utiliza o maior valor da potência (120 W). Este comportamento é similar ao obtido no primeiro ensaio microbiológico.

A Figura 5.22 mostra os resultados obtidos para as soluções que continham as amostras tratadas sob as condições da Tabela 8, página 57, e também para o poliuretano como recebido, inoculadas com o *Staphylococcus aureus*.

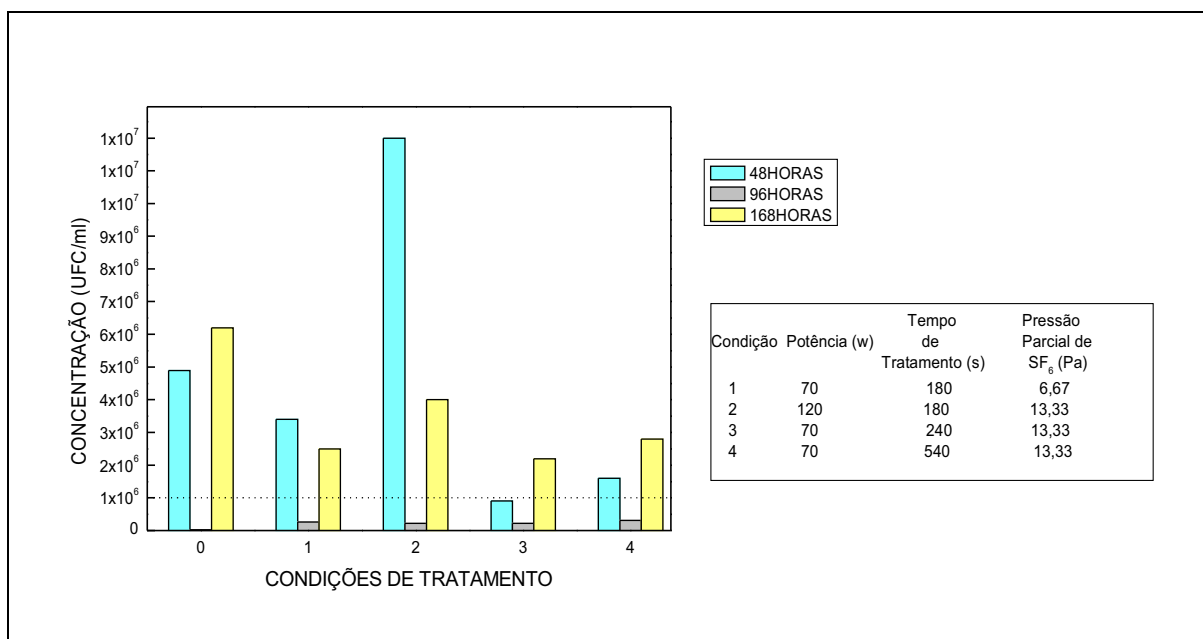


Figura 5.22: Concentração de *S. aureus* derivada das soluções plaqueadas de cada amostra de poliuretano tratada sob as condições descritas na Tabela 8. A condição indicada por 0 corresponde à amostra-controle (poliuretano sem tratamento). A linha pontilhada indica a concentração inicialmente inoculada.

É possível perceber na Figura 5.22 que, 48 horas após o período de incubação, exceto a solução referente à amostra 3, todas as outras soluções incluindo a do controle possuem uma concentração maior de bactérias do que a quantidade inicialmente inoculada. Isso se deve ao fato de que as soluções foram plaqueadas em meio rico de nutrientes (BHI), o que propicia o aumento da população bacteriana. Esse aumento também sugere que as amostras 1, 2, 4 e o controle não possuem nenhum efeito bacteriostático, ou seja, impeditivo à multiplicação do número de bactérias; pode-se dizer também que essas amostras também não possuem efeito bactericida, uma vez que não houve morte de microrganismos. Tais afirmações são fundamentadas no aumento da concentração de bactérias nas soluções que continham as amostras. Como estas soluções apresentam grande quantidade de microrganismos é possível sugerir que a

concentração de microrganismos aderidos nas amostras de poliuretano é pequena, insinuando que possivelmente o processo de adesão esteja na fase inicial.

Na segunda retirada (96 horas após a incubação) das soluções, houve decréscimo na concentração de bactérias em todas as soluções, incluindo a solução que continha o poliuretano como recebido, este inclusive apresentou a menor concentração. Este decréscimo pode estar relacionado à formação do biofilme nas amostras de poliuretano, isto é, há um aumento na concentração de microrganismos aderidos nas amostras e conseqüentemente, diminuição nas soluções. A escassez e a competição por nutrientes no meio também conduzem a formação de biofilmes, uma vez que funcionam como meio protetivo para as bactérias. Watnick²⁶ afirma que os biofilmes bacterianos funcionam como “comunidades”, uma vez que fornecem nutrientes e segurança as bactérias, fatores decisivos à continuidade da vida celular.

A formação inicial de um biofilme ocorre com a adesão de bactérias chamadas *primárias*, que secretam exopolissacarídeos (EPS), substância responsável pela arquitetura do biofilme⁶⁶ e frequentemente essa adesão é irreversível⁷³.

Na terceira retirada das soluções (168 horas) há novamente um aumento da concentração de microrganismos nas soluções, o que é reflexo da menor presença destes nas amostras de poliuretano; a solução que continha a amostra tratada sob a condição 2 e a solução da amostra controle apresentaram a maior quantidade de *S. aureus*. A presença de grande quantidade de microorganismos nas soluções pode ser decorrente da etapa de maturação e conseqüente desprendimento de alguns microrganismos que ficam na solução. Segundo Doyle⁷³ o desprendimento inicia-se logo após a adesão das bactérias primárias, principalmente quando o número de microrganismos aumenta aceleradamente,

causando a “falência” da massa do biofilme devido a limitação de nutrientes e oxigênio e acúmulo de ácidos orgânicos prejudiciais as bactérias.

O intervalo de tempo de 168 horas permitiu visualizar o ciclo completo do biofilme (adesão, desenvolvimento e maturação), com a possível adesão na segunda retirada, o desenvolvimento entre a segunda e a terceira retirada, ocorrendo nesta última, sinais do desprendimento do biofilme.

A forma mais eficiente de se prevenir a formação de um biofilme é impedindo a adesão inicial⁷³. Desta forma, pode-se afirmar que as melhores respostas obtidas para as amostras inoculadas com *S. aureus* foram as amostra-controle e a amostra tratada com a condição 2, descrita na Tabela 8, página 57. Contudo, nem o poliuretano como recebido, nem a amostra 2 são considerados ideais. Essas afirmações podem ser feitas com bastante segurança, uma vez que há adesão inicial, entretanto uma grande quantidade de bactérias é desprendida ao final do ciclo. As amostras tratadas sob as condições 1, 3 e 4 possivelmente apresentaram um biofilme maior, uma vez que o desprendimento de microrganismos foi pequeno comparado ao desprendimento que ocorreu nas amostra-controle e amostra 2.

Correlacionando a hidrofobicidade com o comportamento apresentado pelas bactérias, é possível sugerir que a superfície tratada sob a condição 2 e a amostra controle não são atrativas para o *S. aureus*. Entretanto, essas duas superfícies apresentaram comportamentos bem distintos: a amostra controle apresentou θ igual a $89,25^\circ$ enquanto que a amostra 2 teve um ângulo de contato acima de 134° , o que caracteriza uma superfície altamente hidrofóbica⁵⁵. Diante desses comportamentos, é difícil prever alguma relação para a não atratividade da bactéria por essas duas superfícies, uma vez que inúmeros eventos ocorrem

durante todo o ciclo de formação de um biofilme, sendo esses complexos e de pouco conhecimento. Doyle⁷³, entretanto, sugere que a maioria dos microrganismos possui carga negativa e conseqüentemente uma superfície negativa exerceria uma força repulsiva nos microrganismos. Essa pode ser uma explicação para que a superfície 2 não seja atrativa ao *S. aureus*, pois o caráter hidrofóbico da superfície pode ser decorrência da potência aplicada favorecendo a incorporação de flúor (altamente eletronegativo) na superfície. Flemming et al⁵⁰ estudaram a adesão de *S. aureus* em poliuretano comum e poliuretanos funcionais (poliuretanos sulforados e fosforados). Neste estudo, os polímeros eram submetidos a ensaios microbiológicos e o poliuretano comum apresentou adesão de bactérias na superfície; entretanto não foi possível estabelecer nenhuma relação entre a adesão de bactérias e as características dos polímeros.

A Figura 5.23 mostra os resultados obtidos para as concentrações das soluções que continham o poliuretano como recebido e as amostras tratadas nas condições descritas na Tabela 8, página 57.

