



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JULIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CÂMPUS DE ARARAQUARA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE BIOMATERIAIS E
BIOPROCESSOS**

MESTRADO PROFISSIONAL

**DESENVOLVIMENTO DE PROTÓTIPO PARA REMOÇÃO DE
BIOFILMES EM TUBULAÇÕES DE ÁGUA DO CIRCUITO DE
HEMODIÁLISE UTILIZANDO RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA-C.**

FERNANDO ANTONIO STORION JUNIOR

ORIENTADOR: Prof. Dr. ANA MARISA FUSCO

ALMEIDA

ARARAQUARA - SP

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

DESENVOLVIMENTO DE PROTÓTIPO PARA REMOÇÃO DE
BIOFILMES EM TUBULAÇÕES DE ÁGUA DO CIRCUITO DE
HEMODIÁLISE UTILIZANDO RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA-C.

FERNANDO ANTONIO STORION JUNIOR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos (Mestrado Profissional), Área de Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos.

ORIENTADOR: Prof. Dr. ANA MARISA FUSCO
ALMEIDA

ARARAQUARA - SP

2023

S884d

Storion Junior, Fernando Antonio.

Desenvolvimento de protótipo para remoção de biofilmes em tubulações de água do circuito de hemodiálise utilizando radiação Ultravioleta-C / Fernando Antonio Storion Junior. – Araraquara: [S.n.], 2023.

91 f. : il.

Dissertação (Mestrado Profissional) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos. Área de Biomateriais e Bioprocessos.

Orientadora: Ana Marisa Fusco Almeida.

1. Hemodiálise. 2. Água. 3. Biofilmes. 4. LEDs UVC. 5. Esterilização.
I. Fusco Almeida, Ana Marisa, orient. II. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas

UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030170P0

Esta ficha não pode ser modificada



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA



Câmpus de Araraquara

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Desenvolvimento de protótipo para remoção de biofilmes em tubulações de água do circuito de hemodiálise utilizando radiação Ultravioleta-C

AUTOR: FERNANDO ANTONIO STORION JUNIOR

ORIENTADORA: ANA MARISA FUSCO ALMEIDA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos, área: Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ANA MARISA FUSCO ALMEIDA (Participação Virtual)
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da Unesp

Prof. Dr. DARÍO ABEL PALMIERI (Participação Virtual)
Departamento de Biotecnologia / Faculdade de Ciências e Letras do Câmpus de Assis da Unesp

Dra. ELOISA APARECIDA MOCHEUTI KRONKA (Participação Virtual)
All Sukkar Biotecnologia Industrial

Araraquara, 29 de março de 2023

Agradecimentos

Dentre todos aqueles que me ajudaram a tornar este trabalho realidade, gostaria especialmente de agradecer:

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista – UNESP, campus de Araraquara – SP e ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos pela oportunidade de realizar este mestrado.

Ao SEBRAE, pela aprovação deste projeto em seu programa de fomento: Catalisa – ICT e pelo financiamento que permitiu a viabilização financeira desta pesquisa.

A minha orientadora Ana Marisa Fusco Almeida pela ajuda, conselhos, orientações e oportunidades fornecidas durante os dois anos de vigência deste trabalho.

Aos mestrandos e amigos Tiago Azevedo Cunha e Angélica Romão Carvalho, pela cooperação em momentos e etapas decisivas da elaboração e conclusão deste trabalho.

A todos os pesquisadores do laboratório de Proteômica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas pelos treinamentos e auxílios fornecidos em ambiente laboratorial.

A empresa NOCK – Pesquisa e Desenvolvimento de Equipamentos de Esterilização Ltda, da qual sou sócio, e todos os colaboradores diretos e indiretos da empresa pelo envolvimento na execução da pesquisa.

Ao Hospital de Base de São José do Rio Preto – SP, Santa Casa de misericórdia de São Carlos – SP e Clínica da Vitta de Bauru – SP, por abrir as portas de suas clínicas de hemodiálise para a realização de visitas técnicas, que permitiram o melhor entendimento e desenvolvimento do trabalho.

A minha família, meus pais Márcia e Fernando Storion e minhas Avós Maria e Laudina pelo suporte emocional e financeiro, por lapidar, desde a minha primeira infância, o caminho para que eu pudesse chegar até este ponto e por ser a base e refúgio para momentos de dificuldade e também para momentos de felicidade.

A Heloísa Guerra, minha namorada, pelo enorme companheirismo, por todo o suporte emocional e por todos os momentos felizes que me ajudam a seguir em frente e me estimulam a ser sempre uma pessoa e um profissional melhor.

Por fim, a todos os meus amigos e amigas que fazem parte da minha jornada e tornam meus dias mais leves e divertidos, em especial aos meus amigos de infância André, Heloísa, Luis Fernando, Thiago e Matheus e aos meus amigos de faculdade João Vinicius, Rodrigo, Tiago e Thomson.

Resumo

O tratamento de hemodiálise, que realiza o processo de filtragem artificial dos rins, é altamente invasivo e torna seus pacientes imunossuprimidos. Os quase 150 mil pacientes que realizam hemodiálise por ano apresentam uma taxa anual de morte de 25% e tem a contaminação como a segunda maior causa de morte. Dentre a diversas formas que uma pessoa com doença renal crônica (DRC) tem de se contaminar, a contaminação da água é uma das mais relevantes, pois um paciente entra em contato com até 600L de água por semana, que cairá diretamente em sua corrente sanguínea. Um dos maiores problemas da contaminação da água é a formação de biofilmes nos ductos que ligam a estação de tratamento às máquinas de hemodiálise, pois trata-se de um sistema longo e interconectado que normalmente recebe apenas uma desinfecção química mensal. Esses biofilmes podem liberar endotoxinas capazes de causar diversas comorbidades e até a morte. Portanto, este trabalho traz uma solução para a esterilização de paredes dos ductos de água de hemodiálise, que é a esterilização através de LEDs emissores de radiação Ultravioleta-C (UVC), uma onda eletromagnética capaz de quebrar cadeias de DNA dos microrganismos. Este trabalho consistiu na: comprovação microbiológica de eficácia dos LEDs UVC contra os biofilmes fúngicos e bacterianos das principais espécies encontradas em circuitos de hemodiálise através da confecção de um corpo de prova que foi aplicado sobre placas de microtitulação de 96 poços; na pesquisa e construção de um protótipo que funcione como um cateter invólucro de fitas de LED UVC e que pudesse ser introduzido dentro das tubulações dos circuito de tratamento de água de hemodiálise. Resultados mostraram a viabilidade e exequibilidade do protótipo, bem como o potencial de esterilização dos LEDs UVC frente a biofilmes fúngicos de leveduras e filamentosos e biofilmes bacterianos em estado de completa maturação com uma dose de 2,3J/cm² aplicado durante 2h.

Palavras-chave: hemodiálise, água, biofilmes; LEDs UVC; esterilização

Abstract

Hemodialysis treatment, which performs the process of artificial filtering of the kidneys, is highly invasive and makes its patients immunosuppressed. The nearly 150,000 patients who undergo hemodialysis in a year have an annual death rate of 25% and contamination is the second biggest cause of death. Among the several ways that a person with chronic kidney disease (CKD) can contract this contamination, the water contamination is one of the most relevant, as a patient comes into contact with up to 600L of water per week, which enters in direct contact with their blood flow. One of the biggest problems of water contamination is the formation of biofilms in the ducts that connect the filtration treatment plant to the hemodialysis machines, as it is a long and interconnected system that normally receives only a monthly chemical disinfection. These biofilms can release endotoxins capable of causing several comorbidities and even death. Therefore, this work brings a solution for the sterilization of walls of hemodialysis water ducts, which is sterilization through LEDs emitting Ultraviolet-C (UVC) radiation, an electromagnetic wave capable of breaking DNA chains of microorganisms. This work consisted of: microbiological proof of the effectiveness of UVC LEDs against fungal and bacterial biofilms of the main species found in hemodialysis circuits by making a first prototype that was applied to 96-well microtiter plates; the research and construction of a more faithful prototype that works as a catheter with UVC LED strips inside it and that could be introduced into the pipes of the hemodialysis water treatment circuit. Results showed the feasibility of the faithful prototype, as well as the sterilization potential of UVC LEDs against yeast and filamentous fungal biofilms and bacterial biofilms in a state of complete maturation with a dose of 2.3J/cm² applied for 2h.

Keywords: hemodialysis, water, biofilms; UVC LEDs; sterilization

Lista de Figuras

Figura 1:	Filtragem por difusão dentro do dialisador.....	17
Figura 2:	Número de pacientes em tratamento de hemodiálise no Brasil.....	18
Figura 3:	Taxa de mortalidade anual de pacientes em hemodiálise no Brasil.....	18
Figura 4:	Processo de filtragem de água para hemodiálise mais utilizado no Brasil.....	20
Figura 5:	Eficácia do poder germicida (%) em relação ao comprimento da onda eletromagnética (λ).....	22
Figura 6:	Buscas por patentes no INPI relacionando a UVC à hemodiálise (a) e à água (b).....	31
Figura 7:	Desenho esquemático da configuração de circuito em série e paralelo.....	36
Figura 8:	Desenho esquemático do circuito elétrico do corpo de prova.....	37
Figura 9:	Corpo de prova montado (a); disposição dos LED's de maneira a produzir incidência direta de um LED por poço (b) e utilização do corpo de prova durante o procedimento experimental (c).....	38
Figura 10:	Esquema simplificado da incidência de radiação nos poços.....	40
Figura 11:	Curva de absorvância da <i>C. albicans</i> em meio DSG.....	54
Figura 12:	Curva de absorvância da <i>C. albicans</i> em meio DCG.....	54
Figura 13:	Curva de absorvância da resazurina para a <i>C. albicans</i>	55
Figura 14:	Curva de absorvância da <i>C. parapsilosis</i> para a resazurina.....	56
Figura 15:	% de inibição celular da <i>C. albicans</i> e <i>C. parapsilosis</i> após 2h de exposição à radiação UVC.....	56
Figura 16:	Porcentagem de biomassa dos biofilmes de <i>C. albicans</i> e <i>C. parapsilosis</i> após exposição UVC.....	59
Figura 17:	Crescimento em UFC/ml dos controles de <i>C. albicans</i> e <i>C. parapsilosis</i> em meio DSG, DCG e RPMI.....	60
Figura 18:	Crescimento de UFC de <i>C. albicans</i> (a) e <i>C. parapsilosis</i> (b) após período de incubação.....	61
Figura 19:	Curva de absorvância da resazurina para a <i>K. pneumoniae</i>	62
Figura 20:	Curva de absorvância da resazurina para a <i>P. aeruginosa</i>	62

Figura 21:	% de inibição celular dos biofilmes de <i>K. pneumoniae</i> e <i>P. aeruginosa</i> após 2h de exposição à UVC.....	63
Figura 22:	Porcentagem de biomassa dos biofilmes de <i>K. pneumoniae</i> e <i>P. aeruginosa</i> após exposição UVC.....	65
Figura 23:	Contagem de UFC dos controles de <i>K. pneumoniae</i> e <i>P. aeruginosa</i> em meios DSG e DCG.....	67
Figura 24:	Contagem de UFC de <i>K. pneumoniae</i> e <i>P. aeruginosa</i> em meio caldo MH.....	67
Figura 25:	Crescimento de UFC de <i>K. pneumoniae</i> (a) e <i>P. aeruginosa</i> após 24h de incubação (b).....	68
Figura 26:	Curva de absorbância da resazurina para o <i>A. fumigatus</i>	69
Figura 27:	Curva de absorbância da resazurina para o <i>A. niger</i>	70
Figura 28:	% de inibição celular dos biofilmes de <i>A. fumigatus</i> e <i>A. niger</i> após 2h de exposição à UVC.....	71
Figura 29:	% de biomassa dos biofilmes de <i>A. fumigatus</i> e <i>A. niger</i> após exposição UVC.....	73
Figura 30:	Crescimento de UFC de <i>A. fumigatus</i> (a) e <i>A. niger</i> após 30h de incubação (b).....	74
Figura 31:	Crescimento em UFC/ml dos controles de <i>A. fumigatus</i> e <i>A. niger</i> em meio DSG, DCG e RPMI.....	75
Figura 32:	Fita de LED adquirida.....	76
Figura 33:	Figura esquemática para a determinação da distância mínima.....	76
Figura 34:	Transmitância de materiais poliméricos fotoquímicos.....	77
Figura 35:	Amostra do cateter.....	78
Figura 36:	Vistas frontal e lateral do sistema de esterilização do protótipo.....	79
Figura 37:	Desenho técnico do protótipo.....	80

Lista de Tabelas

Tabela 1:	Análise estatística de inibição de viabilidade celular para os biofilmes de <i>C. albicans</i> e <i>C. parapsilosis</i>	57
Tabela 2:	Análise estatística para redução de biomassa através do método cristal violeta para <i>C. albicans</i> e <i>C. parapsilosis</i>	59
Tabela 3:	Análise estatística de inibição de viabilidade celular para os biofilmes de <i>K. pneumoniae</i> e <i>P. aeruginosa</i>	64
Tabela 4:	Análise estatística para redução de biomassa através do método cristal violeta para <i>K. pneumoniae</i> e <i>P. aeruginosa</i>	66
Tabela 5:	Análise estatística de inibição de viabilidade celular para os biofilmes de <i>A. fumigatus</i> e <i>A. niger</i>	72
Tabela 6:	Análise estatística para redução de biomassa através do método cristal violeta para <i>A. fumigatus</i> e <i>A. niger</i>	73

Lista de Abreviaturas

- ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- CLSI: *Clinical & Laboratorial Standards Institute*
- DCG: Dialisato Com Glicose
- DNA: Ácido Desoxirribunucleico
- DRC: Doença Renal Crônica
- DSG: Dialisato Sem Glicose
- ETFE: Etileno Tetrafluoroetileno
- INPI: Instituto Nacional de Propriedade Industrial
- LED: *Light Emitting-Diode*
- MH: *Mueller Hinton*
- PBS: *Phosphate Buffered Saline*
- PVC: Policloreto de Vinila
- RDC: Resolução da Diretoria Colegiada
- RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*
- SBN: Sociedade Brasileira de Nefrologia
- SEBRAE: Serviço Brasileiro de Apoio as Empresas
- SENAI: Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial
- TRL: *Time Readness Level*
- UFC: Unidades Formadoras de Colônia
- USRDS: *United States Renal Data System*
- UVA: Ultravioleta-A
- UVB: Ultravioleta-B
- UVC: Ultravioleta-C
- VDC: Fonte de Tensão Contínua
- a*: Ângulo de iluminação do LED (em °)
- d*: Diâmetro do poço da placa de microtitulação de 96 poços (cm)
- h*: Altura do LED em relação ao fundo do poço (cm)
- h1*: Distância do LED à parede da tubulação (cm)
- I*: Corrente Elétrica do LED (A)
- P*: Confiabilidade de 95%
- P_L*: Potência nominal do LED (W)

- r : Distância entre o LED e qualquer objeto que se pretende irradiar (cm)
- r_1 : Distância perpendicular entre o LED e o fundo do poço (cm)
- r_2 : Distância entre o LED e a aresta do poço (cm)
- R : Valor da nominal dos resistores do circuito do corpo de prova (Ω)
- R_i : Resistência elétrica (Ω)
- t : Tempo de exposição do experimento (s)
- V_L : Tensão Elétrica do LED (V)
- V_R : Tensão Elétrica do resistor (V)
- λ : Comprimento de onda eletromagnética (nm)
- ϕ : Intensidade de radiação ($\mu\text{W}/\text{cm}^2$)
- φ : Dose de radiação (mJ/cm^2)
- %: Porcentagem

Sumário

1	Introdução.....	17
2	Objetivos.....	24
3	Revisão Bibliográfica.....	26
3.1	Revisão Científica.....	26
3.1.1	Revisão de utilização da tecnologia UVC na remoção de biofilmes.....	26
3.1.2	Outros métodos de desinfecção utilizados na desinfecção de tubulações de água do circuito de hemodiálise.....	30
3.2	Revisão de propriedade industrial.....	31
3.3	Busca Mercadológica.....	33
4	Metodologia.....	35
4.1	Comprovação microbiológica.....	35
4.1.1	Construção do corpo de prova e testes pré-experimentais.....	35
4.1.2	Microrganismos e meios de cultura utilizados durante o experimento.....	41
4.1.3	Metodologia de análise para <i>C. parapsilosis</i> e <i>C. albicans</i>	42
4.1.3.1	Condições de cultivo e exposição à UVC das espécies <i>C. parapsilosis</i> e <i>C. albicans</i>	42
4.1.3.2	Atividade metabólica da <i>C. parapsilosis</i> e <i>C. albicans</i> através do ensaio de resazurina.....	43
4.1.3.3	Análise de biomassa da <i>C. parapsilosis</i> e <i>C. albicans</i> através do ensaio de cristal violeta.....	44
4.1.3.4	Contagem de UFC da <i>C. parapsilosis</i> e <i>C. albicans</i>	44
4.1.4	Metodologia de análise para <i>K. pneumoniae</i> e <i>P. aeruginosa</i>	45
4.1.4.1	Condições de cultivo e exposição à UVC das espécies <i>K. pneumoniae</i> e <i>P. aeruginosa</i>	45
4.1.4.2	Atividade metabólica da <i>K. pneumoniae</i> e <i>P. aeruginosa</i> através do ensaio de resazurina.....	45
4.1.4.3	Análise de biomassa da <i>K. pneumoniae</i> e <i>P. aeruginosa</i> através do ensaio de cristal violeta.....	46
4.1.4.4	Contagem de UFC da <i>K. pneumoniae</i> e <i>P. aeruginosa</i>	47
4.1.5	Metodologia de análise para <i>A. fumigatus</i> e <i>A. niger</i>	47

4.1.5.1	Condições de cultivo e exposição à UVC das espécies <i>A. fumigatus</i> e <i>A. niger</i>	48
4.1.5.2	Atividade metabólica da <i>A. fumigatus</i> e <i>A. niger</i> através do ensaio de resazurina.....	48
4.1.5.3	Análise de biomassa da <i>A. fumigatus</i> e <i>A. niger</i> através do ensaio de cristal violeta.....	49
4.1.5.4	Contagem de UFC do <i>A. fumigatus</i> e <i>A. niger</i>	49
4.2	Definição de parâmetros para a construção do protótipo.....	50
5	Resultados	52
5.1	Confeção do corpo de prova para comprovação antimicrobiana.....	52
5.2	Testes microbiológicos em <i>Candida albicans</i> e <i>Candida parapsilosis</i>	53
5.2.1	Testes de atividade metabólica através da Resazurina em <i>C. albicans</i> e <i>C. parapsilosis</i>	53
5.2.2	Quantificação de biomassa através de Cristal Violeta em <i>C. albicans</i> e <i>C. parapsilosis</i>	58
5.2.3	Contagem de Unidades Formadoras de Colônias para <i>C. albicans</i> e <i>C. parapsilosis</i>	59
5.3	Testes microbiológicos em <i>Klebsiela pneumoniae</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	61
5.3.1	Testes de atividade metabólica através da Resazurina em <i>K. pneumoniae</i> e <i>P. aeruginosa</i>	61
5.3.2	Quantificação de biomassa através de Cristal Violeta em <i>K. pneumoniae</i> e <i>P. aeruginosa</i>	65
5.3.3	Contagem de Unidades Formadoras de Colônias em <i>K. pneumoniae</i> e <i>P. aeruginosa</i>	66
5.4	Testes microbiológicos em <i>Aspergillus fumigatus</i> e <i>Aspergillus niger</i>	69
5.4.1	Testes de atividade metabólica através da Resazurina em <i>A. fumigatus</i> e <i>A. niger</i>	69
5.4.2	Quantificação de biomassa através de Cristal Violeta em <i>A. fumigatus</i> e <i>A. niger</i>	72
5.4.3	Contagem de Unidades Formadoras de Colônias em <i>A. fumigatus</i> e <i>A. niger</i>	74
5.5	Definição de parâmetros para a construção do protótipo.....	76

5.5.1	Definição da fita de LED.....	76
5.5.2	Definição do cateter.....	77
5.5.3	Desenho do protótipo.....	79
6	Discussão.....	80
7	Conclusões.....	83
7.1	Perspectivas da pesquisa.....	83
7.2	Perspectivas de investimento.....	84
7.3	Perspectivas mercadológicas.....	85
8	Referências.....	87

1. Introdução

A hemodiálise consiste em um processo alternativo de filtragem do sangue, substituindo a função dos rins na remoção de toxinas e excesso de água do organismo quando estes apresentam uma falha crônica em seu funcionamento. O principal instrumento responsável pela filtragem do sangue no circuito de hemodiálise é o dialisador (rim artificial), onde o sangue rico em toxinas é filtrado por difusão, junto ao dialisante, que é constituído essencialmente por água altamente purificada com sais minerais ricos em eletrólitos. A Figura 1 ilustra o esquema de funcionamento de filtragem por difusão.

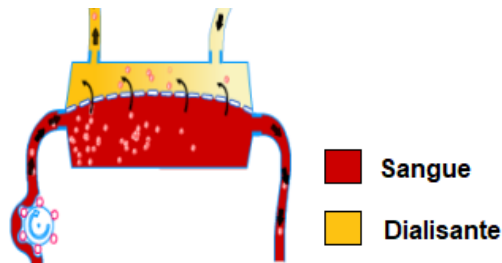


Figura 1 – Filtragem por difusão dentro do dialisador (do VAL, 2019)

No dialisador, os eletrólitos do dialisante retiram componentes químicos tóxicos do sangue, como a ureia, que deveriam ser eliminados pela urina no processo de filtragem natural dos rins. Além disso, durante a difusão, a retirada do excesso de água do sangue é viabilizada pela alta concentração do dialisante, tornando-o indispensável à filtragem do sangue e fundamental ao processo de hemodiálise.

O procedimento de hemodiálise é altamente invasivo e seus pacientes, devido as condições de saúde que a doença renal crônica impõe, são imunossuprimidos e altamente suscetíveis a contração de doenças e contaminações. O Censo Brasileiro de Nefrologia (2020) (NERBASS et. al., 2022), encomendado pela Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN), traz os números e taxa de mortalidade de pacientes hemodialíticos em 2020 na Figura 2 e Figura 3, respectivamente.

Como podemos ver na Figura 2, o número de pacientes que demandam um tratamento devido a apresentação de um problema renal crônico vem crescendo no Brasil em uma taxa constante e suas causas estão relacionadas a diferentes fatores, tendo o diabetes e a hipertensão como os principais responsáveis no aumento desses números. Associado a isso, existe uma subnotificação da demanda real pelo

tratamento de hemodiálise, devido à falta de acesso a clínicas em regiões mais carentes.

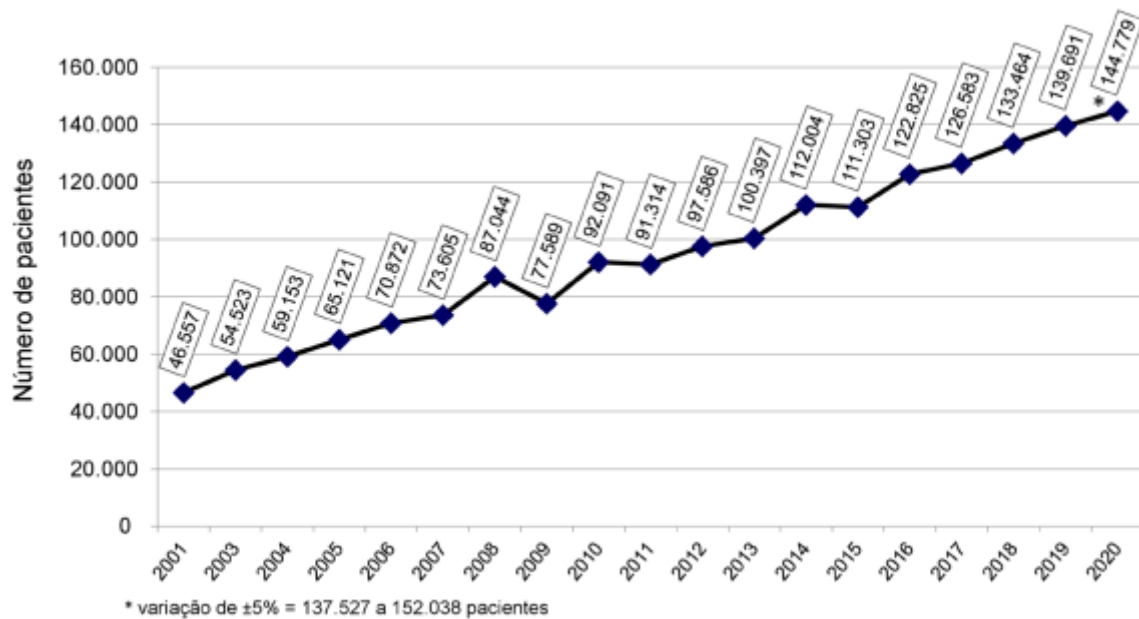


Figura 2 – Número de pacientes em tratamento de hemodiálise no Brasil

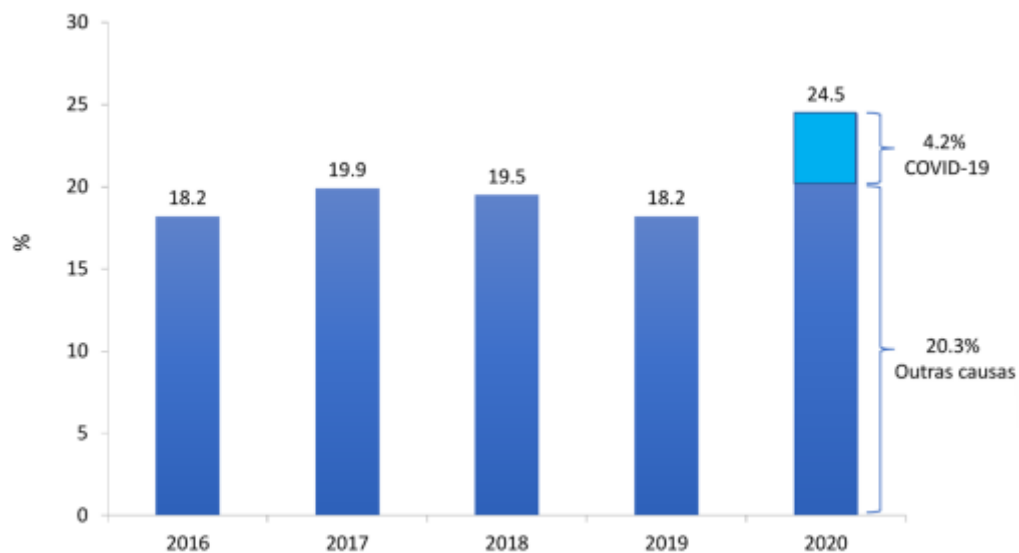


Figura 3 – Taxa de mortalidade anual de pacientes em hemodiálise no Brasil

A Figura 3 nos mostra a altíssima taxa de mortalidade anual daqueles que se submetem ao tratamento de hemodiálise, chegando ao pico com um índice de 24,5% no ano de 2020, considerando-se as mortes decorrentes da Pandemia de Covid-19. Esse número não só assusta, mas demonstra a condição imunossuprimida dos

pacientes, onde a morte por Covid-19 ficou em 176 mortes a cada 10 mil pessoas (NERBASS et. al., 2022). Caso esse fosse o número médio de mortes no mundo por Covid-19, a pandemia teria matado 123,2 milhões de pessoas e não 6,6 milhões, que são os dados atuais.

Quando olhamos para a *United States Renal Data System* (USRDS) (2019), base de dados americana de pacientes com Doenças Renais Crônicas (DRC), nos Estados Unidos o número de pacientes em tratamento de hemodiálise supera os 400 mil e o seu custo é cerca de um sexto de todo o gasto em saúde americano, que é de cerca de 280 bilhões de dólares, ou seja, cerca de 50 bilhões de dólares. Ainda, segundo Htay et. al. (2021), em uma publicação no *American Journal of Kidney Diseases* (AJKD), existem, no mundo, cerca de 4,5 centros de hemodiálise por milhão de pessoas e que cada paciente custa em média, por ano, USD 22.616,80. Ao estimar esses números para uma população mundial de 8 bilhões de habitantes, chegamos ao número de cerca de 36.000 clínicas e gastos anuais superiores a USD 81,42 bilhões somente com pacientes.

Estima-se que contaminações e infecções hospitalares são a segunda maior causa de morte dentre todos os que se submetem a esse tratamento e, enquanto a falha renal e morte decorrentes desta falha são os casos mais bem notificados, as contaminações são comumente subnotificadas devido ao equívoco de sinalizar esse tipo de morte como simples decorrência do problema renal (GUPTA & YASSIN, 2013). Dentro do campo da contaminação, a contaminação da água utilizada no processo de filtragem do sangue é um dos mais graves, pois estima-se que um paciente em tratamento usa cerca de 360 a 600 litros de água por semana (WARD, 2011). Caso a água não esteja devidamente filtrada, ela pode acabar sendo contaminada química e/ou microbiologicamente e adentrar na corrente sanguínea daqueles com DRC, causando efeitos colaterais adversos e muitas vezes difíceis de detectar (COULLIETE & ARDUINO, 2013).

Durante o tratamento da água, ela passa por diversos níveis de filtragem até chegar à máquina de hemodiálise e entrar na corrente sanguínea dos pacientes, como mostra a Figura 4. A Figura 4 mostra o sistema padrão de tratamento de água estabelecido pelas Resoluções de Diretoria Colegiada (RDC) RDC nº 154/2004 e RDC nº 11/2014 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Nele, a água que chega do sistema de abastecimento (*tap water*) é armazenada em um reservatório. Em seguida, ela passa necessariamente por pelo menos 4 etapas de filtragem, sendo

três delas de filtragem química e pelo menos um passo de filtragem por osmose reversa. Por fim, a água é armazenada em um segundo tanque reservatório (*tank*), onde ela entra em processo de recirculação contínuo em um sistema de tubulações que conectam esse tanque com as máquinas de hemodiálise, fazendo com que as máquinas recebam essa água como insumo para a formação do dialisato que será utilizado na filtragem sanguínea.

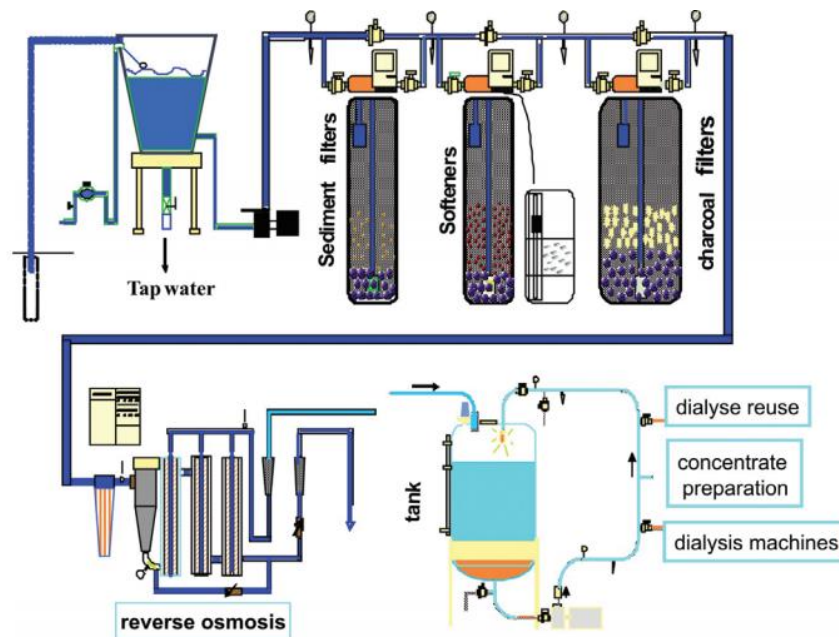


Figura 4 – Processo de filtragem de água para hemodiálise mais utilizado no Brasil (MONTARI et.al, 2009)

O sistema de filtragem da água, dependendo do tamanho da clínica e o seu número de pacientes, pode ser extenso e conter diversas interconexões tubulares para que ela possa ser entregue até as máquinas onde ocorrerá a filtragem sanguínea por difusão. Essas tubulações que conectam o tanque reservatório (*tank*, da Figura 4) às máquinas de hemodiálise precisam ser mantidas o mais simples possível em ordem de tentar evitar que curvas, cotovelos, diferenças de altura, dentre outras variáveis físicas possibilitem a deposição e a possível formação de colônias de microrganismos, denominadas biofilmes (ISAKOZAWA; MIGITA; TAKESAWA, 2016). Essa formação colonial, muito comum em tubulações, formada por diferentes tipos de microrganismos como bactérias, fungos e protozoários, é fonte constante de endotoxinas, peptidoglicano e fragmentos de DNA bacteriano (YAZAKASAWA; MIGITA; TAKESAWA, 2016).

Esses compostos liberados pelos microrganismos, capazes de atravessar a membrana de filtração do dialisador, podem entrar na corrente sanguínea do paciente, causando febre, hipotensão, enxaqueca e/ou náusea e infecções sistêmicas graves, principais efeitos colaterais apresentados pelos que se submetem à hemodiálise (VERMA et.al, 2015). Estudos sugerem que a exposição contínua por longos períodos às endotoxinas é responsável por causar doenças à longo prazo como morbidade, β 2 amiloidose e aterosclerose (VERMA et.al, 2015).

Bactérias representadas pelos bacilos Gram Negativos também co-habitam biofilmes em sistemas de hemodíalises e *Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo Gram Negativo não fermentador de veiculação hídrica, capaz de formar biofilmes, sendo um dos encontrados mais frequentemente em surtos de infecções associadas à pacientes usuários de hemodíalises (NOVOSAD et. al., 2019). Além disso, fungos oferecem um risco adicional devido às complicações decorrentes de suas infecções sistêmicas, sendo *Aspergillus sp*, *Candida sp* e *Fusarium sp* os gêneros mais estudados em ambientes de hemodiálise recentemente (OLIVEIRA et. al., 2018). Em Pires-Gonçalves et. al. (2008), foi realizada uma análise da água de hemodiálise em um centro do estado de São Paulo, encontrando mais de 9 tipos de fungos patogênicos, dentre eles os do gênero *Aspergillus sp* e *Cândida sp*.

O atual método de prevenção de formação de biofilmes nas paredes das tubulações e que atualmente é preconizado pela ANVISA é o método de remoção química, principalmente através da utilização de ácido peracético. Além disso, as RDCs preveem, como obrigatório às clínicas de hemodiálise, uma desinfecção química mensal, enquanto biofilmes bacterianos de *P. aeruginosa* e do gênero *Cândida sp*. se formam, em condições favoráveis, em apenas 24 e 48h, respectivamente, segundo a padronização da *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Além disso, revisões bibliográficas como as de Isakozawa, Migita e Takesawa (2016), Marion-Ferey et.al (2003) e Holmes et.al (2004), mostram que métodos de remoção química apresentam o mesmo tipo de dificuldade: a descontaminação exige um cuidado especial e dificultoso por utilizar agentes químicos e tóxicos ao ser humano, que podem causar diferentes efeitos colaterais nos pacientes.

Uma nova alternativa de desinfecção, apresentada nesta proposta de pesquisa, busca utilizar um método físico alternativo como sanitizante: a radiação ultravioleta de baixo comprimento de onda (UVC), que possui uma tecnologia germicida com alta

eficácia e cientificamente comprovada onde, segundo a Sociedade Internacional Ultravioleta, uma dose de 40 mJ/cm² para o comprimento de onda de 254 nm é suficiente para inativar pelo menos 99,99% de qualquer microrganismo patogênico em sua forma planctônica (celular) (MACKENZIE, 2020; MALAYERI, 2006).