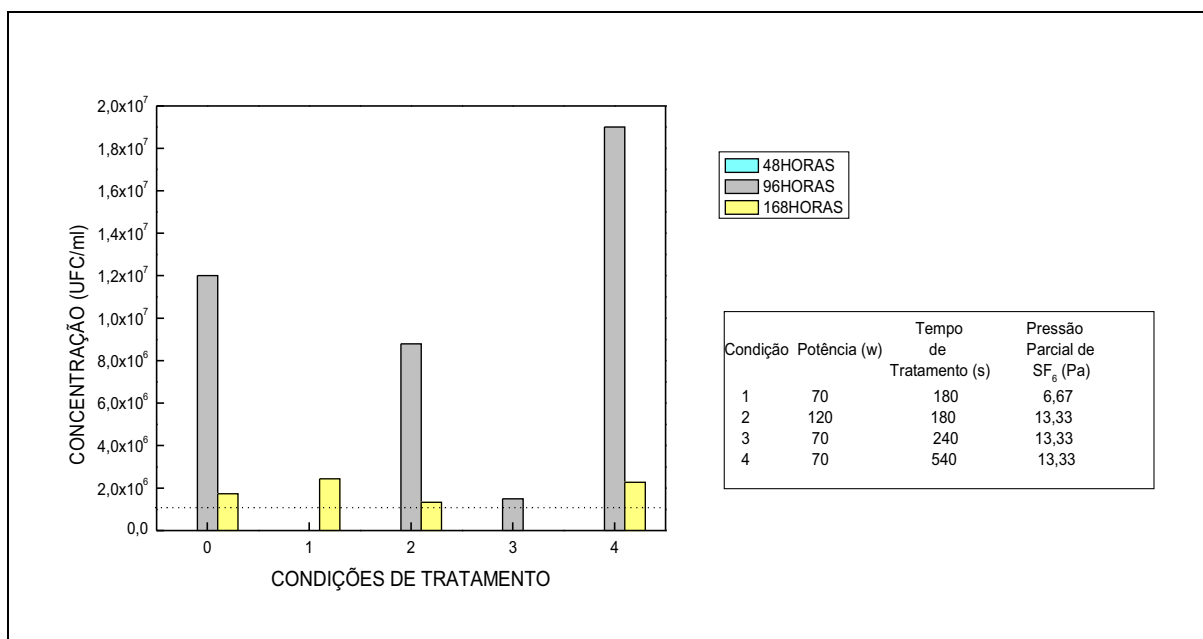


Figura 5.23: Concentração de *P. aeruginosa* derivada das soluções plaqueadas de cada amostra de poliuretano tratada sob as condições descritas na Tabela 8. A condição indicada por 0 corresponde à amostra-controle (poliuretano sem tratamento). A linha pontilhada indica a concentração inicialmente inoculada.

Analisando a Figura 5.23 é possível perceber que na primeira retirada (48 horas após a incubação) não houve níveis significativos para quantificação das bactérias na solução de nenhuma amostra, isto é, controle e amostras tratadas, o que pode sugerir a adesão dos microrganismo em suas superfícies, iniciando neste momento o processo do biofilme.

Na segunda retirada (após 96 horas do início da incubação) é possível sugerir que ocorre a fase final do ciclo de biofilme, na qual ocorre a ruptura e o desprendimento de microrganismo. Pode-se notar que a solução da amostra tratada sob a condição 4 e a solução da amostra-controle apresentaram as maiores quantidades de bactérias, o que pode sugerir a menor presença de *P. aeruginosa* na superfície do poliuretano.

Na terceira retirada (168 horas após o período de incubação) houve um decréscimo na concentração de bactérias nas soluções, o que pode sugerir o início

de um novo ciclo de formação de biofilmes. Comparativamente, o ciclo do biofilme da *P. aeruginosa* tem início em um intervalo de tempo menor do que o *S. aureus*. Carnazza et al⁵⁵ observaram que algumas espécies poliméricas realmente aceleram o início do processo de adesão da *P. aeruginosa*.

É possível afirmar que as soluções das amostras 1 e 3 apresentaram um comportamento indesejável, pois nota-se a baixa concentração de células nas soluções, sugerindo alta concentração nas amostras. Entretanto, dentre os comportamentos analisados pode-se declarar que aquele que mais se aproxima do desejável é o da condição 4. Cumpre ressaltar, que este ainda não é o melhor comportamento, ou o ideal, pois houve adesão inicial das bactérias.

A superfície da amostra tratada sob a condição 4 (Tabela 8, página 57), apresenta ângulo de contato aproximadamente igual a 130°. Como visto anteriormente, a exposição a plasmas de SF₆ propicia aumento na hidrofobicidade. A superfície da amostra 4 ficou um tempo longo na exposição ao plasma e pode-se afirmar que a hidrofobicidade e o tempo de exposição são diretamente proporcionais. Quanto maior for o tempo da superfície exposta, maior será a densidade de sítios ativos que podem reagir com partículas energéticas de flúor, favorecendo a formação de uma superfície hidrofóbica, menos atrativa para a *P. aeruginosa*. Contudo, devido a diversidade de fatores biológicos, físicos e químicos, apenas a medida de θ é insuficiente para predizer as reais condições necessárias para evitar a adesão inicial⁵².

5.3. Ensaaios Microbiológicos – Segunda Fase

Não há na literatura uma metodologia padrão para o estudo de biofilmes bacterianos. Goeres⁷¹, em seu artigo "*Statistical Assessment of a laboratory method for growing biofilms*" estuda essa variabilidade de métodos experimentais, com diferentes variáveis de processo utilizadas no crescimento de biofilmes. Há divergências quanto ao tempo e temperatura utilizados para o período de incubação das amostras na solução que contém a carga microbiana e as retiradas para quantificação dos microrganismos: Nattharika et al⁷⁴ propuseram que as amostras ficassem incubadas por 3 horas, a 37 °C, enquanto Triandafillu et al⁵² e Satriano et al⁵³ propõem um tempo de incubação de 2 horas, porém com diferentes temperaturas: 24°C e 37°C, respectivamente. Free et al⁷⁵ sugerem um tempo de incubação de 5 horas enquanto que Everaert et al⁴⁸ preferem 7 horas, ambos a 37°C. Flemming et al⁵⁰ retiraram a primeira amostra após uma hora de incubação e a segunda amostra após 24 horas, enquanto Zhang et al⁵⁶ fizeram a primeira retirada após 36 horas; Hume et al⁴⁰ fizeram duas retiradas, a primeira com 5 horas e a segunda após 24 horas de incubação. Analisando-se os trabalhos de diversos autores nota-se que incubações por períodos menores que 24 horas resultam em quantidades insignificantes de microrganismos. A contagem passa a ser significativa após 24 horas, sugerindo a adesão inicial das bactérias a partir desse intervalo de tempo. A concentração de bactérias no inoculo inicial e o tempo de agitação ultrassônica também não são padronizados. As concentrações variam de 10⁵ UFC/ml^{50, 56} até 10⁹ UFC/ml⁷⁶ enquanto que o tempo de agitação varia de 20 s⁴⁸, 60 s⁷⁵, 120 s⁵⁰ até 900 s²⁴.

Baseados na falta de consenso quanto às técnicas para acompanhamento, formação e quantificação de biofilmes e nos testes qualitativos

optou-se por utilizar como técnica de quantificação, a Turbidimetria. Nesta nova metodologia empregou-se um período inicial de incubação das amostras na solução microbiana de 24 horas, sendo este chamado de primeira retirada. A segunda e a terceira retiradas foram feitas respectivamente após 48 e 120 horas de incubação. Esses períodos foram escolhidos para permitir a avaliação de todo o ciclo da adesão, formação (maturação) e ruptura do biofilme, conforme observado por Boari⁷².

Inicialmente foram feitas as leituras das diluições da padronização das suspensões microbianas com o leitor de Elisa em 340 nm, conforme mostrado na Figura 5.24.

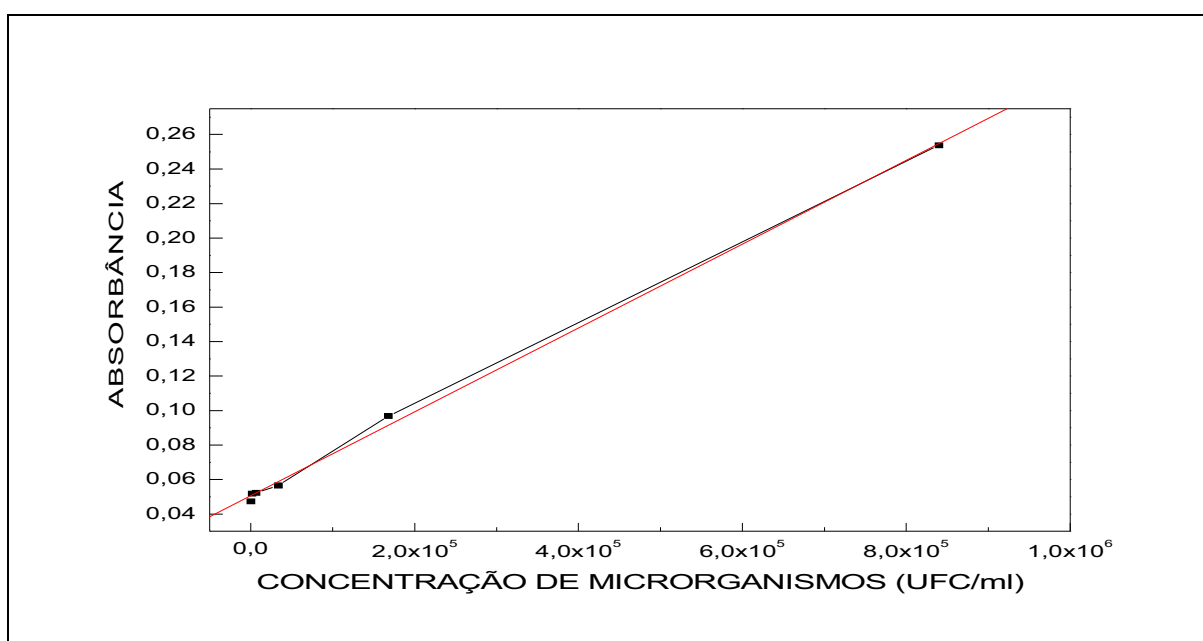


Figura 5.24: Correlação entre a absorbância em 340 nm e a densidade de *Staphylococcus aureus* em suspensão.