A radiação ultravioleta são ondas eletromagnéticas que compreendem três diferentes faixas de comprimento de onda: UVA (320-400 nm), UVB (290-320 nm) e UVC (200-290 nm) (WIDEL et.al, 2014). Os raios UVC são os que possuem o maior poder germicida, pois sua radiação tem a capacidade de matar ou inativar microrganismos por meio da danificação do DNA (REEDA, 2010). O principal modo de inativação ocorre quando a absorção do fóton forma dímeros de pirimidina entre as bases nitrogenadas de timina adjacentes do DNA, incapacitando o processo de reprodução desses microrganismos (REEDA, 2010). A Figura 5 ilustra a eficácia (%) do poder germicida UVC em relação ao comprimento de onda eletromagnética (λ [nm]).

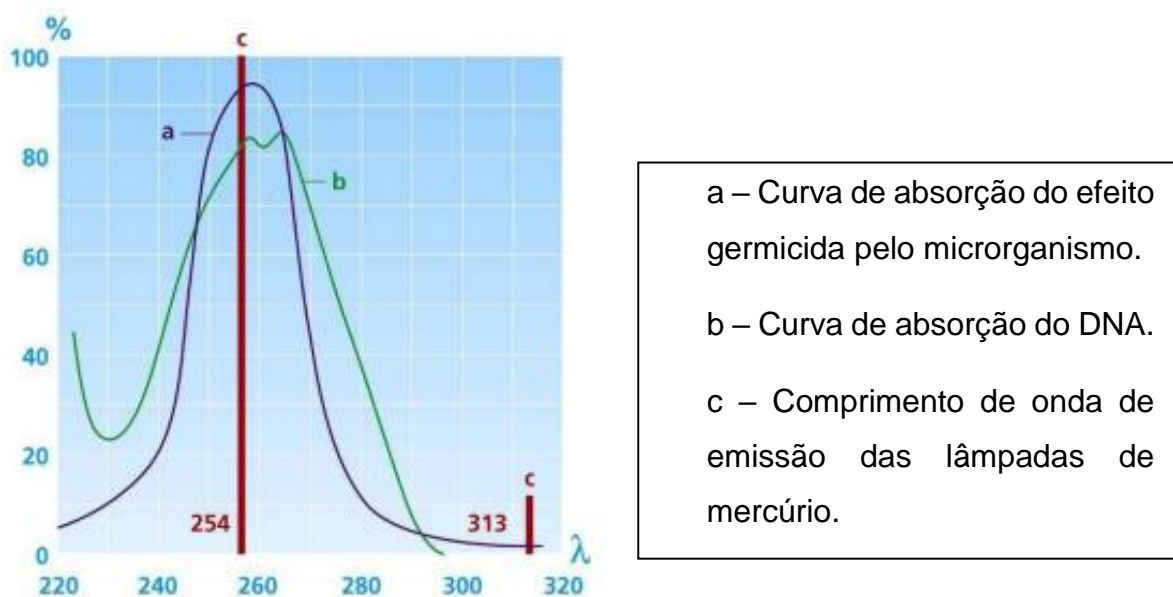


Figura 5 – Eficácia do poder germicida (%) em relação ao comprimento da onda eletromagnética (λ) (RENZEL, 2016).

Como podemos ver, o pico de eficácia germicida do espectro UVC, representado pelas curvas “a” e “b”, se dá entre a faixa de 250 – 270nm, tendo as lâmpadas UVC de baixa pressão de mercúrio, que são as mais comumente comercializadas, com pico de 254nm (curva “c”). Entretanto, dada a problemática da

contaminação em ductos de água do circuito de hemodiálise, é impossível fazer uma desinfecção interna dessas tubulações utilizando uma lâmpada por impedimentos físicos e estruturais (RENZEL, 2016). Portanto, uma nova tecnologia foi buscada para que a lâmpada de baixa pressão de mercúrio pudesse ser substituída, descobrindo-se os *light-emitting diodes* (LEDs) emissores de radiação UVC com pico variando entre 260 – 270nm. Esses LEDs, além de possuírem dimensões reduzidas que permitem a aplicação em ambientes menores, ainda estão dentro da melhor faixa de comprimento de onda eletromagnética germicida e não possuem núcleo de mercúrio, tornando-os mais ecológicos.

A próxima Seção mostrará a revisão bibliográfica realizada em cima dessa tecnologia germicida através do uso de LEDs na remoção dos principais biofilmes encontrados em sistemas de tratamento de água de hemodiálise, tecnologias utilizadas na desinfecção de tubulações e soluções já existentes no mercado que possam ser um impeditivo no desenvolvimento tecnológico desta solução.

2. Objetivos

O objetivo do trabalho foi construir um protótipo para comprovação em laboratório de um cateter contendo fitas de LED UVC que pudesse ser introduzido na tubulação e que fizesse a remoção completa dos principais biofilmes fúngicos e bacterianos encontrados em tubulações do circuito de água de tratamento de hemodiálise. Para atingir esse objetivo, a pesquisa se dividiu em três partes:

1. Comprovação microbiológica de eficácia dos LEDs UVC contra biofilmes fúngicos e bacterianos cultivados em meios dialisatos, que são mais nutritivos que a água e, portanto, favorecem a formação de biofilmes mais resistentes. Nesta etapa, o objetivo concentrou-se em criar um corpo de prova em um circuito contendo LEDs UVC que pudesse ser aplicado diretamente sobre placas de microtitulação de 96 poços com intuito de comprovar a total remoção de biofilmes maduros das seguintes espécies de microrganismos: *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Cândida albicans*, *Cândida parapsilosis*, *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus niger*. Ao fim desta etapa buscou-se determinar o tempo e a dose de radiação necessários para inativar todos esses biofilmes através das análises de UFC/ml, atividade metabólica pela Resazurina, quantificação de biomassa por Cristal Violeta e microscopia de varredura. Essa etapa trata-se da mais longa e que demandará mais minúcia de análise, por se tratar da etapa de comprovação *in vitro* realizada em ambiente controlado e que viabilizará a continuação da pesquisa e do desenvolvimento tecnológico;
2. Pesquisa e construção do protótipo. Esse objetivo consistiu em pesquisar e encontrar um material com todas as propriedades físico-químicas necessárias para funcionar como cateter e invólucro dos LEDs UVC, pesquisar fitas de LED e uma geometria adequada para promover uma varredura axial e longitudinal de toda a superfície da tubulação, criar um desenho desse protótipo, comprar todos os insumos e construí-lo em laboratório com intuito de realizar testes sobre ele;
3. Realização de testes e ensaios microbiológicos e estruturais sobre o protótipo após a sua montagem como forma de comprovar o seu funcionamento (etapa ainda em desenvolvimento). Nesta etapa será introduzido um inóculo

contaminado na tubulação e será avaliado o poder de esterilização dos LEDs UVC em ambiente relevante dentro do protótipo construído.

3. Revisão Bibliográfica

Como a pesquisa desenvolvida se enquadra dentro de um programa de mestrado profissional, que visa não só o desenvolvimento científico, mas também tecnológico e mercadológico, esta revisão bibliográfica pautou-se em três diferentes tipos de fontes como viabilização do desenvolvimento de uma tecnologia germicida através de LEDs UVC para aplicação em tubulações do circuito de tratamento de água de hemodiálise:

1. Revisão científica acadêmica, pautada nos principais artigos científicos que estudaram a utilização de LEDs e lâmpadas UVC na remoção de biofilmes bacterianos e fúngicos e também em artigos científicos que estudaram a remoção de biofilmes em ductos de água de hemodiálise mesmo que não através da tecnologia germicida de LEDs UVC;
2. Revisão patentária de viabilidade tecnológica e de liberdade de operação, buscando as principais patentes existentes no mercado mundial que realizam a desinfecção das paredes de tubulações de água do circuito de hemodiálise utilizando a tecnologia UVC e que possam restringir a liberdade de operação no desenvolvimento tecnológico da pesquisa;
3. Revisão de mercado, buscando soluções já existentes que possam competir direta ou indiretamente com o desenvolvimento tecnológico que é almejado neste projeto de pesquisa.

3.1. Revisão Científica

3.1.1. Revisão de utilização da tecnologia UVC na remoção de biofilmes

Abaixo segue uma revisão bibliográfica de trabalhos que realizaram estudos do efeito da radiação UVC sobre alguns dos microrganismos mais comuns de se encontrar em ambiente aquoso e de hemodiálise, bem como também a dose de radiação necessária para conseguir a inativação desses microrganismos e os principais métodos de análise dessa eficácia de inativação.

No trabalho de Bak et.al (2010), foi demonstrada a eliminação do biofilme composto pela bactéria *Pseudomonas Aeruginosa* em cateteres urinários utilizando LEDs UVC. Seu estudo mostrou que, em tubos de teflon contaminados com biofilme com concentração entre 5×10^5 e 1.3×10^9 Unidades Formadoras de Colônia por ml (UFC/ml), a taxa de desinfecção após exposição à radiação UVC, para períodos entre 15 e 300 minutos, variou entre 96 e 100%. O método de contagem UFC consiste em retirar amostras da solução contaminada após testagem, semear essas amostras em meio de cultura nutritivo e incubá-las em determinada temperatura para verificar a viabilidade desses microrganismos. Caso esses microrganismos estejam viáveis, mesmo após sofrer a irradiação, eles irão se reproduzir durante o período de incubação.

Do-Kyun Kim & Dong-Hyun Kang, (2018) investigaram as constantes da taxa de inativação de vários microrganismos utilizando a matriz de LED UVC como agente sanitizante. Seu estudo mostrou que a eficácia de inativação da infectividade viral alcançou reduções de 5 log sob uma intensidade de radiação de 45 mJ/cm^2 para os vírus MS2, Q β e ϕ X174. A eficácia na inativação de *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus aerossóis* alcançaram reduções de 2,5 a 4 log para uma intensidade de 1,5 a 4,6 mJ/cm^2 . Para a *Aspergillus flavus* e *Alternaria japonica* foram alcançadas reduções de 4 log usando radiação UVC LED.

Gora et. al. (2019) realizaram um estudo da inativação de biofilmes de *P. aeruginosa* através da utilização de LEDs UVC com pico de irradiação em um comprimento de onda de 265nm. Seu estudo mostrou uma inativação de $1,3 \pm 0,2 \text{ log}$ após uma dose de irradiação de 8 mJ/cm^2 .

O estudo realizado por Galezzo & Susa (2021) avaliou o efeito da exposição da radiação UVC de LEDs na inativação de bactérias das espécies *K. pneumoniae* e *E. coli* inoculados em amostras de água na sua forma planctônica. Após exposição a uma dose de radiação de $21,5 \text{ mJ/cm}^2$, foram atingidos uma redução de 7 e 4log para a *E. coli* e *K. pneumoniae*, respectivamente, na contagem de UFC/ml após 24h de incubação à 37°C. Inóculos na forma planctônica indicam microrganismos suspensos em alguma solução sem a formação de colônias e conglomerados que denotam o surgimento de biofilmes.

Argyaki et. al. (2018) mostraram a eficácia de eliminação de biofilmes maduros de *P. aeruginosa*, após 24h de maturação através da utilização de LEDs ultravioleta

com pico de radiação de 296nm. Neste estudo, foi comprovado não só o potencial germicida de LEDs na faixa UVC, UVB e UVA, mas também a possibilidade de um estudo físico-químico de eficácia através de um tratamento fototerápico em conjunto com antibióticos, tendo a luz como catalisadora e potencializadora dos efeitos antibióticos. Já o trabalho de Elasri & Miller (1999) mostrou a eliminação de biofilmes maduros de *P. aeruginosa* em meio de cultura nutritivo Caldo Luria (LB; Gibco-BRL, Gaithersburg, Md.) através de utilização de lâmpadas com pico de irradiação em 256nm. Esse estudo mostrou uma redução na quantidade de Unidades Formadoras de Colônias por mililitros (UFC/ml) de quase 90% após uma irradiação de 20J/cm², mostrando uma porcentagem alta de redução da viabilidade desses biofilmes. Foi possível observar, neste estudo, que quando o biofilme é exposto a radiação UVC em um meio de cultura nutritivo propício para o seu desenvolvimento, a dose de radiação necessária é muito maior que quando ele é exposto em um inóculo formado por água.

Quanto as leveduras, Binns et. al. (2020) realizaram o estudo da eficácia de lâmpadas UVC, com pico de radiação em 254nm, na eliminação de biofilmes maduros de *C. albicans* ATCC90028 cultivados em meio de cultura nutritivo Caldo *Sabouraud* e sobre placas de acrílico em placas de microtitulação de 6 poços. Seu estudo mostrou que, com uma dose de irradiação de 210mJ/cm², foi obtida uma redução de aproximadamente 99,9% na redução das UFC em relação ao grupo controle que não recebeu o tratamento UVC.

Em relação a fungos filamentosos, Sisti et. al. (2017) estudaram a eficácia da desinfecção da radiação UVC em lâmpadas de baixa pressão de mercúrio com pico de radiação em 254nm em diversas espécies do gênero *Aspergillus sp* na sua forma planctônica em água mineral de torneira. Com uma intensidade de radiação de 3,2mW/cm² e com um período de exposição de 40 segundos foi possível eliminar todos os tipos de *Aspergillus* através da contagem de UFC. Embora sejam escassos os estudos da aplicação da UVC sobre biofilmes do gênero *Aspergillus sp*, é muito importante encontrar estudos realizados sobre esse gênero, pois ele é muito comumente encontrado na água, causando aspergilose e liberando aflotoxinas (NOURMORADI et. al., 2012). Nourmoradi et. al. (2012) também realizaram um estudo do efeito da radiação UVC sobre diversas espécies do gênero *Aspergillus sp*. utilizando lâmpadas com comprimento de onda de 254nm. Em seus estudos, *A. niger*, *A. flavus* e *A. fumigatus* foram inativados a um índice de redução de 4log com uma dose de radiação de aproximadamente 25mJ/cm² em sua forma planctônica.

Por fim, Lou et. al. (2022), trouxeram uma revisão bibliográfica de vários estudos que foram realizados sobre a ação da radiação de LEDs UVC em diferentes tipos de biofilmes que se formam em estruturas compostas com água e água de esgoto, tendo tubulações como parte dessas estruturas. Nela, é possível observar que o biofilme mais frequentemente estudado, assim como nos demais artigos dessa revisão bibliográfica, é a bactéria *P. aeruginosa*. Além disso, a revisão apresenta informações importantes como: a redução log na viabilidade de cada espécie de biofilme, período de maturação e tipo de solução aquosa estudada, baseando-se na dose de radiação utilizada pelos LEDs, em mJ/cm^2 , e no pico de comprimento de onda utilizado como fonte emissora de radiação dos LEDs.

A revisão bibliográfica de base científica sustentou que há diversos estudos de análise do efeito da radiação UVC sobre diferentes gêneros e espécies de microrganismos, tanto em sua forma planctônica quanto na formação de biofilmes. Além disso, os estudos mostraram os microrganismos que são mais usualmente encontrados em amostras de água contaminadas e cujos testes são também realizados em amostras contaminadas de água. Foi possível observar, também, que a dose de radiação necessária para eliminar microrganismos em sua forma planctônica é muito menor que a dose necessária para realizar a inativação na forma de biofilme, pois a matriz extracelular formada nos biofilmes oferece resistência a penetração da luz UVC e, portanto, exige maior energia de irradiação para ser inativado. Somado a isso, as doses de radiação aplicadas em cada estudo para atingir a desinfecção ou até a esterilização variam consideravelmente, reforçando a necessidade de um estudo que identifique melhor a dose necessária para inativar os biofilmes.

Foi possível observar que os estudos realizados são majoritariamente voltados para o estudo de viabilidade através da contagem de UFC/ml após período de incubação. Notou-se, portanto, a necessidade de ir além no estudo do efeito da radiação UVC sobre biofilmes, principalmente os supracitados que são mais comuns de serem encontrados em ambiente aquoso e, conseqüentemente, em um sistema de tratamento de água de um circuito de hemodiálise. Por isso, neste trabalho foram estudados, além do método de análise de UFC/ml, estudos de atividade metabólica dos microrganismos através do reagente Resazurina, quantificação de biomassa através do reagente Cristal Violeta e Microscopia de Varredura para visualização do biofilme após exposição. Todos esses métodos de análise são explicados em maiores

detalhes em Materiais e Métodos, mas eles comprovadamente aumentam a confiabilidade da análise e dão maior respaldo para a comprovação científica da eficácia da radiação UVC sobre biofilmes fúngicos e bacterianos.

3.1.2. Outros métodos de desinfecção utilizados na desinfecção de tubulações de água do circuito de hemodiálise

Dentre os métodos mais utilizados para fazer a remoção de microrganismos e biofilmes presentes em ductos de água de hemodiálise, o mais comumente utilizado, inclusive comercialmente, é o processo de ozonização. O ozônio é um composto químico germicida que tem alta eficácia na eliminação de microrganismos e que, quando aplicado em clínicas de hemodiálise, trata-se de um equipamento que oxida o oxigênio, transformando-o em ozônio e aplicando-o na água que está circulando pelas tubulações.

O processo de esterilização via ozonização é um forte concorrente da esterilização ultravioleta, pois trata-se de um método alternativo aos tratamentos químicos convencionais. No entanto, Pohl et. al. (2020) realizaram um estudo da toxicidade dos bioprodutos formados a partir do processo de ozonização em embriões de *zebrafish*, demonstrando que alguns desses bioprodutos diminuem o batimento cardíaco e aumentam os riscos de má formação embrionária. Além disso, água potável pode conter íons de brometo que reagem diretamente com o ozônio formando bioprodutos orgânicos com alta toxicidade (WU et. al, 2020). Portanto, há alguns riscos presentes na ozonização ainda pouco estudados e que o colocam em desvantagem em relação a radiação ultravioleta.

Por outro lado, Souza et. al., (2019) realizaram um estudo para destruir biofilmes de *C. parapsilosis* a partir da vibração de eletrodos filamentosos de tungstênio (W/WO₃). O trabalho avaliou a destruição de cadeias de carbono dos biofilmes através das vibrações do eletrodo, atingindo uma eficácia de cerca de 40% na destruição total do biofilme após 120min de utilização. Entretanto, esse processo alcançou um alto índice de inativação do biofilme nos líquidos dialisato em cinco minutos para a solução ácida e sessenta minutos para a solução básica.

3.2. Revisão de propriedade industrial

A revisão de propriedade industrial partiu de uma busca centrada na procura por sistemas que fizessem a desinfecção e esterilização de ductos de água (do circuito de água de hemodiálise ou não) através da utilização de LEDs UVC como agentes bactericidas. Foram buscadas duas bases de patentes: a) busca por patentes brasileiras através do portal do Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI); b) busca por patentes internacionais através do portal *google patentes* utilizando o número de IP da UNESP através da configuração VPN.

a) A busca realizada dentro do INPI não encontrou nenhuma patente de invenção, como mostra a Figura 6.

The screenshot shows the INPI search results page. At the top, there is a navigation bar with 'BRASIL', 'Acesso à informação', 'Participe', 'Serviços', 'Legislação', and 'Canais'. Below this is the INPI logo and the text 'Instituto Nacional da Propriedade Industrial, Ministério da Economia'. The main heading is 'Consulta à Base de Dados do INPI'. The search results section is titled 'RESULTADO DA PESQUISA(09/11/2022 às 18:02:17)'. The search criteria are 'Pesquisa por: Todas as palavras: DUCTOS HEMODIÁLISE ULTRAVIOLETA no Resumo'. The results indicate that no results were found for the search. A warning message states: 'AVISO: Depois de fazer uma busca no banco de dados do INPI, ainda que os resultados possam parecer satisfatórios, não se deve concluir que a Patente poderá ser concedida. O INPI no momento do exame do pedido de Patente realizará nova busca que será submetida ao exame técnico que decidirá a respeito da concessão da Patente.' The data is updated as of 08/11/2022, with a review number of 2705.

(a)

The screenshot shows the INPI search results page for a different search. The navigation bar and header are identical to screenshot (a). The search results section is titled 'RESULTADO DA PESQUISA(09/11/2022 às 18:04:29)'. The search criteria are 'Pesquisa por: Todas as palavras: DUCTOS ÁGUA ULTRAVIOLETA no Resumo'. The results indicate that no results were found for the search. A warning message states: 'AVISO: Depois de fazer uma busca no banco de dados do INPI, ainda que os resultados possam parecer satisfatórios, não se deve concluir que a Patente poderá ser concedida. O INPI no momento do exame do pedido de Patente realizará nova busca que será submetida ao exame técnico que decidirá a respeito da concessão da Patente.' The data is updated as of 08/11/2022, with a review number of 2705.

(b)

Figura 6 – Buscas por patentes no INPI relacionando a UVC a hemodiálise (a) e à água (b)

Como podemos ver na Figura 6, mesmo uma pesquisa simples com apenas 3 palavras-chave em uma procura por resumo da patente, que é a forma de procura mais abrangente, não encontrou nenhum resultado. Isso ressalta que não há restrição à liberdade de operação e de pedido de uma patente a partir da pesquisa realizada no banco de dados do INPI.

b) A busca de patentes no banco de dados do *google (google patentes)*, por sua vez, encontrou outras invenções que estão mais próximas ao sistema de esterilização de ductos de água através de LEDs emissores de radiação UVC. Durante as pesquisas de busca de patentes internacionais, não foram encontradas soluções para a desinfecção de tubulações do circuito de água de hemodiálise, embora existam, em algumas clínicas, etapas de filtragem fixas por UVC no circuito de filtragem da água, normalmente inseridas após a osmose reversa e antes da entrada no tanque reservatório (*tank*, da Figura 4). Portanto, foi realizada uma busca de patentes mais abrangente, procurando soluções que promovam a desinfecção de tubulações através da tecnologia germicida UVC, mas que não necessariamente são realizadas em ambiente de hemodiálise como forma de identificar quaisquer restrições na liberdade de operação.

- US20170174536A1 - *Disinfection of water mains using ultraviolet light and oxidizing agents*

Esta patente trata-se de um dispositivo monitorado e movimentado por controle remoto, que introduz um equipamento que desinfeta as tubulações utilizando radiação ultravioleta e agentes oxidantes. É realizada por meio de uma lâmpada e é utilizada principalmente para realizar a desinfecção de tubulações de abastecimento que possuem diâmetros maiores. Usa um sistema para garantir que a fonte de desinfecção (lâmpada) esteja sempre posicionada axialmente à tubulação.

- CN104045125A - *Ultraviolet disinfection pipeline*

Essa patente demonstra um equipamento que compõe um sistema estacionário de desinfecção UVC que é acoplado em uma seção da tubulação. Trata-se de um dispositivo que realiza a desinfecção da água quando esta passa pela seção

composta pelas lâmpadas, portanto não realiza a desinfecção da tubulação e de possíveis biofilmes que possam se formar nas paredes dos ductos.

- US9376333B2 - *Inline UV LED water disinfection and heating*

Esta patente trata-se de uma placa contendo LEDs UVC que faz a filtragem da água em uma seção da tubulação. Na sessão que contém os LEDs, o corpo da tubulação é trocado por um material transmissível a radiação ultravioleta, permitindo que os LEDs estejam protegidos da água, mas que ainda promovam a desinfecção. É um método de desinfecção estacionário que promove a desinfecção da água enquanto ela passa pelos LEDs que foram posicionados em uma sessão específica da tubulação, portanto ela não é capaz de fazer a desinfecção das tubulações.

- CN111533242B – *Ozone and ultraviolet combined disinfection device for sewage pipeline*

Esta patente criou um dispositivo que combina geração de ozônio e desinfecção por Ultravioleta em tubulações de esgoto. O dispositivo dispõe de um motor e um controle remoto que permitem que esse dispositivo faça uma varredura pela tubulação. Esse equipamento, por se destinar a sistemas de tratamento de esgoto, ele utiliza lâmpadas ao invés de LEDs UVC.

Como podemos ver, não foi encontrada uma solução que propunha a criação de um sistema que faça a desinfecção das tubulações, considerando-se as paredes dos ductos, e que também utilizasse LEDs emissores de radiação UVC, o que dá a esse desenvolvimento tecnológico uma total liberdade de operação e com chances de uma proteção de propriedade industrial, tanto para um processo quanto para um produto.

3.3. Busca Mercadológica

Existem diferentes tipos de empresas que fornecem serviços de descontaminação e filtragem para preparação da água segundo as normas reguladoras da ANVISA e que podem ser enquadradas como concorrentes indiretos.

Existem, primeiramente, empresas que fornecem sistemas de esterilização por meio da ozonização, tais como a *Permutation MultiServiços e Distribuidora LTDA.* e a *Saubern - Vivax - Industria e Comercio de Equipamentos LTDA.* O processo de esterilização via ozonização é um forte concorrente da esterilização ultravioleta, pois trata-se de um método alternativo aos tratamentos químicos convencionais. Além disso, existem empresas que fornecem serviços e produtos para a filtragem, descontaminação e análise da água segundo os padrões estabelecidos pela ANVISA, realizando descontaminação de tubulações por remoção química, que possui riscos de depósito de resíduos. Alguns exemplos delas: *Acquamedic Manutenção em Equipamentos Hospitalares LTDA,* *Suez Water Technologies and Solutions Brasil Tratamento de Águas LTDA* e *Ipabras Industria e Comercio LTDA.* O grande diferencial entre o produto a ser desenvolvido nessa pesquisa e os demais oferecidos pela concorrência é a sua capacidade de esterilizar não só a água, mas também as paredes das tubulações

Nenhuma das empresas concorrentes citadas acima apresentam eficácia comprovada contra fungos e não oferecem seus serviços para a descontaminação específica de fungos.

A partir de todas as pesquisas e revisões bibliográficas mercadológicas, de patentes e científicas, foi possível pensar na criação de um protótipo que pudesse realizar a remoção de biofilmes de ductos de água do circuito de hemodiálise através da utilização de LEDs UVC. O principal objetivo da criação desse protótipo foi desenvolver um sistema de inserção e remoção de LEDs UVC dentro de ductos de hemodiálise, promovendo assim uma remoção completa de todos os contaminantes que possam se prender nas paredes dos ductos em um sistema de varredura completa por toda a extensão da tubulação. Para isso, ideou-se a criação de um cateter removível que funcionasse como invólucro para fitas de LED e que fizessem uma iluminação axial em 360° e longitudinal por toda a extensão das tubulações. Além disso, parte da ideia do projeto consistiu em criar um sistema que pudesse ser removível e que pudesse ser aplicado durante a madrugada, horário em que as clínicas de hemodiálise estivessem fechadas.

Para tal desenvolvimento, criou-se uma metodologia e um cronograma de execução, em etapas, para que esse objetivo pudesse ser atingido durante toda a duração do programa de pós-graduação.

4. Metodologia

4.1. Comprovação microbiológica

O trabalho optou por realizar uma comprovação científica em etapas, começando primeiramente com um estudo de eficácia *in vitro*, em cabine de segurança de fluxo laminar e em placas de microtitulação de 96 poços. Essa primeira etapa consistiu na criação de um corpo de provas contendo os LEDs UVC que pudesse promover uma avaliação experimental, do verdadeiro potencial germicida dos LEDs na inviabilização celular de biofilmes maduros de *C. parapsilosis*, *C. albicans*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. fumigatus* e *A. niger*. Em seguida, foram realizados testes com exposições diretas desses biofilmes a radiação e os resultados foram avaliados com base na avaliação de atividade metabólica, quantificação de biomassa e contagem de UFC.

4.1.1. Construção do corpo de prova e testes pré-experimentais

Para a criação do corpo de prova, foram utilizadas:

- Duas placas de circuito de fenolite padrão tipo ilha como bases para a construção do circuito que abrigou os LEDs;
- Quatro bases de madeira com 3cm de altura, 3cm de largura e 8 cm de comprimento;
- 60 LEDs diodo profundo UVC + UVA, modelo SMD 3535, pico de eficácia para o comprimento de onda variando entre 260 e 270nm, tensão de trabalho contínua 6V, potência nominal de 0,2W e ângulo de iluminação cônico em 120°;
- 60 resistores com resistência elétrica de 100Ω cada;
- Fios conectores com núcleo de cobre e espessura de 1mm;
- Regulador De Tensão Ajustável Lm2596 Dc-dc Display Step Down, com tensão de entrada contínua de 4 – 40V, tensão de saída ajustável de 1,25 – 37V, corrente nominal de trabalho de 2A e corrente máxima de trabalho de 3A.

- Fonte AC/DC, com tensão de alternada de entrada de 100 – 240V, corrente nominal de 1,5A e frequência de 50 – 60Hz. Já na saída, a fonte utilizada fornece uma tensão contínua de 19V e corrente nominal de 3,42A.

A montagem do circuito foi realizada segundo a configuração série-paralelo, que permite que os LEDs trabalhem com tensão contínua de forma mais estável. Essa configuração consiste em associar o LED em série com um resistor (R_i) e associar esses dois componentes em paralelo com outros conjuntos em série desses dois componentes. A Figura 7 mostra essa combinação.

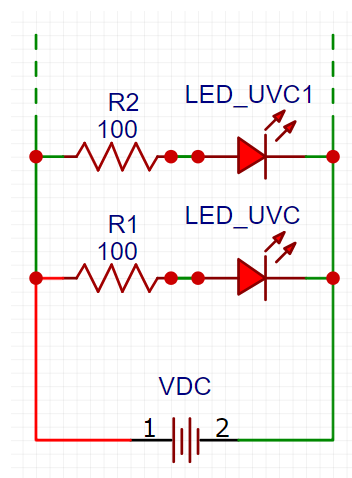


Figura 7 – Desenho esquemático da configuração de circuito em série e paralelo

Para a confecção do corpo de prova, foram escolhidos resistores com o valor nominal de 100Ω , pois trata-se de um valor de resistência comercial amplamente utilizado e de fácil acesso. Nessa configuração em paralelo, a fonte de tensão contínua (VDC) fornece uma tensão igual a todos os conjuntos de LED mais Resistores, que estão associados em série, garantindo assim que uma mesma fonte de tensão possa alimentar o circuito inteiro com a mesma tensão contínua, que foi o caso dos dois corpos de prova criados para os testes laboratoriais. A Figura 8 mostra o esquema elétrico do corpo de prova montado para a realização dos testes, dispostos de forma semelhante a montagem realizada na prática.

A maior eficiência de um raio luminoso se dá quando este incide perpendicularmente ao objeto que se deseja iluminar. Para o caso da confecção do corpo de prova, foi necessário garantir que a disposição dos LEDs fosse construída de forma que garantisse a iluminação direta e perpendicular de um LED por poço da

placa de microtitulação, onde os biofilmes foram cultivados. Para atingir esse objetivo, foram tomadas medidas de distância entre cada poço da placa e essas medidas foram utilizadas na construção do circuito sobre a placa de fenolite, como mostra a Figura 9.

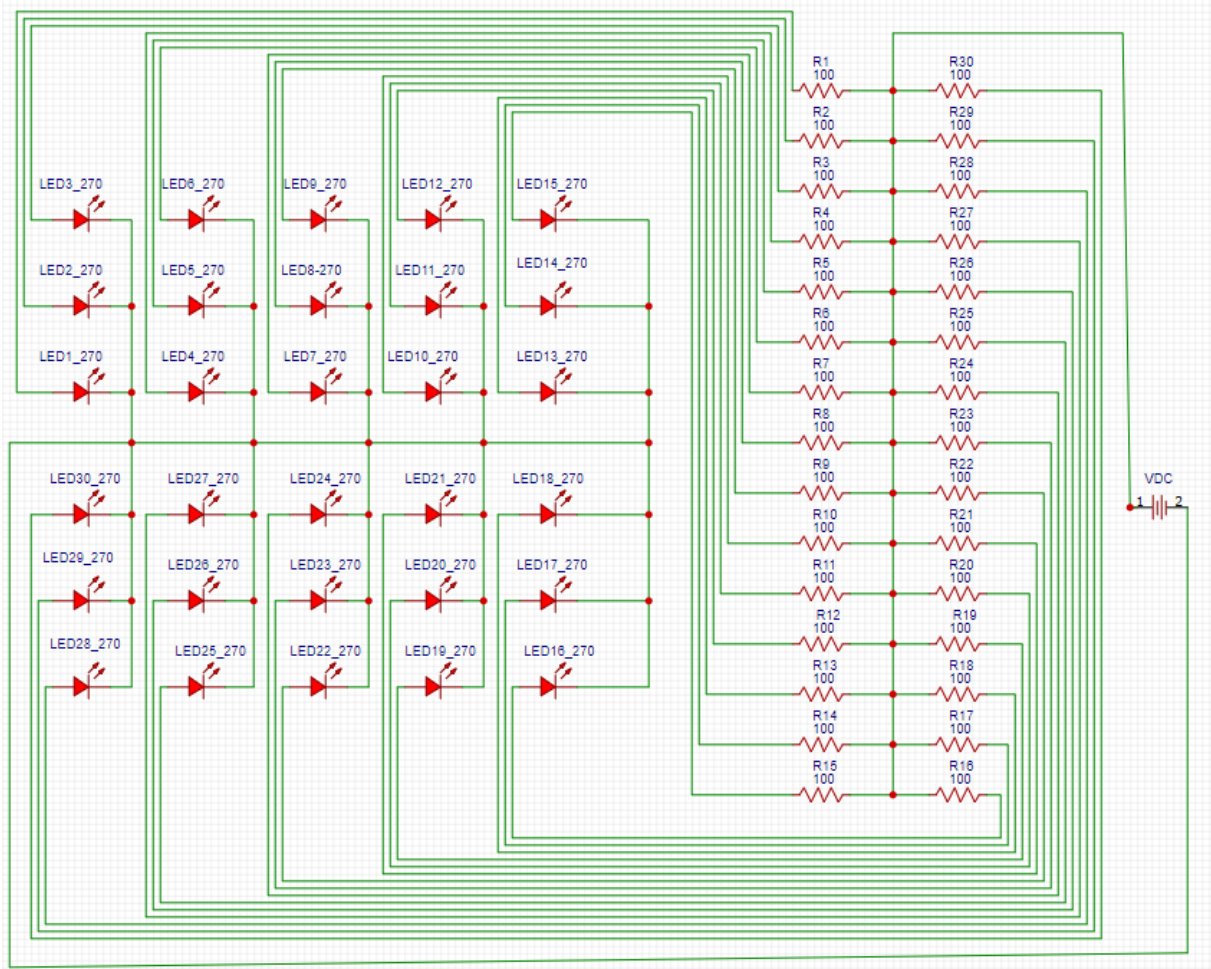
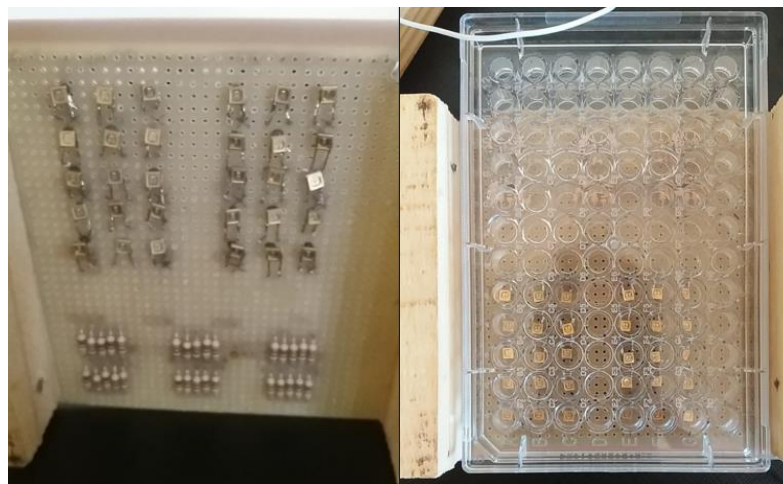
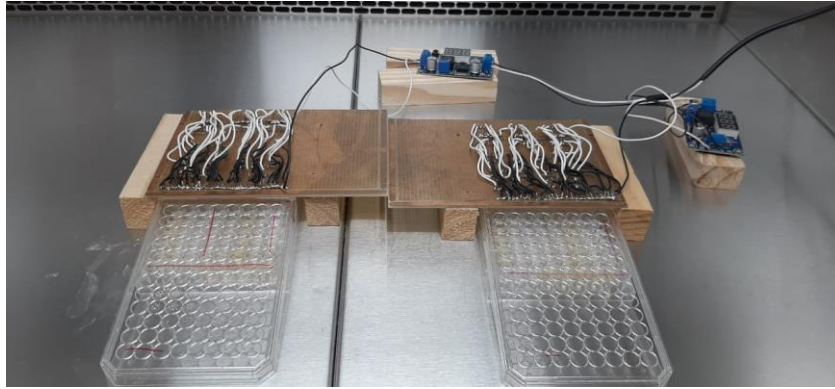


Figura 8 – Desenho esquemático do circuito elétrico do corpo de prova



(a)

(b)



(c)

Figura 9 – Corpo de prova montado (a); disposição dos LED's de maneira a produzir incidência direta de um LED por poço (b) e utilização do corpo de prova durante o procedimento experimental

A Figura 9(a) e a Figura 9(b) mostram a construção e disposição dos LEDs na prática e a disposição de 1 LED sobre cada poço de cultivo do biofilme. A Figura 9(c) mostra que, para que o circuito pudesse irradiar a luz UVC de forma direta e perpendicular sobre cada poço, foi necessário encaixar a placa de 96 poços embaixo do circuito montado. Para isso, foram utilizadas bases de madeira que foram pregadas sobre o circuito montado na base de fenolite, cuja altura, de 3cm, foi a necessária para que as placas de microtitulação pudessem ser colocadas embaixo do circuito de forma ajustada e sem riscos de choque entre a placa e o circuito. A base de fenolite furada foi escolhida para que toda a fiação pudesse ser passada e soldada na parte superior da placa de circuito, permitindo que apenas os LEDs ficassem em contato direto com a placa de 96 poços (Figura 9(b)). Da mesma forma, os resistores foram posicionados a uma distância segura da fonte de iluminação, de forma a não exercerem quaisquer influências que pudessem prejudicar a iluminação perpendicular e direta.