A correlação entre a absorbância e a concentração de *Pseudomonas aeruginosa* é mostrada na Figura 5.25:

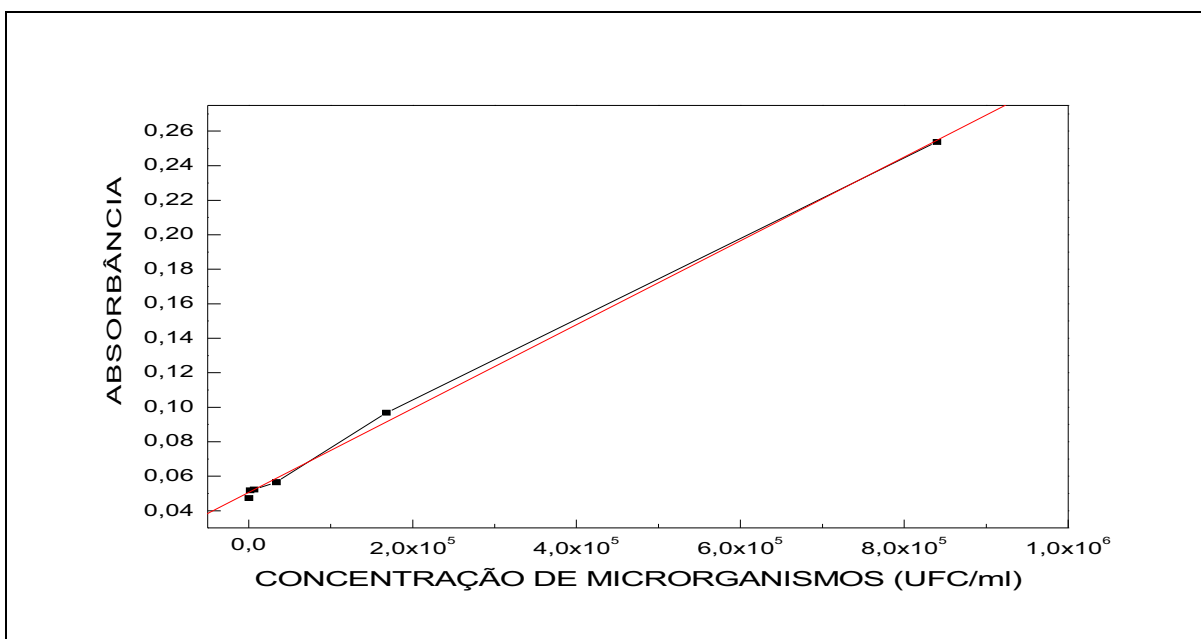


Figura 5.25: Correlação entre a absorbância em 340 nm e a densidade de *Pseudomonas aeruginosa* em suspensão.

A partir da regressão linear das curvas de padronização, foram obtidas as equações que permitem determinar as concentrações das cargas microbianas a partir de medidas de absorbância. Tais equações são apresentadas na Tabela 11:

Tabela 11: Relação entre a absorbância (y) e a concentração (x) de bactérias em suspensão.

<i>Staphylococcus aureus</i>	$y = 2 \times 10^{-7}x + 0,0506$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$y = 2 \times 10^{-7}x + 0,0528$

Correlacionando as absorbâncias e a carga microbiana foi possível quantificar a concentração de microrganismo nas soluções das amostras incubadas nos tempos pré-estabelecidos.

Poliuretano

Na segunda fase dos trabalhos, houve uma preocupação maior em analisar a superfície das amostras tratadas sob as condições da Tabela 9, página 60. Para isso utilizou-se além da técnica do Ângulo de Contato, a Espectroscopia de Infravermelho.

Na figura 5.26 são mostradas as curvas de envelhecimento referentes aos tratamentos a plasma de SF_6 em amostras de poliuretano, nas condições citadas na Tabela 9.

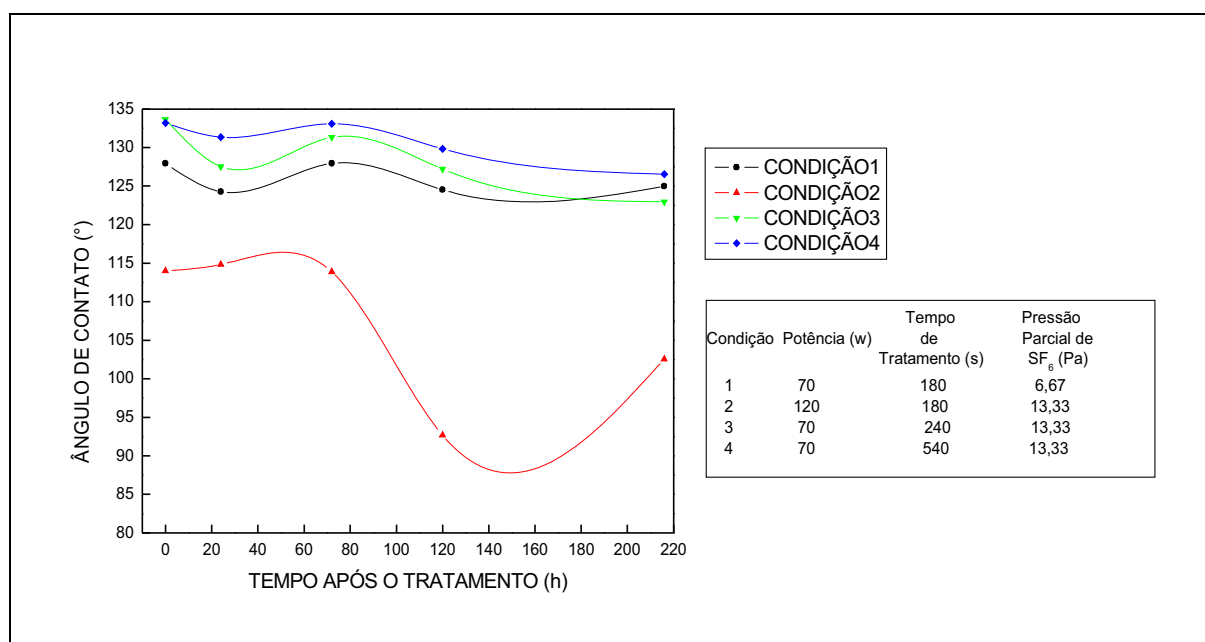


Figura 5.26: Ângulo de contato de amostras de poliuretano em função do tempo após tratamento nas diferentes condições, dadas na Tabela 9, página 60.

Pode ser observado na Figura 5.26 que os ângulos de contato das amostras tratadas sob as condições 1, 3 e 4 apresentam uma tendência semelhante. Nos três casos os ângulos de contato medidos imediatamente após o tratamento eram de aproximadamente 130° e convergiram para cerca de 128° , nove dias após o

tratamento. Por outro lado, o ângulo de contato da amostra tratada na condição 2, além de ser menor que os obtidos com os outros tratamentos apresenta uma variação temporal mais pronunciada, atingindo um valor cerca de 10% menor que aquele medido imediatamente após o tratamento. A análise das tendências das quatro curvas sugere que a potência é o parâmetro com maior influência sobre o ângulo de contato do poliuretano. O aumento da potência de excitação provoca um aumento na energia média das espécies do plasma. Desta forma, a taxa de impacto de espécies mais energéticas com a superfície pode aumentar e o conseqüente aumento da energia depositada no sólido pode resultar em um maior grau de fragmentação de ligações químicas na superfície do polímero. Esta maior fragmentação, por sua vez, leva a uma maior insaturação da superfície o que dificultaria a incorporação de flúor explicando o menor ângulo de contato. Além disso, com o aumento da quebra de ligações, mais radicais livres são formados, e estes podem reagir lentamente com espécies atmosféricas hidrofílicas, como vapor d'água, o que responderia pela redução de θ com o envelhecimento da amostra. Após nove dias do tratamento, a amostra da condição 2 apresenta uma tendência de recuperação do valor de θ , fato também observado por Aol et al⁷⁷ em seus estudos. A recuperação pode ser resultado da migração de grupos polares na superfície do polímero através de movimentos de rotação⁷⁸.