Foram utilizados 30 LEDs por cada placa de microtitulação de 96 poços, pois o restante dos poços foi reservado para a realização de controles de esterilidade dos meios de cultura utilizados e para controle de contaminação sem a aplicação da UVC germicida. Porém, para que não houvesse risco de iluminação indireta dos LEDs sobre os poços reservados para controle, foi posta uma barreira física, não transmissível a UVC, entre os poços que sofreriam a radiação e os reservados para os controles. Essa barreira física foi construída colando-se uma tira de papel *craft* (papelão) na fileira que divide os poços irradiados daqueles reservados para o controle.

O circuito montado foi ligado na saída do regulador de tensão ajustável, que por sua vez teve a sua entrada ligada a fonte de tensão AC/DC com saída de tensão constante de 19V. Entretanto, antes que pudesse ser feita a ligação, foi necessário calcular qual deveria ser a tensão de saída fornecida pelo regulador de tensão, de forma que cada LED recebesse a alimentação de tensão contínua variando entre 5 – 6V. Primeiramente foi calculada qual a corrente elétrica que deveria passar pelo LED, considerando seus valores conhecidos de potência e tensão nominais, através da Equação (1).

$$I = \frac{P_L}{V_L} \quad (1)$$

Onde I é a corrente elétrica, P_L é a potência nominal do LED e V_L é a tensão nominal do LED. Em uma configuração em série, a corrente se mantém a mesma e as tensões são divididas, portanto o conjunto em série do LED mais resistor devem ter a mesma corrente I . Em seguida, sabendo o valor de resistência elétrica nominal de cada resistor, foi possível calcular a queda de tensão sobre o resistor da associação em série através da Equação (2).

$$V_R = RI \quad (2)$$

Onde V_R é a queda de tensão no resistor e R é a resistência nominal do resistor. A tensão V_R calculada somada a tensão V_L nominal do LED indicam a queda de tensão total da associação em série. Todas as associações em série de LED mais Resistor foram acopladas na configuração paralelo e nesta configuração a tensão se mantém constante. Portanto, a soma das quedas de tensão do resistor e do LED indicaram a tensão de saída do regulador de tensão para que o LED trabalhasse com suas configurações nominais. Após a montagem do circuito, medidas de tensão e corrente foram tomadas utilizando um multímetro digital, de forma a garantir que a tensão fornecida na prática fosse igual a tensão calculada.

Por fim, antes da utilização do corpo de prova nos experimentos e avaliação de eficácia, o circuito foi ligado e foi medida a intensidade de radiação de cada LED UVC através de um medidor de radiação UVC com resposta em $\mu W/cm^2$ com espectro de medição na faixa de radiação entre 220 – 280nm com pico de medição em 254nm. A

medição realizada e a determinação do tempo especificado para a realização do experimento permitiram o cálculo da dose de radiação utilizada no experimento, que é a unidade fornecida pela maioria das revisões bibliográficas para determinar qual é a dose necessária para eliminar diferentes espécies de microrganismos. A Equação (3) mostra o cálculo da dose de radiação.

$$\varphi = \varnothing t \quad (3)$$

Onde φ é a dose de radiação calculada em $\mu J/cm^2$, \varnothing é a intensidade de radiação medida em $\mu W/cm^2$ e t é o tempo de exposição da radiação UVC sobre o biofilme em segundos. O tempo foi escolhido a partir de pré-testes realizados e da revisão bibliográfica, na tentativa de encontrar o menor tempo necessário para atingir o parâmetro de esterilização de todos os gêneros de biofilmes estudados neste trabalho.

Além da medição do índice de radiação, foi necessário especificar qual a altura que o LED seria posicionado em relação aos poços, levando em consideração que o ângulo de incidência do LED é cônico em 120° e que a intensidade de radiação dos LEDs respeita a lei do inverso do quadrado da distância, como mostra a Equação (4).

$$\varnothing \left(\frac{mW}{cm^2} \right) \propto \frac{1}{r^2(cm)} \quad (4)$$

Onde r é a distância radial da fonte luminosa às paredes dos poços. O esquema simplificado da incidência dos raios ultravioletas nos poços da placa de microtitulação é ilustrado na Figura 10.

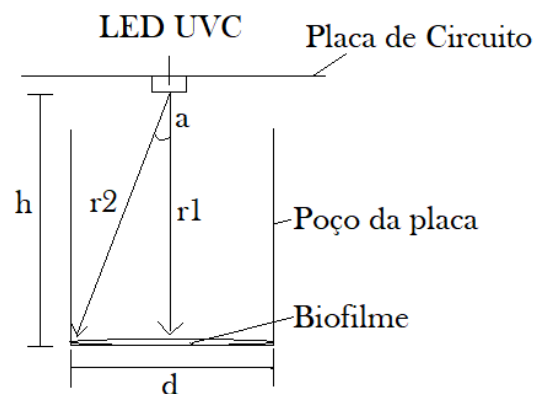


Figura 10 – Esquema simplificado da incidência de radiação nos poços

Na Figura 10, d é o diâmetro conhecido do poço, h é a altura do LED até o biofilme formado no fundo do poço, r_1 é a distância do raio UVC perpendicular ao fundo do poço, r_2 é a maior distância entre o raio UVC e a formação do biofilme, situado nas arestas do poço, e a é o ângulo formado entre r_1 e r_2 . Como o ângulo de iluminação do LED é 120° , sendo 60° para cada direção em relação ao raio perpendicular, a distância h entre o LED e fundo do poço foi posicionada de forma que obrigatoriamente $a < 60^\circ$. Além disso, como a eficiência da radiação diminui conforme aumenta-se o ângulo a , a medição da radiação com o sensor foi realizada considerando-se a distância do maior ângulo a .

4.1.2. Microrganismos e meios de cultura utilizados durante o experimento

Para os experimentos, foi escolhida a utilização dos meios dialisantes sem e com o enriquecido de glicose como meio de cultura objeto dos experimentos. Os meios dialisantes são soluções minerais utilizadas no processo de filtração sanguínea por difusão durante o procedimento de hemodiálise e sua composição favorece a formação de biofilmes, tornando-os mais ideais para ser objetos de estudo se comparados com apenas a água tratada. Sua composição consiste em uma dissolução de uma solução ácida e uma solução básica em água, onde a solução ácida é composta por: NaCl - 172,20g/L, KCl - 5,5g/L, CaCl₂.2H₂O - 8,0g/L, e MgCl₂.2H₂O - 3,72g/L com pH final variando de 1,7 a 2,6; já a solução básica é composta por NaCl - 23,6g/L e NaHCO₃ - 65,9g/L com pH final variando de 7,5 a 8,2. Para cada litro de meio dialisante foram misturados 27mL da solução ácida, 49mL da solução básica e 924mL de água destilada. Todas as soluções foram submetidas à esterilização em autoclave a 121°C por 15min.

De acordo com Burmeister et al. (2012), a adição de glicose 0,09g/L (p/v) ao dialisado evita episódios de hipoglicemia em pacientes durante as sessões de diálise, portanto também foi objeto de teste a solução dialisante adicionada com glicose a 0,09g/L, filtrada através de um filtro de poro de 22 μ m de diâmetro (TPP, Biogen, Europa).

Além disso, foram utilizados meios de cultura nutritivos durante os experimentos como meios de controle de crescimento e vitalidade dos microrganismos e como forma de verificar a eficácia da radiação UVC em meios altamente ricos e propensos a formação dos biofilmes. Para os testes nos biofilmes

de *Cândida parapsilosis* e *Cândida albicans* foi utilizado o meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640, Sigma, St. Louis, MO), para os testes nos biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiela pneumoniae* foi utilizado o meio de cultura caldo *Mueller Hinton* (MH) e, por fim, para os biofilmes de *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus niger* foi utilizado o meio de cultura caldo batata dextrose.

4.1.3. Metodologia de análise para *C. parapsilosis* e *C. albicans*

Foram utilizadas para a análise das cândidas: contagem de unidades formadoras de colônia (UFC), quantificação de biomassa através de cristal violeta (CV) e análise de atividade metabólica por meio de rasazurina como métodos de análise da eficácia da radiação UVC frente a todas as espécies de biofilmes estudadas.

4.1.3.1. Condições de cultivo e exposição à UVC das espécies *C. parapsilosis* e *C. albicans*

Ambas as cepas foram cultivadas em meio ágar Sabouraud, a 37 °C e submetidas a repiques 24 horas antes dos experimentos. A produção dos biofilmes foi realizada em três meios de cultura: dialisante sem glicose (DSG), dialisante com glicose (DCG) (0,09g/L) e RPMI 1640 suplementado com 2% de glicose. Os inóculos foram determinados a partir de solução padrão de McFarland 0,5 e, acrescentados à microplacas de 96 poços, a formação dos biofilmes ocorreu em estufa a 37°C, sem agitação, até sua maturação em 48 horas.

Após a maturação dos biofilmes, os grupos testes foram expostos a radiação UVC sob os corpos de prova confeccionados, conforme explicado no Item 4.1.1 em fluxo laminar por 2 horas. Os grupos controles foram protegidos da radiação UVC por um pequeno retângulo de papel *craft* pardo estéril introduzido entre as colunas 6 e 7 da microplaca. Além disso, uma tampa foi mantida sobre os controles durante o processo para evitar contaminações.

4.1.3.2. Atividade metabólica da *C. parapilosis* e *C. albicans* através do ensaio de resazurina

Em experimentos preliminares, foi observado que os biofilmes desenvolvidos nos meios dialisantes não demonstraram atividade metabólica, ou seja, não foi observada a mudança de cor do corante metabólico resazurina, embora fosse observado crescimento destes biofilmes em placas de ágar Sabouraud. Para a resolução deste problema foram realizadas algumas tentativas como a diminuição da concentração de resazurina e o aumento do tempo de incubação com o corante, no entanto tais medidas não surtiram efeito. A adaptação que finalmente promoveu a atividade metabólica foi a substituição dos meios dialisantes pelo meio RPMI imediatamente antes da incubação com o corante, incluindo essa alteração no protocolo de medição de atividade metabólica (PETTI et. al., 2011).

Após exposição à radiação UVC, os meios nos quais os biofilmes foram produzidos (DSG, DCG e RPMI) foram substituídos por RPMI 1640 suplementado (2% de glicose) novo, 200 µL por poço. Em seguida, foi adicionada aos poços 20 µL de solução de resazurina (0,02%) e a microplaca incubada a 37°C, sem agitação e protegida da luz. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 570 e 600 nm, de hora em hora, iniciando com 2 horas e finalizando com 8 horas de incubação.

Considerando a reação de metabolização realizada pelas células, na qual a resazurina (azul) é reduzida a resorufina (rosa) bem como os picos de absorbância de ambas as moléculas (leitura no espectrofotômetro no comprimento de onda de 600 nm e 570 nm, respectivamente), os dados de absorbância obtidos foram corrigidos subtraindo-se dos valores obtidos em 570 nm os valores obtidos em 600 nm e a média do branco (meio de cultura sem crescimento fúngico e sem aplicação da luz UVC).

Em seguida, as médias dos controles a partir de 4 horas foram comparadas em gráficos de linhas de modo a definir o melhor tempo, ou seja, a hora na qual o pico de absorbância da resorufina foi atingido. Foram realizados três experimentos independentes, com os grupos controles e testes em quintuplicata.

4.1.3.3. Análise de biomassa da *C. parapsilosis* e *C. albicans* através do ensaio de cristal violeta

A análise da biomassa foi realizada com o objetivo de analisar se houve a destruição da matriz extracelular dos biofilmes maduros após o tratamento pela radiação UVC.

Após exposição a luz UVC, o sobrenadante das microplacas foi removido e seguiu-se uma lavagem dos poços com solução tampão *Phosphate Buffered Saline* (PBS). Em seguida, os biofilmes foram fixados com 200 μ L de metanol por poço por 15 minutos, e após a remoção do metanol, foram secos por alguns segundos a temperatura ambiente dentro do fluxo laminar. A solução de cristal violeta (0,1%) foi adicionada aos poços (200 μ L/poço) por 20 minutos e, em seguida, foram lavados sucessivamente com água destilada, por 3 a 4 vezes, até a remoção completa do excesso de corante. Ao final, foram adicionados 200 μ L por poço de solução de ácido acético com concentração de 33% e a leitura subsequente foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda 570 nm. Foram realizados cinco experimentos independentes, dos quais o primeiro foi realizado em triplicata e os outros em quintuplicata.

4.1.3.4. Contagem de UFC da *C. parapsilosis* e *C. albicans*

A quantificação de UFC foi realizada com o objetivo de complementar a análise de viabilidade celular das *Cândidas* após exposição a radiação UVC.

Para a realização do plaqueamento e posterior contagem de UFC, foi feita a raspagem do fundo do poço para descolamento do biofilme, em seguida alíquotas de cada poço foram retiradas, diluídas em solução PBS e plaqueadas com a deposição de alíquotas de 50 μ L sobre placas de petri contendo ágar Sabouraud. A solução foi homogeneizada na placa utilizando-se pérolas de vidro.

As contagens iniciais foram realizadas com diluições 1:100, no entanto nesta condição os controles apresentaram valores muito acima da faixa recomendada em literatura, que é de 30 – 300 colônias por placa. Para resolução deste problema, foi realizado o plaqueamento (duplicata) de uma diluição seriada dos grupos controles, no qual definiu-se a diluição de 1:10.000 como padrão para experimentação de ambas

as *Cândidas* em todos os meios de cultura, visto que as contagens nesta diluição se mantiveram dentro da faixa mencionada.

Após o plaqueamento, a contagem foi realizada após incubação à 37°C, por 24 horas para *C. albicans*, e 48 horas para *C. parapsilosis*. Foram realizados dois experimentos independentes, com grupos testes e controles em duplicata.

4.1.4. Metodologia de análise para *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*

Para os dois gêneros de bactérias foram utilizados, até este ponto do trabalho, análise de viabilidade metabólica através da resazurina, quantificação de biomassa por Cristal Violeta e contagem de UFC.

4.1.4.1. Condições de cultivo e exposição à UVC das espécies *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*

Ambas as cepas bacterianas foram cultivadas em meio ágar *Mueller-Hinton* (MH), a 37°C e submetidas a repiques 24 horas antes dos experimentos. Os inóculos foram determinados a partir de solução padrão de McFarland 0,5 pelo método de suspensão direta e acrescentados a microplacas de 96 poços. A formação dos biofilmes ocorreu em três meios de cultura: DSG, DCG (0,09g/L) e MH em estufa a 37°C, sem agitação, por 24 horas.

Após a formação dos biofilmes, os grupos testes foram expostos à radiação UVC do corpo de prova construído em fluxo laminar, por 2 horas. Os grupos controles foram protegidos da radiação UV por um pequeno retângulo de papel pardo estéril introduzido entre as colunas 6 e 7 da microplaca, ainda a tampa foi mantida sobre os controles durante o processo para evitar contaminações.

4.1.4.2. Atividade metabólica da *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* através do ensaio de resazurina

Assim como nos experimentos com as *Cândidas*, nos experimentos com as bactérias foi adotada a adaptação para a leitura correta da atividade metabólica, visto que em experimentos preliminares, o grupo observou que os biofilmes desenvolvidos nos meios dialisantes não demonstravam atividade metabólica, ou seja, não era

observada a mudança de cor do corante metabólico resazurina, embora fosse observado crescimento destes biofilmes em placas de ágar. Portanto, foi realizada a substituição dos meios dialisantes pelo meio Mueller-Hinton imediatamente antes da incubação com o corante.

Após a exposição à radiação UVC, os meios nos quais os biofilmes foram produzidos (DSG, DCG e MH) foram substituídos por MH novo, 200 µL por poço. Em seguida, foi adicionada aos poços 20 µL de solução de resazurina (0,02%) e a microplaca incubada a 37°C, sem agitação e protegida de luz natural externa. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 570 e 600nm, de hora em hora, iniciando com 2 horas e finalizando com 5 horas de incubação. Foram realizados três experimentos independentes em quintuplicata.

Considerando a reação de metabolização realizada pelas células, na qual a resazurina (azul) é reduzida a resorufina (rosa) bem como os picos de absorbância de ambas as moléculas (600 nm e 570 nm, respectivamente), os dados de absorbância obtidos foram corrigidos subtraindo-se dos valores obtidos em 570 nm, os valores obtidos em 600 nm e a média do branco (meio de cultura sem crescimento e sem aplicação da radiação UVC).

Em seguida, as médias dos controles foram comparadas em gráficos de linhas de modo a definir o melhor tempo, ou seja, a hora na qual o pico de absorbância da resorufina foi atingido. Após a definição do melhor tempo de incubação para cada meio e para cada um dos dois biofilmes a serem formados, realizou-se o experimento com exposição à radiação UVC e realizou-se a leitura em espectrofotômetro da viabilidade celular desses biofilmes após o experimento.

4.1.4.3. Análise de biomassa da *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* através do ensaio de cristal violeta

A análise da biomassa foi realizada com o objetivo de inferir se há destruição da matriz dos biofilmes após o tratamento.

Após exposição à radiação UVC, o sobrenadante das microplacas foi removido e seguiu-se uma lavagem dos poços com tampão PBS. Em seguida, os biofilmes foram fixados com 200µL de metanol por poço por 15 minutos, e, após a remoção do metanol, foram secos por alguns segundos a temperatura ambiente dentro do fluxo laminar. A solução de cristal violeta (0,1%) foi adicionada aos poços (200 µL/poço) por

20 minutos, após os quais ocorreram lavagens sucessivas com água destilada por 3 a 4 vezes, até a remoção completa do excesso de corante. Ao final, foram adicionados 200µL por poço de solução de ácido acético a 33% e a leitura subsequente foi realizada em espectrofotômetro a 570nm. Foram realizados três experimentos independentes, dos quais os dois primeiros foram realizados em triplicata e o último em quadruplicata.

4.1.4.4. Contagem de UFC da *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*

A quantificação de UFC foi realizada com o objetivo de complementar a análise de viabilidade após exposição a radiação UVC.

Para a realização do plaqueamento e posterior contagem de unidades formadoras de colônias, foi feita a raspagem do fundo do poço para descolamento do biofilme, em seguida alíquotas de cada poço foram retiradas, diluídas em solução PBS e plaqueadas com a deposição de alíquotas de 50µL sobre placas de petri contendo ágar MH. A solução foi homogeneizada na placa utilizando-se pérolas de vidro. O plaqueamento e contagem foram realizados em placas de petri com ágar MH após incubação a 37°C, por 24 horas. Foram realizados dois experimentos independentes, com grupos testes e controles em duplicata.

De modo a conseguir uma contagem de UFC na faixa de 30 a 300 un., as contagens foram realizadas em diluições diferentes. Para *K.pneumoniae*, foram realizadas diluições de 10^{-5} para o grupo controle em MH e de 10^{-4} para o restante dos grupos. Para *P.aeruginosa*, foram realizadas diluições de 10^{-4} também para o grupo controle em MH e de 10^{-3} para o restante dos grupos.

4.1.5. Metodologia de análise para *A. fumigatus* e *A. niger*

Para os dois microrganismos do gênero *Aspergillus sp.*, *A. fumigatus* e *A. niger* foram estudados os procedimentos de viabilidade celular através da Resazurina, quantificação de biomassa através do CV e contagem por meio de UFC.

4.1.5.1. Condições de cultivo e exposição à UVC das espécies *A. fumigatus* e *A. niger*

Ambas as cepas fúngicas foram cultivadas em meio ágar batata dextrose a 30 °C e submetidas a repiques 7 dias antes dos experimentos, para suficiente formação de conídios. Para a obtenção dos inóculos adicionou-se 10 mL de tampão PBS estéril com tween 80 (0,1%) aos tubos com crescimento fúngico. Em seguida, a separação dos conídios foi realizada de forma mecânica com auxílio de alça de inoculação. A suspensão formada foi transferida para um novo tubo estéril, do qual após um repouso de 5 a 10 min, 5 mL do sobrenadante foram transferidos para novo tubo estéril. A contagem de conídios foi realizada em câmara de Neubauer e o inóculo acrescentado a microplacas de 96 poços na concentração final de 1×10^5 CFU/mL. A formação dos biofilmes ocorreu em três meios de cultura: dialisante sem glicose, dialisante com glicose (0,09g/L) e RPMI 1640 com glicose (2%) em estufa a 30°C, sem agitação, por 72 horas.

Após a formação dos biofilmes, os grupos testes foram expostos a radiação UVC no corpo de prova em cabine de segurança de fluxo laminar, por 2 horas. Os grupos controles foram protegidos da radiação UVC por um pequeno retângulo de papel. pardo estéril introduzido entre as colunas 6 e 7 da microplaca, ainda a tampa foi mantida sobre os controles durante o processo para evitar contaminações.

4.1.5.2. Atividade metabólica da *A. fumigatus* e *A. niger* através do ensaio de resazurina

Assim como nos experimentos anteriores, foi adotada a adaptação para a correta leitura da atividade metabólica, visto que em experimentos preliminares, o grupo observou que os biofilmes desenvolvidos nos meios dialisantes não demonstravam atividade metabólica, ou seja, não foi observada a mudança de cor do corante metabólico Resazurina, embora fosse observado crescimento destes biofilmes em placas de ágar. Portanto, foi realizada a substituição dos meios dialisantes pelo meio RPMI 1640 com glicose (2%) imediatamente antes da incubação com o corante.

Após exposição à radiação UVC, os meios nos quais os biofilmes foram produzidos (dialisante sem glicose, dialisante com glicose e RPMI 1640 com glicose

a 2%) foram substituídos por RPMI 1640 com glicose (2%) novo, depositando-se 200 µL por poço. Em seguida, foi adicionada aos poços 20 µL de solução de resazurina (0,02%) e a microplaca foi incubada a 37°C, sem agitação e protegida da luz. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 570 e 600 nm, em diversos tempos. Foram realizados três experimentos independentes em quintuplicata.

Considerando a reação de metabolização realizada pelas células, na qual a resazurina (azul) é reduzida a resorufina (rosa) bem como os picos de absorbância de ambas as moléculas (600 nm e 570 nm, respectivamente), os dados de absorbância obtidos foram corrigidos subtraindo-se dos valores obtidos em 570 nm, os valores obtidos em 600 nm e a média do branco (meio de cultura sem crescimento e sem aplicação da luz UV). Por fim, as médias dos controles foram comparadas em gráficos de linhas de modo a definir o melhor tempo, ou seja, a hora na qual o pico de absorbância da resorufina foi atingido.

4.1.5.3. Análise de biomassa da *A. fumigatus* e *A. niger* através do ensaio de cristal violeta

A análise da biomassa foi realizada com o objetivo de inferir se há destruição da matriz dos biofilmes após o tratamento. Após exposição a radiação UVC, o sobrenadante das microplacas foi removido e seguiu-se uma lavagem dos poços com solução tampão PBS. Em seguida, os biofilmes foram fixados no fundo das placas com 200 µL de metanol, por poço, por 30 minutos, e após a remoção do metanol, foram secos por alguns segundos a temperatura ambiente dentro da cabine de fluxo laminar. A solução de cristal violeta (0,1%) foi, logo após, adicionada aos poços (200 µL/poço) por 20 minutos, após os quais ocorreram lavagens sucessivas com água destilada por 3 a 4 vezes, até a remoção completa do excesso de corante. Ao final, foram adicionados 200 µL por poço de solução de ácido acético a 33% e a leitura subsequente foi realizada em espectrofotômetro a 570 nm. Foram realizados quatro experimentos independentes em triplicata.

4.1.5.4. Contagem de UFC do *A. fumigatus* e *A. niger*

A quantificação de unidades formadoras de colônia foi realizada com o objetivo de complementar a análise de viabilidade após exposição a luz UV. A metodologia de

contagem UFC foi realizada de forma semelhante as Cândidas e as bactérias. Entretanto, os dois fungos do gênero *Aspergillus sp.* Foram semeados em placas de petri contendo Ágar Batata Dextrose e tiveram a sua contagem realizada após 30h de incubação em estufa bacteriológica de crescimento à 37°C. Foram realizados dois experimentos independentes, com grupos testes e controles em duplicata.

4.2. Definição de parâmetros para a construção do protótipo

Como não foram encontradas em literatura, mercado ou busca de patentes um sistema semelhante para a esterilização de tubulações do circuito de água de hemodiálise, os parâmetros necessários para a construção do protótipo foram definidos com base em visitas técnicas as clínicas de hemodiálise *Davitta* da cidade de Bauru – SP, Santa Casa de Misericórdia de São Carlos – SP e Hospital de Base de São José do Rio Preto – SP. Entretanto, após a definição das variáveis a serem consideradas, os materiais buscados basearam-se em estudos científicos e bibliografias.

Os LEDs escolhidos para a configuração do protótipo foram os mesmos utilizados na construção do corpo de prova para a comprovação microbiológica *in vitro*. Buscou-se uma disposição de LEDs que pudesse promover uma varredura completa por todas as paredes da tubulação de forma rápida e simples sem a necessidade de intensiva movimentação dentro da tubulação. Além disso, foi buscada uma geometria que permitisse promover uma varredura completa de forma axial e longitudinal sobre a parede das tubulações.

Para o material que foi escolhido como cateter, foram buscados materiais com características mecânicas e físicas que pudessem satisfazer as demandas de um invólucro que pudesse suprir todos os parâmetros necessários. Para tal, foi definido que o material precisaria apresentar as seguintes características:

- Transmitância em relação a radiação UVC. Esta foi a primeira característica buscada, pois o cateter foi escolhido como invólucro para os LEDs, que por sua vez buscam incidir diretamente sobre a superfícies externas ao cateter como a água e as paredes tubos. Portanto, a transmitância do material que constitui o cateter é crucial para a viabilidade do protótipo;

- Flexibilidade. As visitas técnicas mostraram que as tubulações que interligam a estação de tratamento de água as máquinas de hemodiálise podem ter um longo comprimento e sempre são constituídas de curvaturas. Essa configuração mecânica das tubulações tornam o cateter um material que precisa ser necessariamente flexível para que possa ser introduzido dentro desses ductos;
- Resistência térmica. Após a construção do corpo de prova, verificou-se que os LEDs aquecem à uma temperatura de cerca de 80°C, portanto definiu-se que o cateter necessitaria apresentar estabilidade mecânica e química para trabalhar nessa temperatura;
- Hidrofobicidade. Como pretende-se que o cateter a ser construído seja inserido no circuito de água de hemodiálise, buscou-se um material que não reagisse quimicamente com a água;
- Potencial biodegradável. Por fim, buscou-se também que esse material apresentasse potencial biodegradável, visto que será inserido dentro das tubulações e ficará em contato com a água filtrada que será diretamente utilizada no processo de filtração sanguínea de hemodiálise.

Por fim, foi escolhido o material polimérico para ser utilizado como tubulação na construção do protótipo. Essa escolha foi realizada baseada em uma busca dos principais tipos de polímeros que constituem as tubulações de clínicas de hemodiálise no Brasil.

5. Resultados

5.1. Confecção do corpo de prova para comprovação antimicrobiana

A comprovação científica de eficácia dos LED's UVC na remoção de biofilmes fúngicos e bacterianos foi realizada em placas de microtitulação de 96 poços, tornando necessária a confecção de um corpo de prova para realizar a incidência de radiação sobre cada poço de forma direta. Para isso, foram tomadas medidas da distância entre cada poço e o circuito foi montado de forma que os LED's possuíssem entre si a mesma distância que os poços possuem entre eles, permitindo a iluminação direta de um LED por poço. A criação de um sistema de iluminação direta e perpendicular sobre os biofilmes permitiu a medição e o cálculo exatos da dose de radiação necessária para promover a remoção de cada espécie de biofilme e a sua máxima eficácia. Primeiramente, no entanto, foram realizados os cálculos de tensão e corrente do circuito para que houvesse o ajuste do regulador de tensão ajustável *step down*.

Por meio da Equação (1), foi possível calcular a corrente que deveria passar por cada associação em série da Figura 8, sabendo os valores nominais de tensão e potência dos LED's, que são de 6V e 0,2W, respectivamente.

$$I = \frac{P_L}{V_L} = \frac{0,2}{6} = 0,033 \text{ A} = 33 \text{ mA} \quad (5)$$

Com a corrente da associação em série calculada, foi possível medir a queda de tensão no resistor de 100Ω, por meio da Equação 2 mostrada na Equação (6).

$$V_R = RI = 100 \times 0,033 = 3,3 \text{ V} \quad (6)$$

Portanto, somando-se a queda tensão do LED mais a queda tensão calculada no resistor, foi possível determinar a tensão da fonte VDC para alimentar o circuito associado em paralelo, que foi uma tensão de 9,3V ($V_R + V_L$).

A dose de radiação calculada a partir da medição realizada pelo medidor de radiação foi de $320 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, medido à 2,5cm de distância e com angulação a calculada de $9,2^\circ$. Após uma série de pré-testes realizados e da observação da não esterilização dos biofilmes, o menor tempo de exposição a UV durante os testes que

atingiu a eficácia desejada foi de 2h, o que permitiu o cálculo da dose de radiação através da Equação (7).

$$\varphi = \phi t = 320 \left(\frac{\mu W}{cm^2} \right) \times 7200(s) = 2,304 \left(\frac{J}{cm^2} \right) \quad (7)$$

Por se tratar da esterilização de biofilmes, a dose de radiação fornecida durante os experimentos foi consideravelmente maior que a recomendada em bibliografias, que mostram a desinfecção UVC de microrganismos em sua forma planctônica ou que não atingiram a sua eliminação completa.

5.2. Testes microbiológicos em *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*

5.2.1. Testes de atividade metabólica através da Resazurina em *C. albicans* e *C. parapsilosis*

Primeiramente, foram realizados pré-testes com diferentes concentrações de inóculo de *C. albicans* em meio DSG e meio DCG para entender o comportamento do inóculo em sua forma planctônica nestes meios, que são considerados pobres em nutrientes. A Figura 11 e a Figura 12 mostram a absorvância desses meios para diferentes concentrações de inóculos em relação ao tempo de incubação para a leitura. Foram estudadas as concentrações variando-as de 10^8 a 10^4 cel/ml de *C. albicans* com todos os testes sendo feitos em triplicata.

Como podemos observar nas duas Figuras, nos dois meios de cultura houve um platô na medida de absorvância das curvas de concentração de 10^5 , 10^6 e 10^7 cel/ml a partir de 5h de incubação da resazurina em estufa à 37°C. A partir deste resultado, foi possível determinar a concentração do inóculo a ser utilizado na formação dos biofilmes de *C. albicans* e *C. parapsilosis*, que foi de 10^6 cel/ml e que corresponde a turbidez de 0,5 Mcfarland.

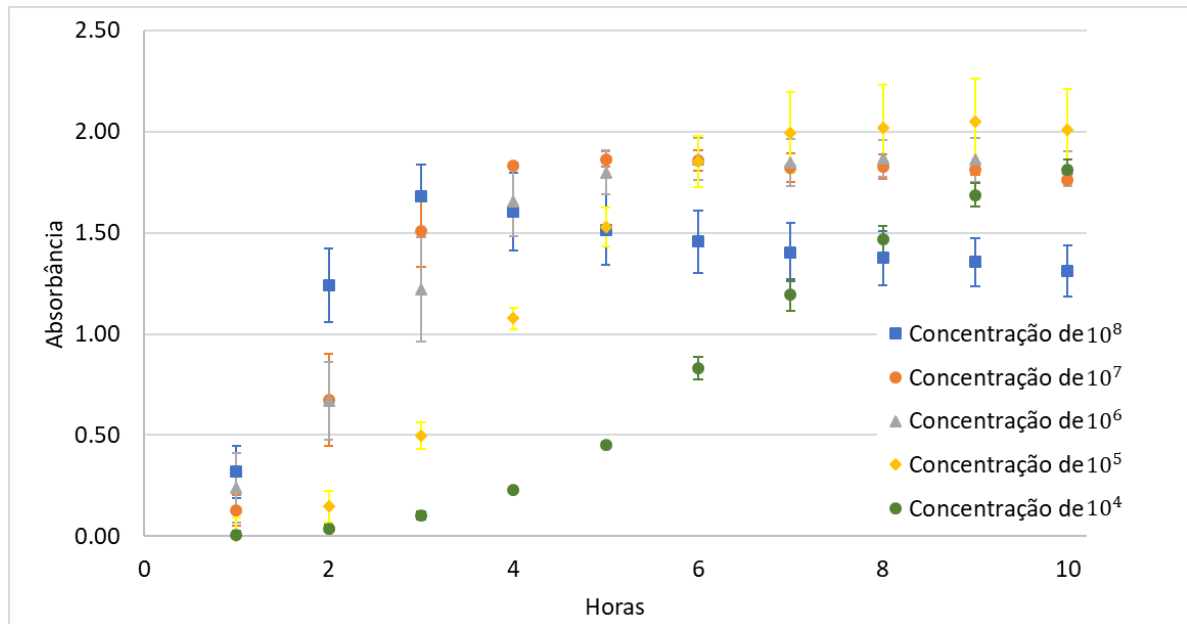


Figura 11 – Curva de absorvância da *C. albicans* em meio DSG

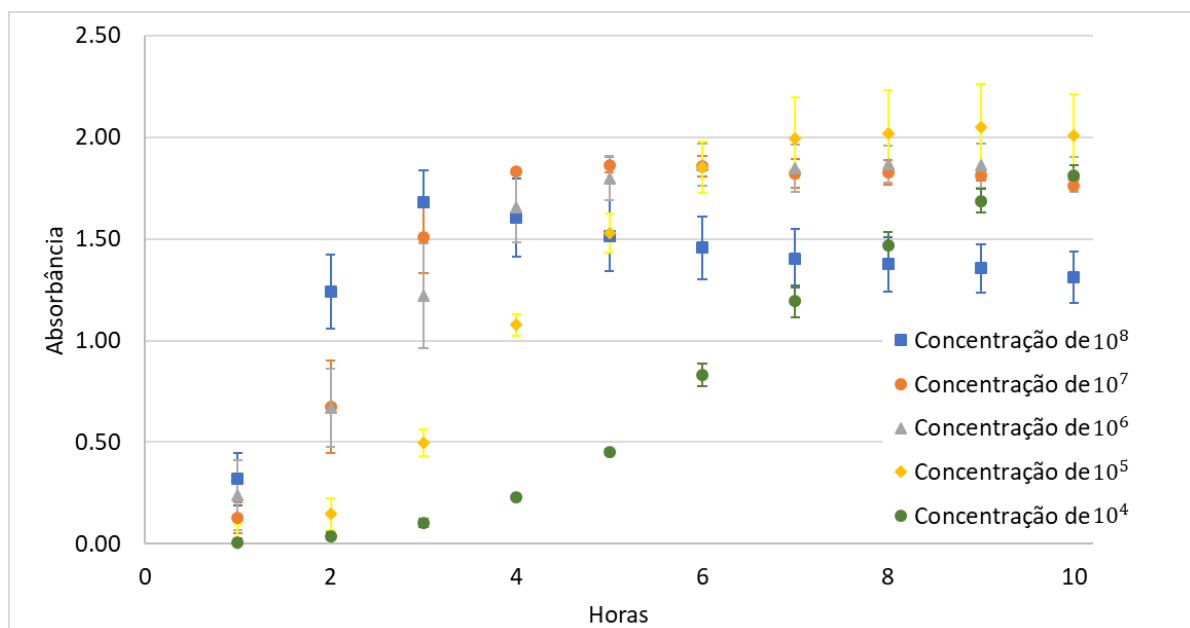


Figura 12 – Curva de absorvância da *C. albicans* em meio DCG

Os testes de atividade metabólica foram feitos com Resazurina em uma concentração de massa de 0,02%. Para que houvesse a viragem e a possibilidade de leitura de absorvância pelo espectrofotômetro, foram adotadas as seguintes medidas:

- Formação completa dos biofilmes de *C. albicans* e *C. parapsilosis* nos meios dialisante sem glicose, dialisante com glicose e RPMI em estufa à 37°C por 48h e posterior aplicação da radiação UVC;
- Substituição dos meios DSG e DCG por RPMI antes da aplicação da resazurina para diminuir o estresse oxidativo do biofilme para que a sua metabolização pudesse ser observada (PETTI et. al., 2011), pois os líquidos dialisantes são pobres em nutrientes;
- Incubação em diferentes tempos para a determinação do melhor tempo de viragem metabólica.