A Figura 5.27 mostra o espectro de absorção no infravermelho de amostras de poliuretano expostas aos diferentes tratamentos listados na Tabela 9.

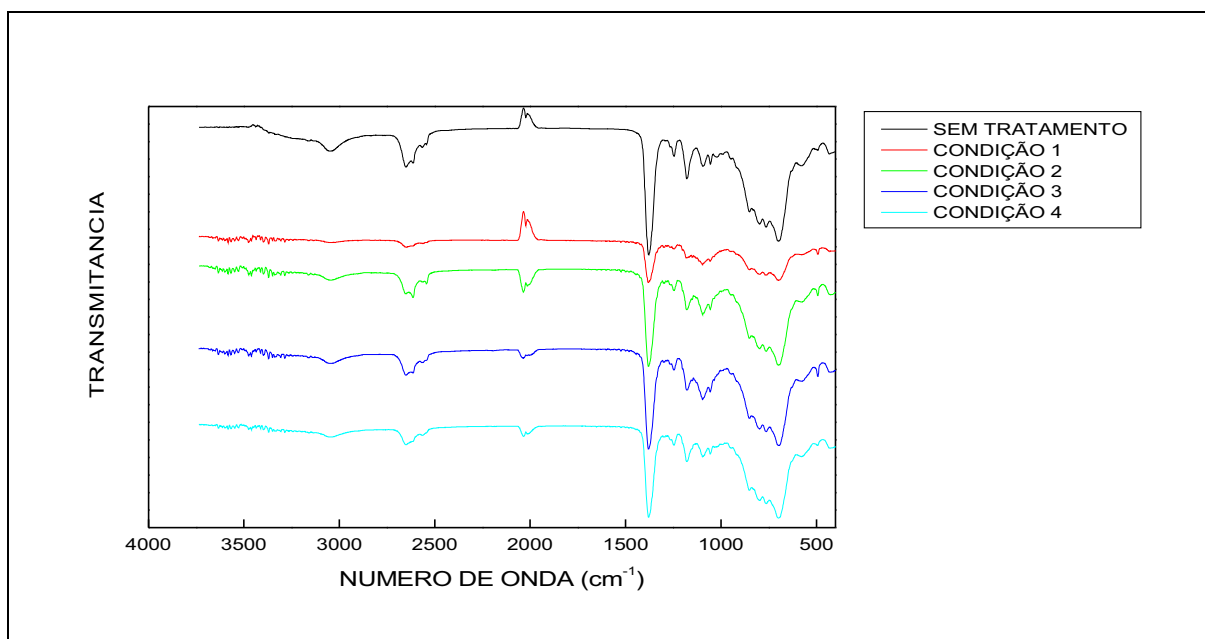


Figura 5.27: Espectros de absorção no infravermelho de amostras de poliuretano como recebido e tratadas nas condições da Tabela 9.

Pode-se observar que todos os espectros são bastante semelhantes, o que reforça a suposição de que os tratamentos a plasma são muito superficiais. As absorções em torno de 1350 cm^{-1} são atribuídas ao estiramento de grupos de ligações C-N, para a absorção em torno de 650 cm^{-1} , o que sugere a manutenção do nitrogênio no polímero. Observa-se que não foi detectada no espectro das amostras tratadas a plasma de SF_6 nenhuma banda significativa atribuída a ligações com flúor. Neste caso, pode-se supor que a incorporação de flúor na superfície das amostras não foi significativa, uma vez que não foi detectada pelo IR, podendo ser resultado de diversos fatores ligados aos parâmetros utilizados no tratamento a plasma.

A Figura 5.28 mostra os resultados obtidos para as concentrações das soluções que continham o poliuretano como recebido e as amostras tratadas nas condições descritas na Tabela 9, página 60, inoculadas com *Staphylococcus aureus*.

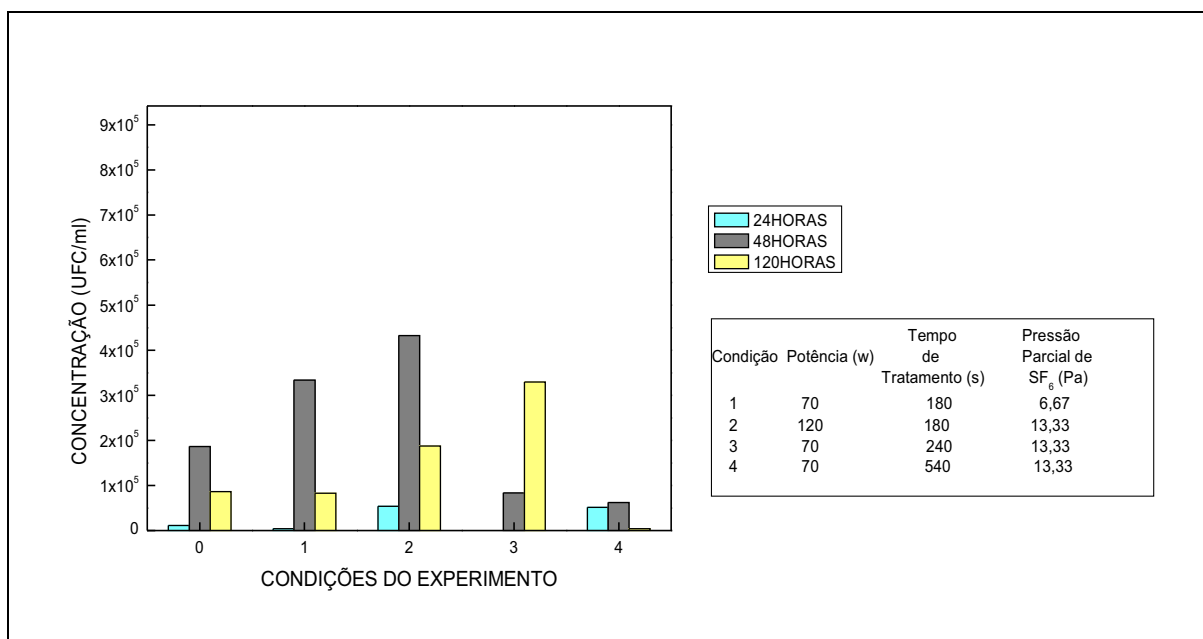


Figura 5.28: Concentração de *S. aureus* derivada das soluções plaqueadas de cada amostra de poliuretano tratada sob as condições descritas na Tabela 9. A condição indicada por 0 corresponde à amostra-controle (poliuretano sem tratamento).

Através da análise da Figura 5.28 é possível observar que na primeira retirada (24 horas após o período de incubação) a concentração de *S. aureus* nas soluções não era significativa, o que sugere que os microrganismos iniciaram o processo de adesão nas amostras de poliuretano. Esse comportamento é diferente do observado para esse mesmo polímero e bactéria pela técnica do Pour Plate, uma vez que nesta técnica a adesão pode ter se iniciado no período compreendido entre 48 e 96 horas após o período de incubação. Na segunda retirada, há um aumento nas concentrações das bactérias nas soluções que continham as amostras tratadas sob as condições 1 e 2 e na amostra controle, podendo significar desprendimento da massa do biofilme; contudo esse efeito não é percebido nas soluções 3 e 4. Na terceira retirada (120 horas após o período de incubação) também são percebidas concentrações significativas de microrganismo nas soluções, indicativo de que o processo de desprendimento ainda pode estar ocorrendo. Este fato é ainda mais

evidente na solução que continha a amostra 2, uma vez que foi a que apresentou maior concentração de microrganismo, levando em consideração as três retiradas; por esse motivo, pode se afirmar que a melhor condição de tratamento observada para o poliuretano foi a condição 2. Entretanto, como afirmado anteriormente, ainda não é a condição ideal, uma vez que permitiu a aderência de microrganismos, no início do processo.

É interessante analisar que a condição 2 foi a que apresentou superfície menos hidrofóbica, supostamente causada por maior fragmentação e conseqüente insaturação da superfície, dificultando a incorporação de flúor, o que pôde ser confirmado através dos espectros de Infravermelho, onde não foi detectada nenhuma banda de absorção de compostos fluoretados. É sabido que a hidrofobicidade é um dos fatores mais importantes que afetam os biomateriais⁷⁹, entretanto novamente não é observado um comportamento padrão para a *Staphylococcus aureus*. Zhang et al⁵⁶ observaram a preferência da *S. aureus* por superfícies hidrofílicas, enquanto que Doyle⁷³ observa o contrário. Porém, ambos afirmam que os mecanismos de atratividade destas bactérias não estão plenamente entendidos, o que dificulta a busca pela superfície com características menos atrativas. Pode-se sugerir, com base neste trabalho e nas afirmações de Zhang et al⁵⁶ que talvez a bactéria *S. aureus* tenha preferência por superfícies menos hidrofóbicas, contudo não é possível padronizar esse tipo de comportamento para o microrganismo, uma vez que as características físicas, químicas e biológicas de cada tratamento e das bactérias são diferentes.

A Figura 5.29 mostra os resultados obtidos para as concentrações das soluções que continham o poliuretano como recebido e as amostras tratadas nas

condições descritas na Tabela 9, página 60, inoculadas com *Pseudomonas aeruginosa*.

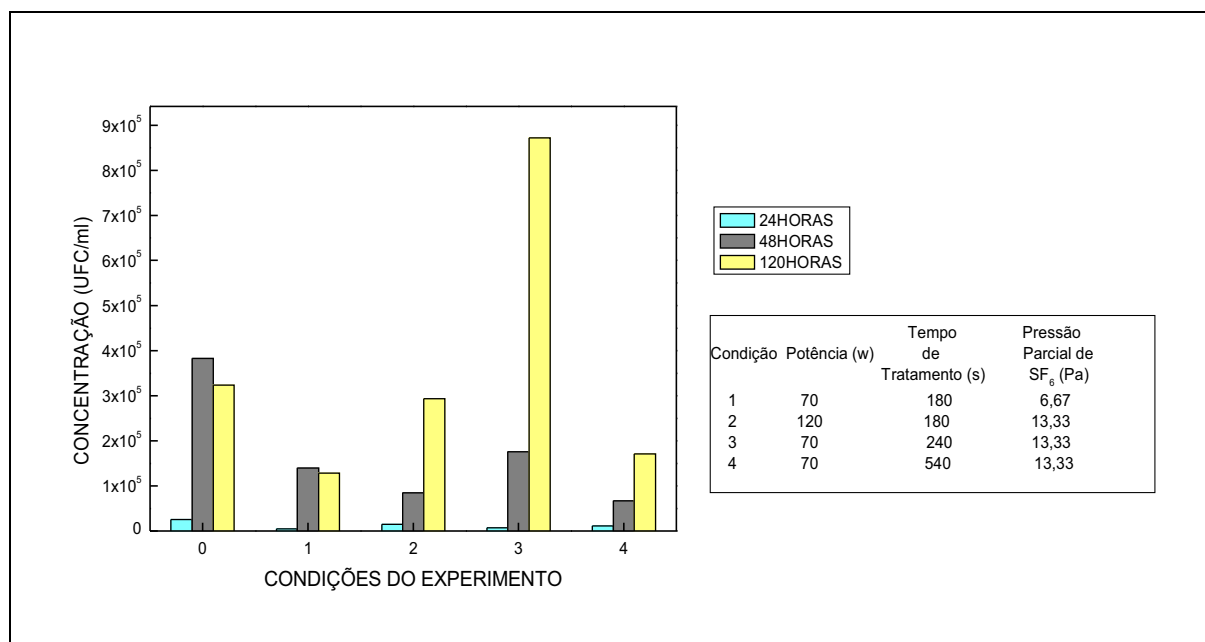


Figura 5.28: Concentração de *P. aeruginosa* derivada das soluções plaqueadas de cada amostra de poliuretano tratada sob as condições descritas na Tabela 9. A condição indicada por 0 corresponde à amostra-controle (poliuretano sem tratamento).

Através da Figura 5.29 é possível observar que as soluções da amostra do poliuretano como recebido e das amostras tratadas apresentam o mesmo comportamento descrito para a *S. aureus*, isto é, adesão dos microrganismos nas amostras e conseqüente diminuição nas soluções na primeira retirada (24 horas) e na segunda e terceira retiradas observam-se grandes concentrações de *P. aeruginosa* nas soluções, indicativo do desprendimento de massas do biofilme. Baseado nessas concentrações de bactérias nas soluções, pode-se dizer que o melhor tratamento para tornar a superfície menos atrativa para a *P. aeruginosa* foi a condição 3, que obteve o maior desprendimento de bactérias após a adesão. Porém, essa não é uma condição ideal, pois permitiu a adesão inicial. A superfície tratada

na condição 3 apresentou ângulos de contato variando entre 135 e 125°, sugerindo que a *P. aeruginosa* não é atraída por superfícies altamente hidrofóbicas, conforme sugerido por Doyle⁷³.

Silicone

Na Figura 5.30 podem ser observadas as curvas de envelhecimento dos ângulos de contato de amostras de silicone expostas a plasmas de SF₆, nas condições dadas na Tabela 9, página 60.

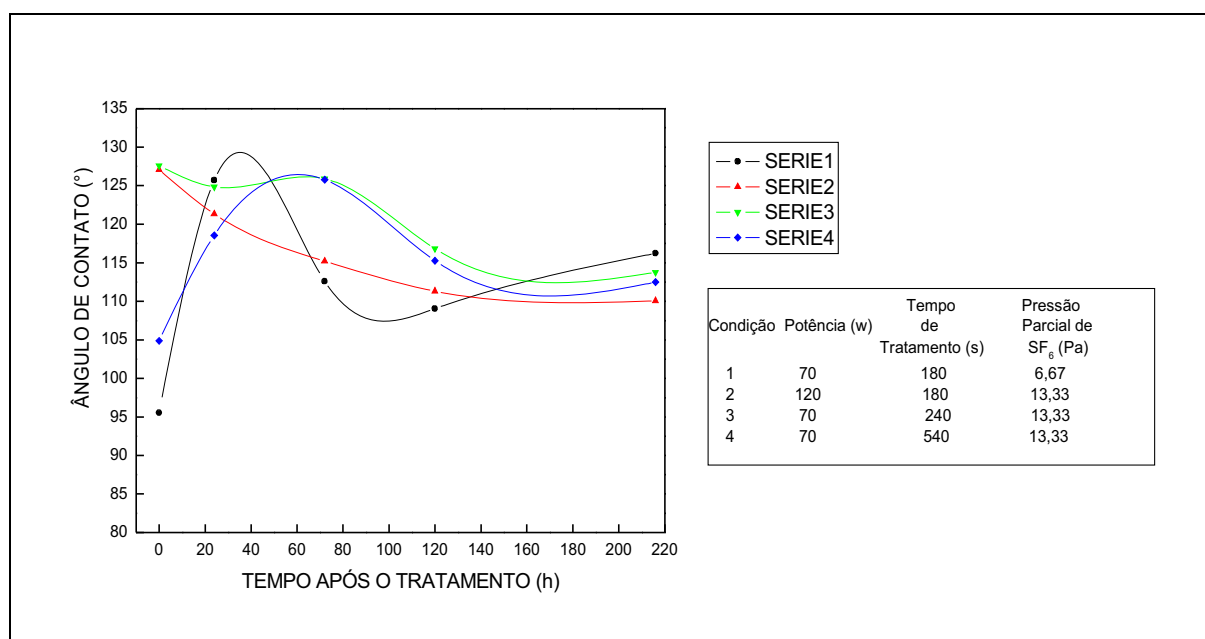


Figura 5.30: Ângulo de contato de amostras de silicone em função do tempo após tratamento nas diferentes condições, dadas na Tabela 9, página 60.

Embora os ângulos de contato das amostras de silicone não apresentem uma relação muito evidente com as condições de tratamento, para o estudo em

questão é suficiente constatar que em todos os casos os ângulos de contato 24 horas após o início do tratamento estavam próximos de 120° .

A Figura 5.31 mostra os espectros na região do Infravermelho das amostras de silicone sem tratamento e expostas a plasmas de SF_6 nas condições listadas na Tabela 9, página 60.

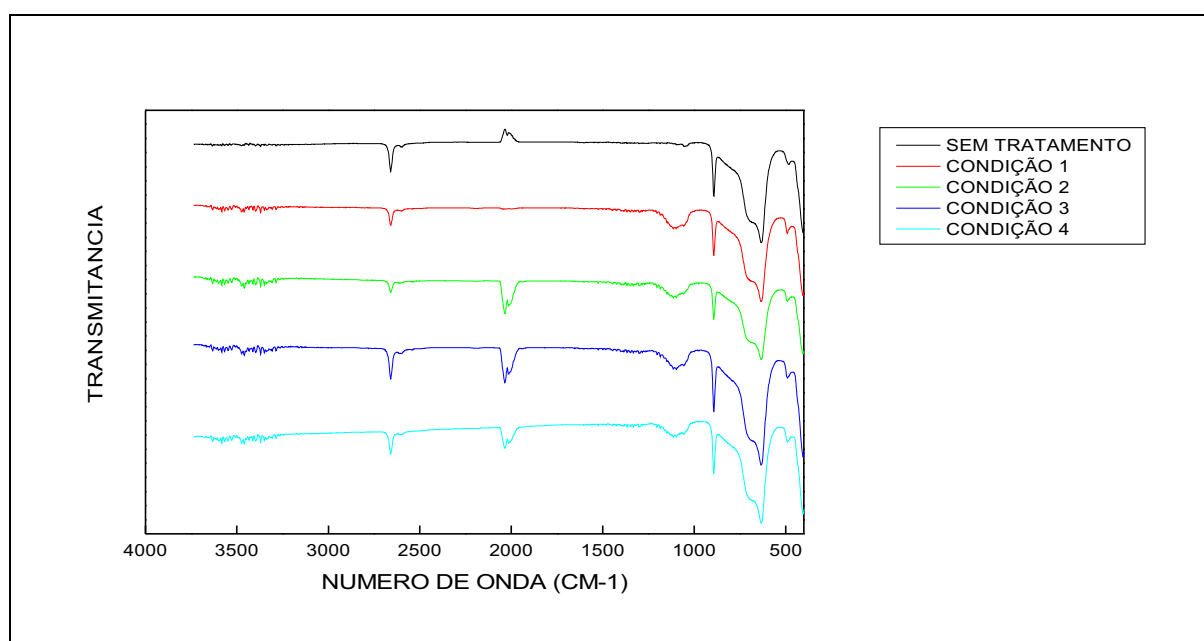


Figura 5.31: Espectros de absorção no infravermelho de amostras de silicone como recebido e tratadas nas condições da Tabela 9.