A Figura 13 e a Figura 14 mostram as absorvâncias médias dos controles com o objetivo de obter o melhor tempo de análise de atividade metabólica através da resazurina para os biofilmes de *C. albicans* e *C. parapsilosis*, respectivamente. O objetivo foi determinar após quantas horas de incubação foi atingido o pico de absorvância para calcular com maior precisão a porcentagem de células viáveis após o período de exposição à radiação UVC.

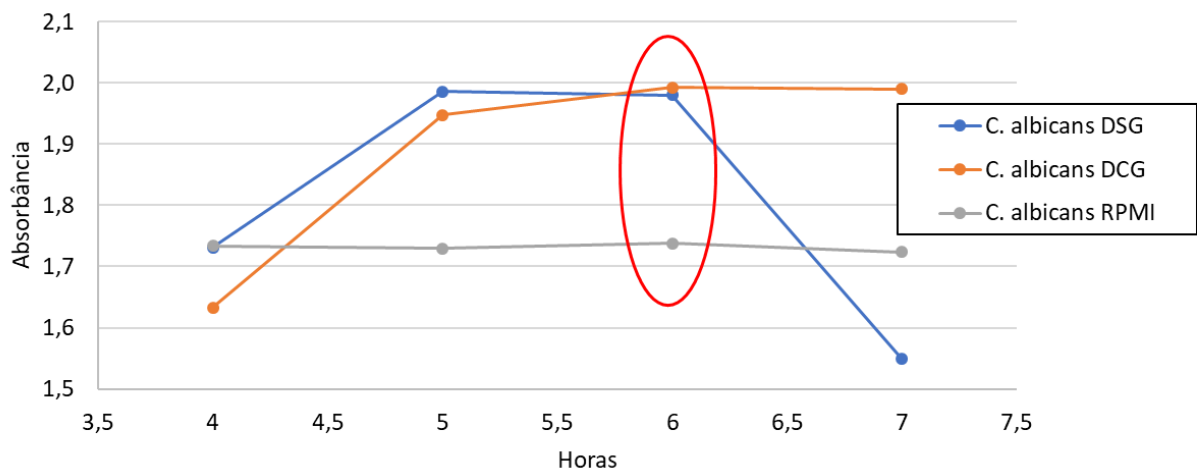


Figura 13 – Curva de absorvância da resazurina para a *C. albicans*

Para a *C. albicans*, o melhor tempo foi o de 6h. Neste tempo observamos que o meio RPMI atinge um platô, que o DCG atinge o pico máximo de absorvância e que, apesar de o meio DSG apresentar leve queda em comparação ao tempo de 5h, é o tempo que apresenta a menor diferença entre os picos dos meios dialisantes. Para a *C. parapsilosis*, o melhor tempo foi de 7h. Neste tempo observamos o pico máximo

para os meios RPMI, DCG e para o meio DSG, apesar do último meio apresentar um leve aumento de absorbância para o tempo de 8h.

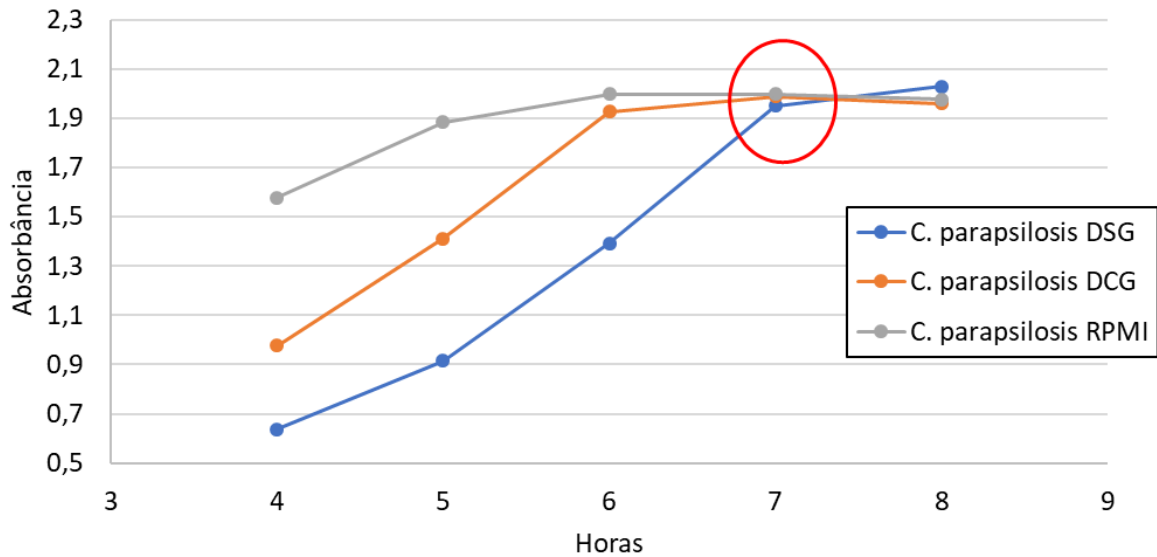


Figura 14 – Curva de absorbância da *C. parapsilosis* para a resazurina

O gráfico de células viáveis após a exposição a UVC por 2h através da medição de atividade metabólica pela leitura de absorbância da resazurina pode ser visto na Figura 15.

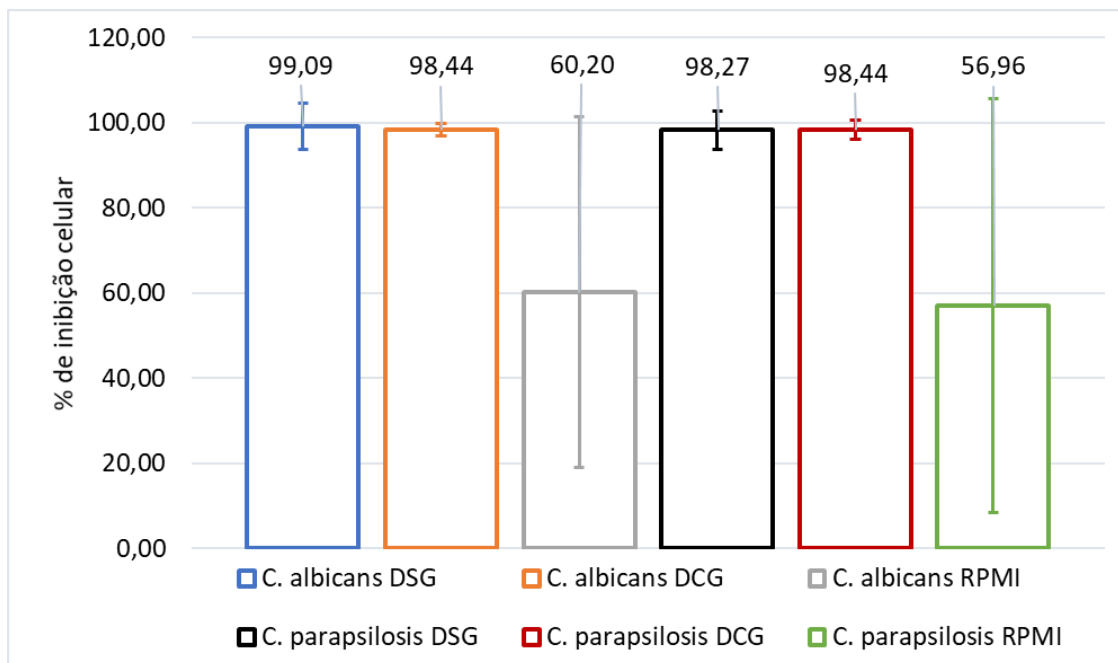


Figura 15 – % de inibição celular da *C. albicans* e *C. parapsilosis* após 2h de exposição à radiação UVC

Como mostra a Figura 15, a leitura de atividade metabólica da *C. albicans* após 6h de incubação e da *C. parapsilosis* após 7h de incubação mostraram uma inibição próxima de 100% para os biofilmes cultivados em DSG e DCG e que foram expostos a 2h de radiação UVC. Além disso, mesmo em meio RPMI, que oferece nutrientes ricos em proteínas para a formação dos biofilmes, houve um percentual de redução próximo a 60% para as duas Cândidas, indicando o potencial dos LEDs UVC na inibição de biofilmes fúngicos em meio altamente nutritivos.

Para o tratamento estatístico e teste de hipótese da viabilidade celular dos microrganismos, foi verificada a normalidade do comportamento tanto do grupo controle quanto das amostras que foram expostas a radiação UVC através do método de Shapiro-Wilk. Para os casos onde houve a diferença do tipo de comportamento entre o grupo controle e o grupo irradiado, sendo o grupo controle uma distribuição normal e o irradiado uma distribuição não-normal, foi aplicado o teste não paramétrico da MANN-WHITNEY. Já para os casos onde o grupo controle e o irradiado apresentaram curva de comportamento normal, foi aplicado o teste F de homocedasticidade e um Teste-t para duas amostras presumindo variâncias diferentes. Para os dois casos, aplicou-se uma confiabilidade de 95%, permitindo verificar se houve ou não diferença significativa entre o grupo controle, onde, caso o valor de probabilidade $P < 0,05$, indicaria que houve diferença significativa de viabilidade. A Tabela 1 mostra os valores de P para cada meio e para as duas Cândidas.

Biofilme	Número de amostras	Tipo de Teste aplicado	Valor de P
<i>C. albicans</i> em meio DSG	13	MANN-WHITNEY	<0,0001
<i>C. albicans</i> em meio DCG	15	Teste-t	$1,2 \times 10^{-18}$
<i>C. albicans</i> em meio RPMI	15	MANN-WHITNEY	<0,0001
<i>C. parapsilosis</i> em meio DSG	13	Teste-t	$1,66 \times 10^{-13}$
<i>C. parapsilosis</i> em meio DCG	11	Teste-t	$6,45 \times 10^{-17}$
<i>C. parapsilosis</i> em meio RPMI	15	MANN-WHITNEY	<0,0001

Tabela 1 – Análise estatística de inibição de viabilidade celular para os biofilmes de *C. albicans* e *C. parapsilosis*

A Tabela 1 mostra que o valor de P ficou muito abaixo de 0,005 para todos os casos, demonstrando que houve diferença significativa na viabilidade do grupo irradiado em relação ao grupo controle.

5.2.2. Quantificação de biomassa através de Cristal Violeta em *C. albicans* e *C. parapsilosis*

A análise de biomassa foi realizada através da análise de Cristal Violeta segundo os protocolos descritos no Item 4.1.3.3 e os resultados de quantificação de biomassa podem ser observados na Figura 16.

Como podemos observar na Figura 16, não houve diminuição de biomassa do biofilme de *C. albicans* após a irradiação UVC, embora a Figura 15 tenha mostrado que a inibição metabólica do biofilme para os meios DSG e DCG foi próximo a 100%. Isso indica que a radiação UVC foi capaz de penetrar pela matriz extracelular do biofilme e inibir as células viáveis do biofilme, tornando-o em um biofilme inerte cuja matriz não apresenta células viáveis. Já para a *C. parapsilosis* foi possível observar uma redução de biomassa após as 2h de radiação UVC, porém, assim como a *C. albicans* a inviabilização metabólica das células viáveis da *C. parapsilosis* foi muito maior que sua redução de biomassa. O único ponto onde a redução de viabilidade celular e redução de biomassa tiveram valores relativamente próximos, foi para o caso da *C. parapsilosis* cultivada em meio RPMI, apresentando uma redução de 56,96% em sua atividade metabólica e uma redução de 33,98% de sua biomassa. O tratamento estatístico do Cristal Violeta foi realizado de forma semelhante ao dos testes de viabilidade celular e podem ser observados na Tabela 2.

Como podemos observar na Tabela 2, para a *C. albicans*, em todos os meios de cultura, o valor foi de $P > 0,05$, mostrando que não houve variação de biomassa após irradiação UVC. Já para a *C. parapsilosis* foi possível observar uma diminuição na quantidade de biomassa através da análise estatística, onde em todos os casos $P < 0,05$. No entanto, os valores de P ficaram próximos ao valor de 0,05, mostrando que, embora tenha havido diminuição de biomassa, essa diminuição não foi altamente significativa.

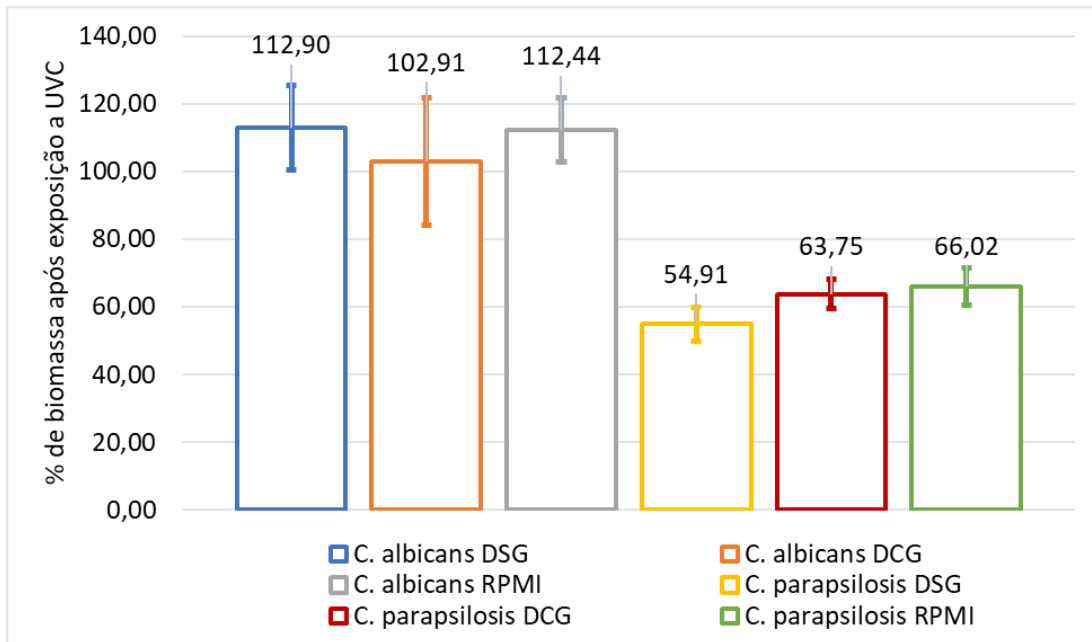


Figura 16 – Porcentagem de biomassa dos biofilmes de *C. albicans* e *C. parapsilosis* após exposição UVC

Biofilme	Número de amostras	Tipo de Teste aplicado	Valor de P
<i>C. albicans</i> em meio DSG	23	MANN-WHITNEY	0,4766
<i>C. albicans</i> em meio DCG	23	MANN-WHITNEY	0,3342
<i>C. albicans</i> em meio RPMI	23	MANN-WHITNEY	0,4279
<i>C. parapsilosis</i> em meio DSG	22	MANN-WHITNEY	0,0258
<i>C. parapsilosis</i> em meio DCG	22	MANN-WHITNEY	0,0340
<i>C. parapsilosis</i> em meio RPMI	22	Teste-t	0,0210

Tabela 2 – Análise estatística para redução de biomassa através do método cristal violeta para *C. albicans* e *C. parapsilosis*

5.2.3. Contagem de Unidades Formadoras de Colônias para *C. albicans* e *C. parapsilosis*

Os testes de contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) foram realizados em quadruplicata. O crescimento dos grupos controle podem ser visualizados na Figura 17.

A Figura 17 apresenta apenas o crescimento UFC dos meios-controle, pois a placas que foram semeadas com inóculos retirados dos poços onde houve irradiação UVC não apresentaram nenhum crescimento em nenhuma placa da quadruplicata, como mostra a Figura 18. Tal resultado mostra que a inibição causada pela radiação UVC inibiu em 100% a capacidade de reprodução da *C. albicans* e *C. parapsilosis*.