Novamente observa-se a semelhança de todos os espectros, inclusive o da amostra não tratada. As absorções ao redor de 600 cm^{-1} , atribuídas a grupos Si-C-O em 900 cm^{-1} devido ao estiramento de ligações Si-O-Si, indicam a manutenção do silício na estrutura do polímero. Além disso, o surgimento de uma absorção em torno de 1100 cm^{-1} nos espectros das amostras tratadas, atribuída a grupos CHF_2 indicam a incorporação de flúor ao material tratado, o que se dá possivelmente pela

ligação de flúor a sítios ativos gerados pela reação de flúor atômico do plasma com espécies da superfície polimérica.

A Figura 5.32 mostra os resultados obtidos para as concentrações das soluções que continham o silicone como recebido e as amostras tratadas nas condições descritas na Tabela 9, página 60, inoculadas com *Staphylococcus aureus*.

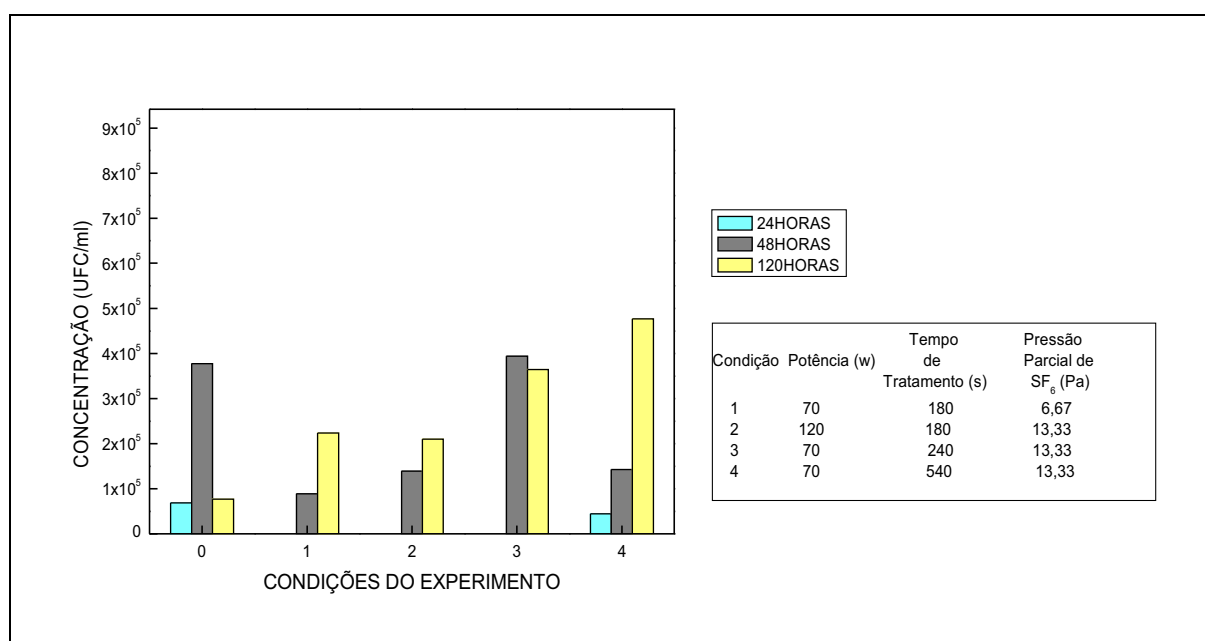


Figura 5.32: Concentração de *S. aureus* derivada das soluções plaqueadas de cada amostra de silicone tratada sob as condições descritas na Tabela 9. A condição indicada por 0 corresponde à amostra-controle (silicone sem tratamento).

Observa-se que o comportamento para silicone inoculado com *S.aureus* foi semelhante ao poliuretano. Na primeira retirada (24 horas após a inoculação) é possível sugerir que esteja ocorrendo a adesão das bactérias a superfície do silicone, uma vez que não há quantidades significativas de microrganismos nas soluções dessa etapa. A segunda retirada (48 horas) apresentou aumento na concentração de microrganismos nas soluções, o mesmo acontecendo na terceira

retirada. Pode-se insinuar que a melhor condição de tratamento foi a 3, pela quantidade de bactérias desprendidas. Diferentemente do que aconteceu com o poliuretano, no silicone a *S. aureus* não foi atraída por uma superfície hidrofóbica, o que reforça a teoria de que as forças de adesão para o início de formação do biofilme dependem de inúmeros fatores, uma vez que cada superfície apresenta uma composição distinta, graus de rugosidade e polimento diversos, entre outros.

A Figura 5.33 mostra os resultados obtidos para as concentrações das soluções que continham o silicone como recebido e as amostras tratadas nas condições descritas na Tabela 9, página 60, inoculadas com *Pseudomonas aeruginosa*.

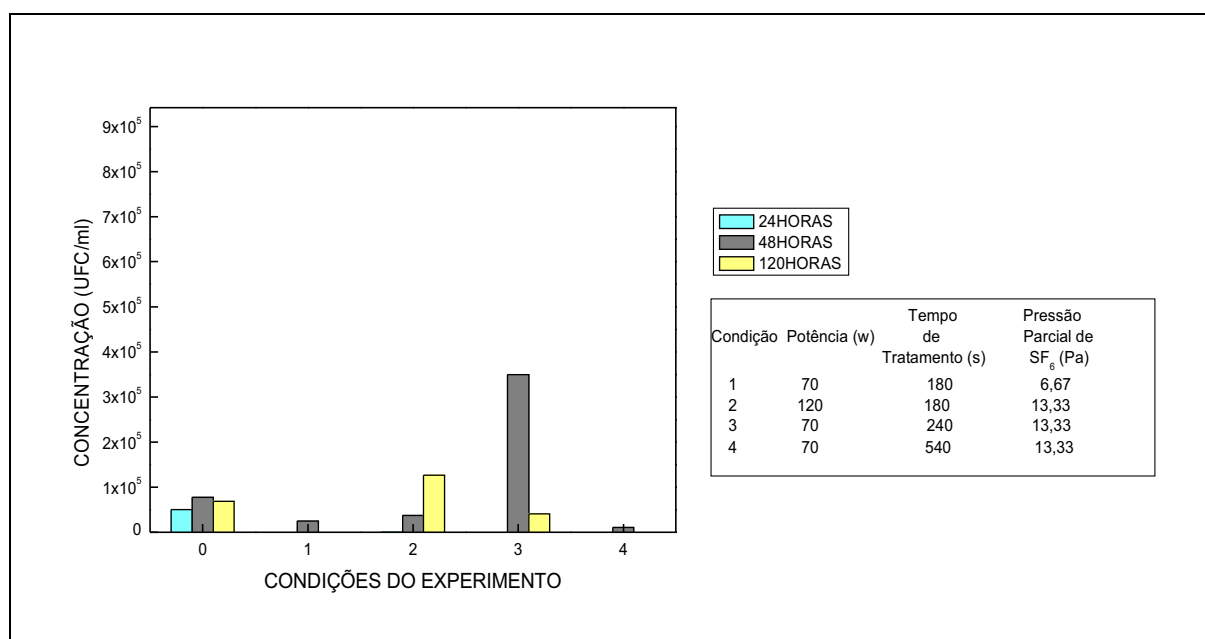


Figura 5.33: Concentração de *P. aeruginosa* derivada das soluções plaqueadas de cada amostra de silicone tratada sob as condições descritas na Tabela 9. A condição indicada por 0 corresponde à amostra-controle (poliuretano sem tratamento).

Através da análise da Figura 5.33 pode-se insinuar que o silicone não tratado ou tratado sob as condições descritas na Tabela 9 é altamente atrativo para

a *P. aeruginosa*, uma vez que não se percebe em quase nenhuma retirada (exceto na 2ª retirada da condição 3) grandes concentrações de microrganismos nas soluções, o que é um indicativo da grande aderência destes nas superfícies de silicone. Everaert et al⁴⁸ estudaram contaminação de microrganismos em silicone e também encontraram grande quantidade de bactérias aderidas a superfície do polímero sem tratamento (hidrofóbico) e tratado (hidrofílico), o que confirma a inexistência de um comportamento padrão para os microrganismos. Pode-se aventar que dentre as condições estudadas nessa dissertação para se tratar o silicone contra a adesão de *P. aeruginosa*, nenhuma alcançou resultados desejáveis.

6. CONCLUSÕES

Conforme visto neste trabalho, o tratamento a plasma usando SF₆ resultou no aumento da hidrofobicidade de amostras de poliuretano e silicone. Este aumento foi mais pronunciado para o poliuretano cujos ângulos de contato variaram entre 125 e 135°. Também como foi discutido nos resultados, as condições de tratamento têm forte influência no caráter hidrofóbico, como pode ser verificado quando as amostras de poliuretano foram expostas ao plasma durante 540 s, adquirindo características fortemente hidrofóbicas e quando foram submetidas a altas pressões, adquirindo características hidrofílicas.

As características de uma superfície são fatores importantes na adesão de biofilmes, entretanto esse mecanismo é bastante complexo e não totalmente conhecido. Cada microrganismo tem uma interação diferente com a superfície, devido a fatores físicos, químicos e biológicos.

Através desse trabalho pode-se observar que a repulsão da *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* é favorecida pela hidrofobicidade da superfície, tanto do poliuretano quanto do silicone. Entretanto, nenhuma condição de tratamento foi capaz de impedir a adesão inicial. Pode-se sugerir que alguns tratamentos tiveram melhor comportamento que outros, uma vez que desprenderam maior quantidade de microrganismos, mas ainda não se chegou na condição ideal. São necessários mais estudos para se entender os mecanismos de adesão e a partir daí, estabelecer uma superfície ideal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] TSURUTA, T. et al. (eds). **Biomedical Applications of Polymeric Materials**. Boca Raton: CRC Press, 1993.
- [2] ABE, Y. et al. Present Status of the total artificial heart at the University of Tokyo. **Artificial Organs**, v. 23, n. 3, p. 221, 1999.
- [3] GORMAN, S. P. et al. **Conditioning fluid influences on the surface properties of silicone and polyurethane peritoneal catheters**: implications for infections. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**. V. 8, n. 10, p. 631-635, 1997.
- [4] STOKES, K. et al. The encapsulation of Polyurethane – Insulated Transvenous Cardiac Pacemaker Leads. **Cardiovascular Pathology**. V. 4, n. 3, p. 163-171, 1995.
- [5] MACKAY, T. G. et al. **New polyurethane heart valve prosthesis**: design, manufacture and evaluation. **Biomaterials**. V. 17; n. 19, p. 1857-1863, 1996.
- [6] Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde. **Agencia Nacional de Vigilância Sanitária**. Salvador: 2004.
- [7] SADER, H. S. et al. Antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from the lower respiratory tract of patients with pneumonia in Brazilian hospitals – Results from the SENTRY surveillance program, 1997 and 1998. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. V. 27, n. 2, p. 59-67, 2001.
- [8] SADER, H. S. et al. Sensibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas do trato respiratório de pacientes com infecções respiratórias adquiridas na comunidade: resultados brasileiros do Programa SENTRY de vigilância de Resistência a antimicrobianos dos anos 1997 e 1998. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. V. 27, n. 1, p. 25 -34, 2001.
- [9] PLASMA PHYSICS: History. NASA, Maryland, 28 set. 2004. Disponível em: <http://www-spf.gsfc.nasa.gov/Education/whplasma.html>. Acesso em: 13 out. 2007.
- [10] INAGAKI, N. **Plasma surface modification and Plasma polymerization**. 1.ed. Pennsylvania: Technomic Publishing Company Inc, 1996.

- [11] SCHIMIDT M.; CONRADS, H.. Plasma generation and Plasma Sources. **Plasma Sources Science and Technology**. V. 9. p. 441-454 (2000).
- [12] MOROSOFF, N. An introduction to Plasma Polimerization. In: d'AGOSTINO, R. **Plasma Deposition, Treatment and Etching of Polymers**. New York: Academic Press, 1990.
- [13] YASUDA, H.. **Plasma Polimerization**. 1ed. New York: Academic Press, 1985.
- [14] CHAPMAN, B. **Glow Discharge Processes. Sputtering and Plasma Etching**. 1ed. New York. Willey Interscience Publication.
- [15] PAREDE CELULAR GRAN NEGATIVA. Altura: 257 pixels. Largura: 450 pixels. 41 KB. Formato gif . Disponível. em: <http://www.unb.br/ib/cel/microbiologiamorfologia1/morfologia1.html>>. Acesso em 20/05/2008.
- [16] PAREDE CELULAR GRAN POSITIVA. Altura: 257 pixels. Largura: 450 pixels. 41 KB. Formato gif . Disponível. em: <http://www.unb.br/ib/cel/microbiologiamorfologia1/morfologia1.html>>. Acesso em 20/05/2008.
- [17] MICROBIOLOGIA. In: MICROBIOLOGIA e Imunologia. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP) – Universidade de Campinas – UNICAMP, 2007. Disponível em: <http://www.fop.unicamp.br/microbiologia/index.htm>>. Acessado em 13/10/2007.
- [18] AUMSUWAN, N.; HEINHORST, S.; URBAN, M. W. Antibacterial Surfaces on Expanded Polytetrafluorethylene; Penicillin Attachment. **Biomacromolecules**, Washington, v. 8, p. 713 – 718, fev. 2007.
- [19] COLÔNIA DE *Staphylococcus aureus* em meio Agar Luria, incubado à 37° C por 24 horas. Altura: 400 pixels. Largura: 400 pixels. 42 KB. Formato jpeg. Disponível em: <http://www.microbelibrary.org/asmonly/details.asp?id=2566&Lang=English>>. Acesso em 13/10/2007.
- [20] BALDINI, R.L. Genes envolvidos na patogenicidade da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*. USP – Universidade de São Paulo. São Paulo, 2007. Disponível em: <http://www2.iq.usp.br/docente/baldini/>> . Acesso em 13/10/2007.
- [21] COLONIA DE *Pseudomonas aeruginosa* em meio Agar Luria, incubado à 37° C por 48 horas. Altura: 400 pixels. Largura: 400 pixels. 40 KB. Formato jpeg.

Disponível em: <<http://www.microbelibrary.org/asmonly/details.asp?id=2566&Lang=English>>. Acesso em 13/10/2007.

[22] KYAW, C.M. Biofilmes Microbianos. UnB – Universidade de Brasília. Brasília, 2007. Disponível em: <<http://www.unb.br/ib/cel/microbiologia/biofilme/biofilme.html>>. Acesso em: 13/10/2007.

[23] GRUPO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DO IST. Crescimento Microbiano em biofilmes. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa, 18 nov. 2005. Disponível em: <<http://www.e-escola.pt/site/topico.asp?topico=354>> . Acesso em 13/10/2007.

[24] STOODLEY, P. et al. Growth and detachment of cell clusters from mature mixed species biofilmes. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 67, n. 12, p. 5608 – 5613, dez. 2001.

[25] KAYSER, F.H. et al. **Medical Microbiology**. Nova York: Thieme Stuttgart, 2005.

[26] WATNICK, P. KOLTER, R. Minireview. Biofilm, city of microbes. **Journal of Bacteriology**. .2000. p. 2675-2679.

[27] MANO, E. B.; MENDES, L. C. **Introdução a Polímeros**. 2ed. Rio de Janeiro: Edgard Blucher, 1999.

[28] THE USE OF POLYURETHANES IN MEDICAL DEVICE APPLICATIONS. **Alliance for the Polyurethanes Industries. Technical Bulletin**. Virginia, n. AX 146, 2001.

[29] SOUZA, M. H. L.; ELIAS, D. O. **Fundamentos da Circulação Extracorpórea – Materiais e Biocompatibilidade**. 1ed. Rio de Janeiro: Centro Editorial Alfa Rio, 1995.

[30] CATÉTER PARA HEMODIÁLISE FABRICADO EM POLIURETANO.jpeg. 2007. Altura: 323 pixels. Largura: 290 pixels. 15 KB. Formato: jpeg. Disponível em: <<http://www.iedyt.com/>>. Acesso em 13/10/2007.

[31] SEAL, B.L.; OTERO, T.C.; PANITCH, A.. Polimeric biomaterials for tissue and organ regeneration. **Materials Science and Engineering**. Amsterdam, v. 34, n. 4-5, p. 147-230, 2001.

[32] CATETER NASAL.jpeg.2007. Altura: 162 pixels. Largura: 245 pixels. 5 KB. Formato: jpeg. Disponível em: <<http://www.atosmedical.com>>. Acesso em 30/05/2008.

[33] CASTNER, D.G.; RATNER, B.D.. **Biomedical surface science**. Foundations to frontiers. **Surface Science**. Amsterdam, v. 500, n. 1, p. 28-60, 2002.

[34] SOARES, G.A. **Biomateriais**. Rio de Janeiro: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos – Ciência, Tecnologia e Inovação, 2005.

[35] REID, G. Microbial adhesion to biosurfaces. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**. Nova York, v. 2, p. 513-516, 1997.

[36] ONG, Y. L. et al. Adhesion forces between *E. coli* bacteria and biomaterial surfaces. **Langmuir**, v. 15, p. 2719-2725, 1999.

[37] RICHTER, A.; SMITH, R.; RIES, R. Growth and morphology of biomedical thin films. **Applied Surface Science**, v. 144-145, p. 419-424, 1999.

[38] MAH, T.F.; O'TOOLE, G.A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 34-39, 2001.

[39] ARCIOLA, C.R.; CAMPOCCIA, D.; MONTANARO, L. Effects on antibiotic resistance of *Staphylococcus epidermidis* following adhesion to polymethylmethacrylate and to silicone surfaces. **Biomaterials**, v. 23, p. 1495-1502, 2002.

[40] HUME, E.B.H. et al. The control of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and *in vivo* infection rates by covalently bound furanones. **Biomaterials**, v. 25, p. 5023-5030, 2004.

[41] JEN, A.C.; WAKE, M.C.; MIKOS, A.G. Review: hydrogels for cell immobilization. **Biothecnology and Bioengineering**, v. 50, p. 357-364, 1996.

[42] KLAGES, C.P. Modification and coating of biomaterial surfaces by glow-discharge process. A review. **Biomaterial surfaces**, v. 30, p. 767-774, 1999.

[43] MCGOVERN, J.G. et al. Modification of biomaterial surfaces characteristics by body fluids in vitro. **International Journal of Pharmaceutics**. Florida, v. 149, p. 251-254, 1997.

[44] PISKIN, E. Plasma processing of biomaterials. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 4, n. 1, p. 45-60, 1992.

[45] BAQUEY, C. et al. Plasma treatment of expanded PTFE offers a way to a biofunctionalization of its surface. **Nuclear instruments and methods in Physics research, section B**, v. 151, p. 255-262, 1999.

[46] YASUDA, H.; GAZICKI, M. Biomedical applications of plasma polymerization and plasma treatment of polymer surfaces. **Biomaterials**, v. 3, p. 68-77, 1982.

[47] FAVIA, P.; d'AGOSTINO, R. Plasma treatments and plasma deposition of polymers for biomedical applications. **Surface and Coatings Technology**, v. 98, p. 1102-1106, 1998.

[48] EVERAERT, E.P.J.M. et al. In vitro and in vivo microbial adhesion and growth on argon plasma-treated silicone rubber voice prostheses. **Journal of Materials Science: Material in Medicine**. Amsterdam, v. 9, n. 147, p. 147-157, 1998.

[49] GOTTENBOS, B.; VAN DER MEI, H.C.; BUSSCHER, H.J. Initial adhesion and Surface growth of *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* on biomedical polymers. **Journal of Biomedical Materials Research**. Nova Jérsei, v. 50, p. 208-214, 2000.

[50] FLEMMING, R.G.; CAPELLI C.C.; COOPER S.L.; PROCTOR R. A. Bacterial colonization of functionalized polyurethanes. **Biomaterials**. Florida, v. 21, p. 273-281. 2000.

[51] BELLON, J. M.; G-Honduvilla N.; Jurado F.; G-Carranza A.; Bujan J. *In vitro* interaction of bacteria with polypropylene/ePTFE prostheses. **Biomaterials**. Florida, v. 22, p. 2021-2024, 2000.

[52] TRIANDAFILLU, K. et al. Adhesion of *P. aeruginosa* strains to untreated and oxygen-plasma treated poly (vinyl chloride) (PVC) from endotracheal intubation devices. **Biomaterials**, v. 24, p. 1507-1518, 2003.

[53] SATRIANO, C. et al. Bacterial adhesion onto nanopatterned polymer surfaces. **Materials Science and Engineering**, v. 26, p. 942-946. 2006.

[54] LAROUSSI, M.; MENDES, D.A.; ROSENBERG, M. Plasma interactions with microbes. **New Journal of Physics**, v. 5, p. 1-10. 2003.

[55] CARNAZZA, S. et al Fast exopolysaccharide secretion of *Pseudomonas aeruginosa* on polar surfaces. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 289, p. 386-393. 2005.

[56] ZHANG, W. et al. Surface antibacterial characteristics of plasma modified polyethylene. **Biopolymers**, v. 83, p. 62-68. 2006.

[57] SLAEDEK, R.E.J.; BAEDE, T.A.; STOFFELS, E. Plasma needle treatment of substrates with respect to wettability and growth of *Escherichia coli* and *Streptococcus mutans*. **Transactions on Plasma Science**, v. 34, n. 4, p. 1325-1330. 2006.

[58] RANGEL, E.C. et al. Enhancement of polymer hydrophobicity by SF₆ plasma treatment and argon plasma immersion ion implantation. **Surface and interface analysis**, v. 35, p. 179-183. 2003.

[59] DEKKER, A.; REITSMA, K.; BEUGELING, T.; BANTJES, A.; FEIJEN, J.; KIRKPATRICK, C.J.; VAN AKEN, W.G. Surface modification of hydrophobic polymers for improvement of endothelial cell-surface interactions. **Clinical Materials**. Amsterdam, v. 11, p. 157-162. 1992.

[60] MOLHABILIDADE EM UMA SUPERFÍCIE SÓLIDA. Disponível em: <<http://www.lepten.ufsc.br/disciplinas/emc5416/aulas/aula02.pdf>>. Acesso em: 27/07/2008.

[61] DEFINIÇÃO DO ÂNGULO DE CONTATO θ ENTRE UMA GOTA LÍQUIDA E UMA SUPERFÍCIE PLANA E HORIZONTAL. Disponível em: <www.sorocaba.unesp.br/gpm> . Acesso em: 15/11/2007.

[62] ATKINS, P.; JONES, I. **Princípios de Química: Questionando a vida moderna e o meio ambiente**. 3ed. Porto Alegre: Artmed, p. 216-217, 2007.

[63] EWING, G.W. **Métodos Instrumentais de Análise Química**. 7ed. Volume 1. Ed. Edgard Blucher Ltda.

[64] SCHEINMANN, F. **An introduction to Spectroscopic Methods for the identification of organic compounds**. Oxford: Pergamon Press.

[65] RANGEL, E.C. **Polimerização em plasmas de misturas de alguns hidrocarbonetos com nitrogênio e gases nobres**. Dissertação (Mestrado em Física).1995.81 f. Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas, julho/1995.

[66] TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 8ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

[67] ABSORÇÃO DE UM FEIXE DE LUZ ATRAVESSANDO UMA CUBETA DE COMPRIMENTO l. Altura: 600 pixels, largura: 504 pixels. 117 KB. Formato png. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Lei_de_Beer_Lambert>. Acessado em: 30/05/2008.

[68] RANGEL, E. C.; GADIOLI, G. Z.; CRUZ, N. C.. Investigations on the Stability of Plasma Modified Silicone Surfaces. **Plasmas and Polymers**. Amsterdam, v. 09, n. 1, p. 35-48. 2004.

[69] POPAT, K.C.; JOHNSON, R.W.; DESAI, T.A. Characterization on vapor deposited thin silane films on silicon substrates for biomedical microdevices. **Surface and Coatings Technology**, v. 154, p. 253-261. 2002.

[70] FOTOGRAFIA DE UMA MICROPLACA DE 96 POÇOS (TPP®). Disponível em: <<http://pt.wikipedia.org/wiki/Microplaca>>. Acessado em 27/07/2008.

[71] GOERES, D.M. et al Statistical assessment of a laboratory method for growing biofilms. **Microbiology**, v. 151, p. 757-762. 2005

[72] BOARI, C.A. **Formação de Biofilme em Aço inoxidável por *Aeromonas hydrofila* e *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de cultivo**. Tese (Doutorado em Ciências dos alimentos). Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2008.

[73] DOYLE, R.J. **Methods in Enzymology**. V.310. Academic Press, 1999.

[74] NATHARIKA, A.; HEINHORST, S.; URBAM, M.W. Antibacterial surfaces on expanded Polytetrafluoroethylene; Penicillin attachment. **Biomacromolecules**, v. 8, p. 713-718. 2007.

[75] FREE, R.H.; VAN DER MEI, H.C.; DYK, F.; VAN WISSENBRUCH, R.; ALBERS, F.W.J. Biofilm formation on voices prostheses: influence of dairy products *in vitro*. **Acta Otolaryngologica**, v.120; p. 92-99. 2000.

[76] YOSHIDA, M. et al. Experimental study on a new sterilization processing using plasma source ion implantation with N₂ gas. **The Journal of Vacuum Science & Technology A**, v. 21, n. 4, p. 1230-1236. 2003.

[77] AOL, I. et al. The aging study on Polyethylene Therephthalate with surface modification by water vapor plasma. **Plasma Science & Technology**, v. 3, n.3, p. 761-764, 2001.

[78] CHATELIER, R.C. et al. Effects of Plasma Modification Conditions on Surface Restructuring. **Langmuir**, v. 11, p. 2585 – 2591, 1995.

[79] LUCCHESI, A.R. et al. Estudo da interação de células VERO/PLGA após a modificação por plasma de oxigênio. **Revista Matéria**, v. 12, n. 1, p. 164-172, 2007.