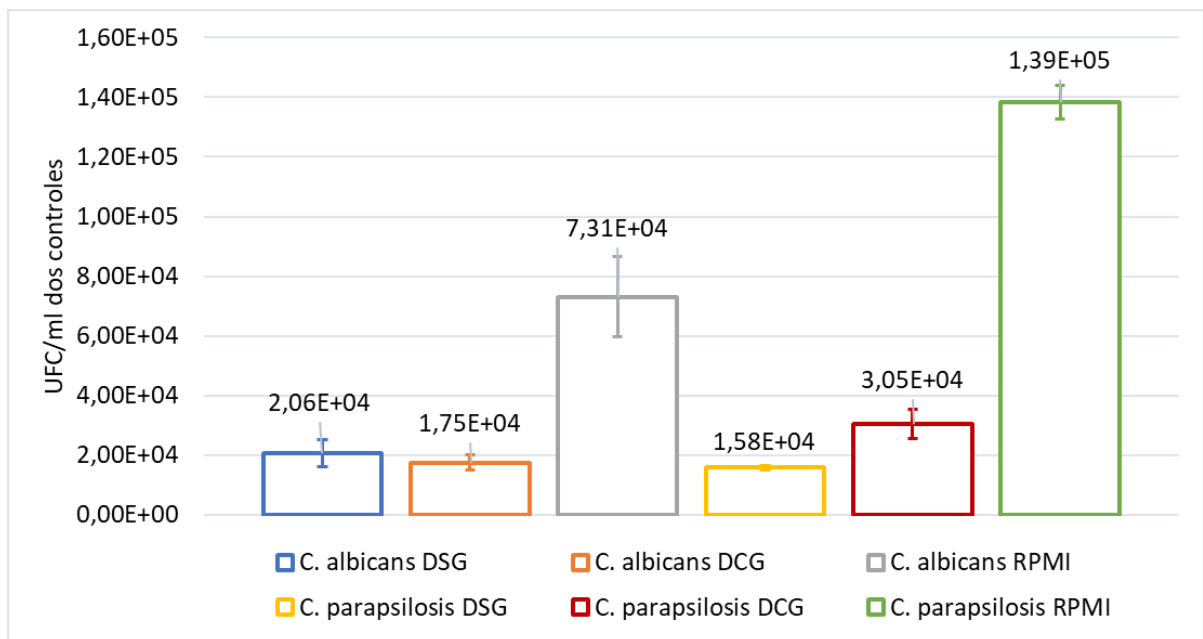


Figura 17 – Crescimento em UFC/ml dos controles de *C. albicans* e *C. parapsilosis* em meio DSG, DCG e RPMI

Na Figura 18, “BrH” é o controle de esterilidade do meio DSG, “BrG” é o controle de esterilidade do meio DCG e “BrR” é o controle de esterilidade do meio RPMI. As contagens de UFC em *C. albicans* são: teste “CaHT” em meio DSG; teste “CaGT” em meio DCG; teste “CaRT” em meio RPMI; controle “CaHC” em meio DSG; controle “CaGC” em meio DCG e controle “CaRC” em RPMI. Já as contagens de UFC em *C. parapsilosis* são: teste “CpHT” em meio DSG; teste “CpGT” em meio DCG; teste “CpRT” em meio RPMI; controle “CpHC” em meio DSG; controle “CpGC” em meio DCG e controle “CpRC” em meio RPMI.

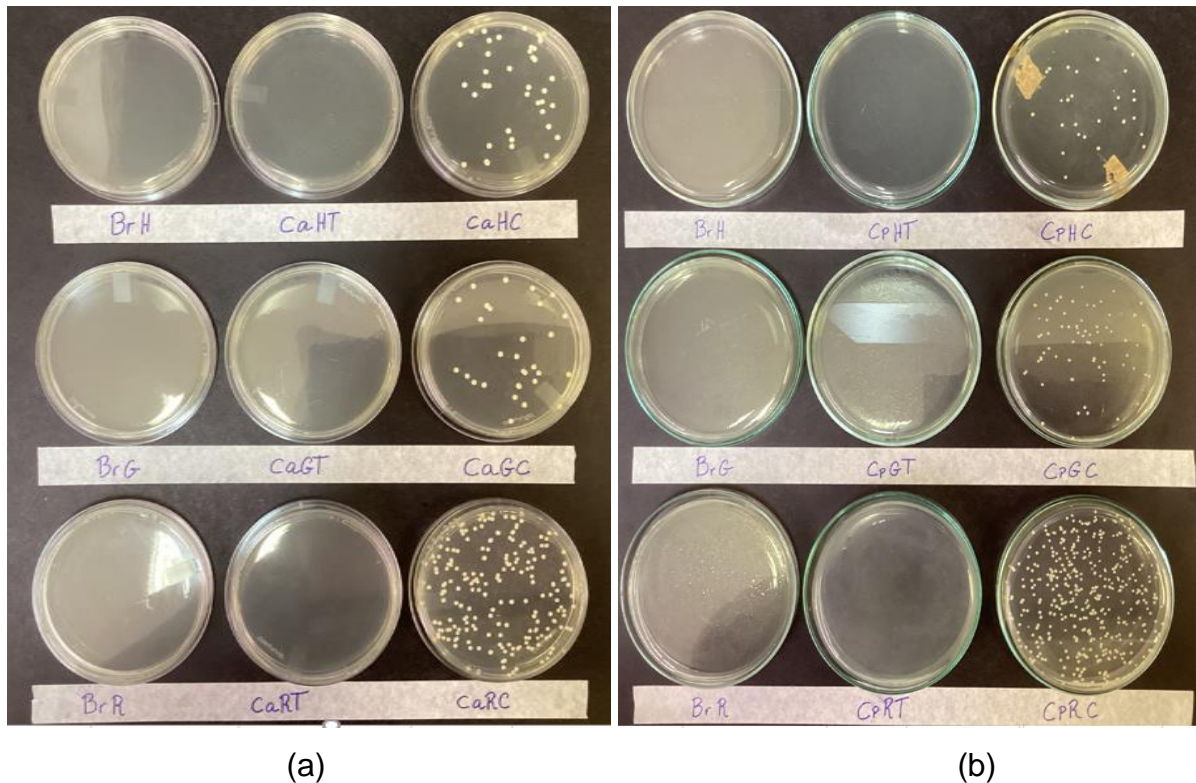


Figura 18 – Crescimento de UFC de *C. albicans* (a) e *C. parapsilosis* (b) após período de incubação

5.3. Testes microbiológicos em *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*

5.3.1. Testes de atividade metabólica através da Resazurina em *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*

Assim como nos testes microbiológicos realizados nos biofilmes do gênero *Cândida*, no ensaio de atividade metabólica nas bactérias *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* realizou-se pré-testes para analisar qual seria a concentração adequada do inóculo a ser preparado na formação do biofilme e analisou-se se haveria ou não a necessidade de realizar a substituição dos meios DSG e DCG por um meio de cultura nutritivo antes da aplicação da resazurina. Em todos os ensaios realizados com as bactérias, utilizou-se como meio de cultura nutritivo de controle o caldo *Mueller Hinton* (MH), como recomendado pelo CLSI. Foi determinado, a partir dos pré-testes, que a concentração de inóculo a ser utilizada seria de 10^6 cel/ml e que, assim como

nas *Cândidas*, seria necessário fazer a substituição dos meios DSG e DCG por MH após aplicação da radiação UVC e antes da aplicação da resazurina.

Tendo sido determinado o procedimento experimental de aplicação da resazurina, foi determinado experimentalmente o período de incubação para a obtenção da melhor curva de absorbância do reagente, como mostra a Figura 19 e a Figura 20.

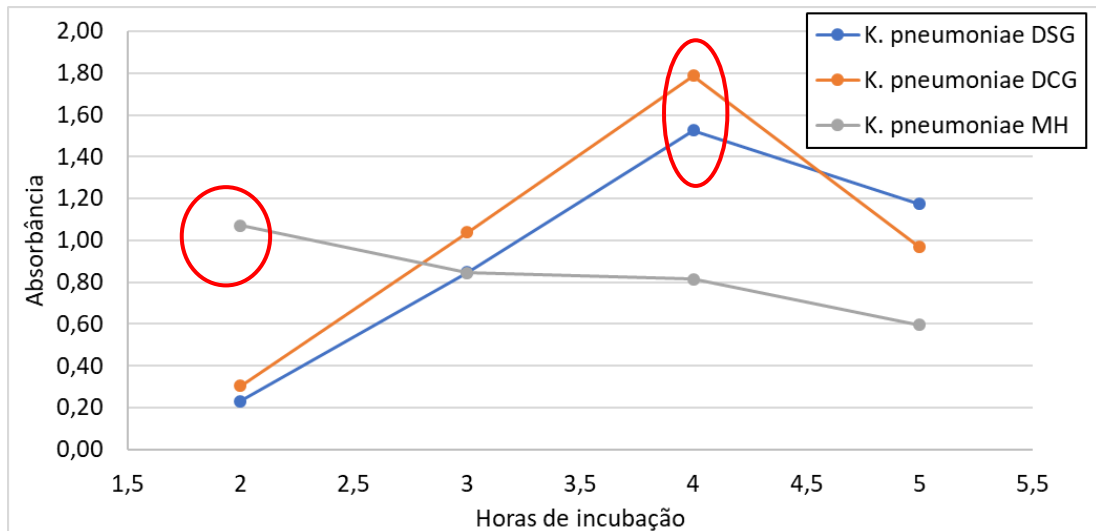


Figura 19 – Curva de absorbância da resazurina para a *K. pneumoniae*

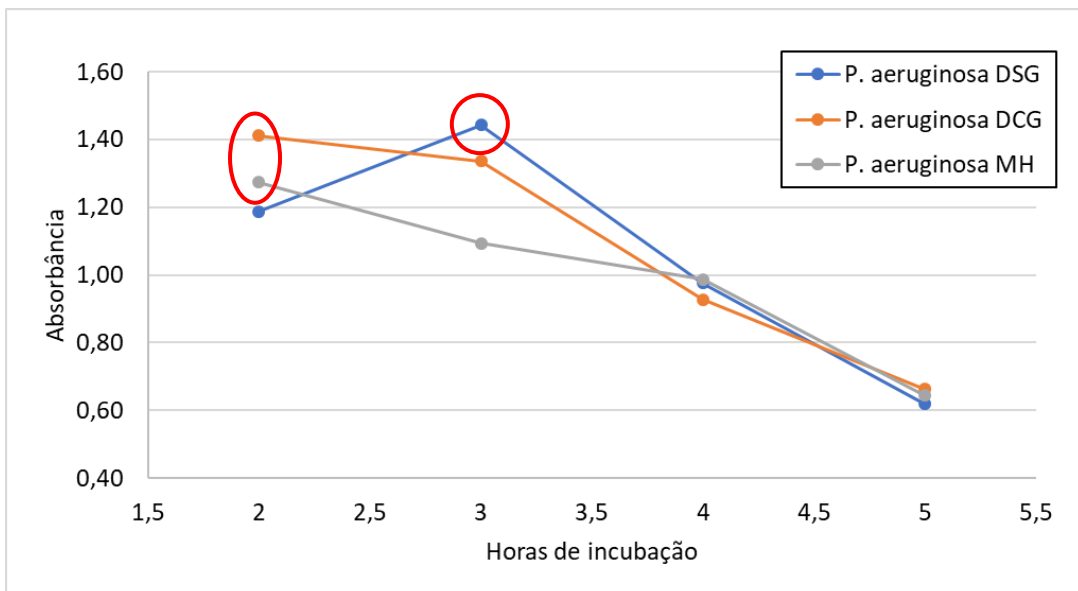


Figura 20 – Curva de absorbância da resazurina para a *P. aeruginosa*

Como podemos ver nas duas Figuras, não foi possível estabelecer, para as bactérias, um mesmo período de incubação para a realização das análises, dado que

os picos de absorvância dos biofilmes cultivados nos diferentes meios foram atingidos em tempos diferentes. Na Figura 19, o pico de absorvância do biofilme de *K. pneumoniae* para os meios DSG e DCG se deu com 4h de incubação, enquanto o biofilme de *K. pneumoniae* para o meio MH atingiu seu pico de absorvância com apenas 2h de incubação.

Já na Figura 20, podemos observar que o pico de absorvância se deu com um período de incubação de apenas 2h para o biofilme de *P. aeruginosa* cultivado nos meios DCG e MH, enquanto o tempo de incubação para o meio DSG atingiu o seu pico de absorvância em 3h. Após a definição dos melhores períodos de incubação para leitura em espectrofotômetro, foram realizados os testes de exposição à radiação UVC por 2h e o resultado da leitura da atividade metabólica pode ser observado na Figura 21.

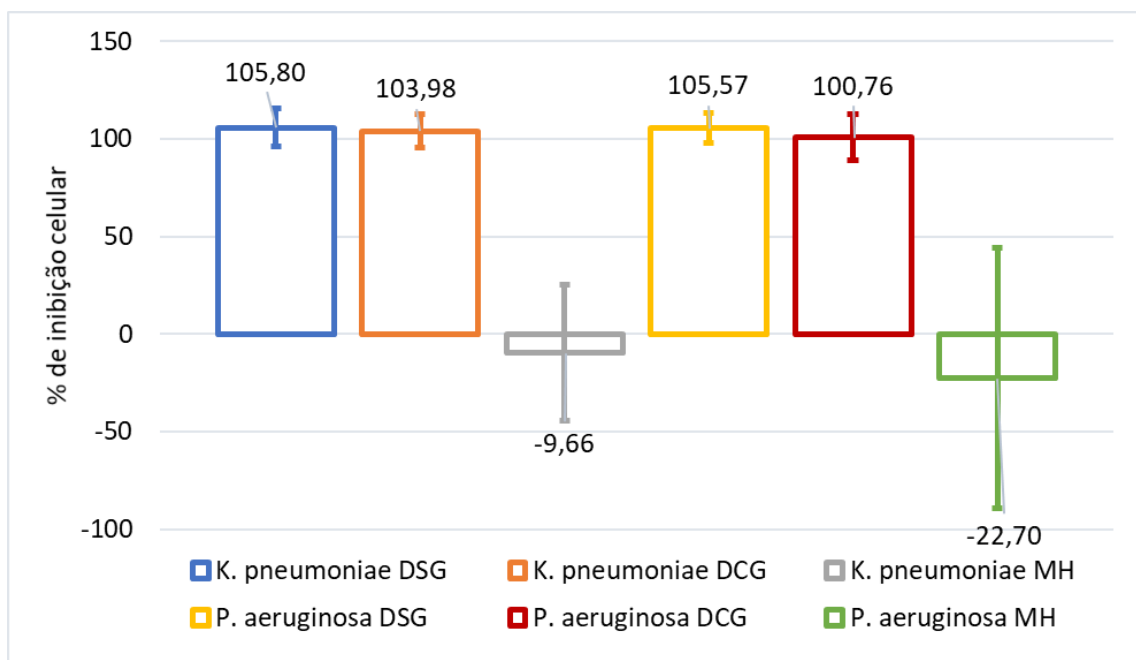


Figura 21 – % de inibição celular dos biofilmes de *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* após 2h de exposição à UVC

Como podemos observar, os biofilmes que foram cultivados nos meios DSG e DCG, tanto os de *K. pneumoniae* quanto os de *P. aeruginosa* apresentaram uma percentagem de inibição celular em torno de 100%, mostrando, assim que a UVC foi capaz de inviabilizar totalmente as células. No entanto, também foi possível observar que os biofilmes cultivados em meio MH não tiveram redução de viabilidade celular,

indicando que a UVC não foi capaz de atravessar a matriz extracelular desses biofilmes e de inviabilizar a células de *K. pneumoniae* e de *P. aeruginosa*. Conclui-se, portanto, que a UVC foi extremamente eficaz na eliminação dessas espécies de biofilmes quando cultivadas nos meios dialisantes, que são o objetivo do trabalho, mas que ela não foi eficaz na inibição desses mesmos biofilmes quando cultivados em um meio altamente nutritivo como o MH.

O tratamento estatístico realizado para a análise de viabilidade celular das bactérias foi semelhante àqueles aplicados nas *Cândidas*, utilizando os mesmos métodos estatísticos para uma confiabilidade de 95% e análise de $P < 0,05$ para indicação de incidência de redução relevante na viabilidade celular. A Tabela 3 mostra os valores de P para cada um dos biofilmes em cada um dos meios de cultura utilizados no experimento.

Biofilme	Número de amostras	Tipo de Teste aplicado	Valor de P
<i>K. pneumoniae</i> em meio DSG	14	Teste-t	$1,23 \times 10^{-14}$
<i>K. pneumoniae</i> em meio DCG	15	Teste-t	$1,4 \times 10^{-15}$
<i>K. pneumoniae</i> em meio MH	15	Teste-t	0,1774
<i>P. aeruginosa</i> em meio DSG	15	MANN-WHITNEY	$< 0,0001$
<i>P. aeruginosa</i> em meio DCG	15	MANN-WHITNEY	$< 0,0001$
<i>P. aeruginosa</i> em meio MH	15	MANN-WHITNEY	0,2469

Tabela 3 – Análise estatística de inibição de viabilidade celular para os biofilmes de *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*

Como podemos observar na Tabela 3, os resultados do valor de P estão de acordo com os resultados mostrados na Figura 21. Os biofilmes que foram cultivados nos meios DSG e DCG, tanto *K. pneumoniae* quanto *P. aeruginosa*, apresentaram um valor de $P < 0,05$, o que estratifica um resultado de alta eficiência na inibição celular pela UVC. Por outro lado, as duas espécies de biofilmes cultivadas em caldo MH apresentaram $P > 0,05$, o que mostra que em ambos os casos não houve inibição celular.

5.3.2. Quantificação de biomassa através de Cristal Violeta em *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*

A quantificação de biomassa presente na parede dos poços da placa de microtitulação após exposição à UVC pode ser visto na Figura 22. Como podemos observar, não houve, em nenhum dos casos, redução significativa na quantidade de biomassa após a exposição à radiação. Tal resultado indica que, para os biofilmes de *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* em meio DSG e DCG, houve a inibição celular indicada na análise de viabilidade pela resazurina, mas não houve a destruição da matriz extracelular que os compõem. Já para os biofilmes das duas espécies de bactérias cultivadas em caldo MH, não houve a redução de matriz extracelular na quantificação de biomassa, ratificando o resultado de que também não houve a diminuição na atividade metabólica indicada no Item 5.3.1 para os biofilmes cultivados em caldo MH.

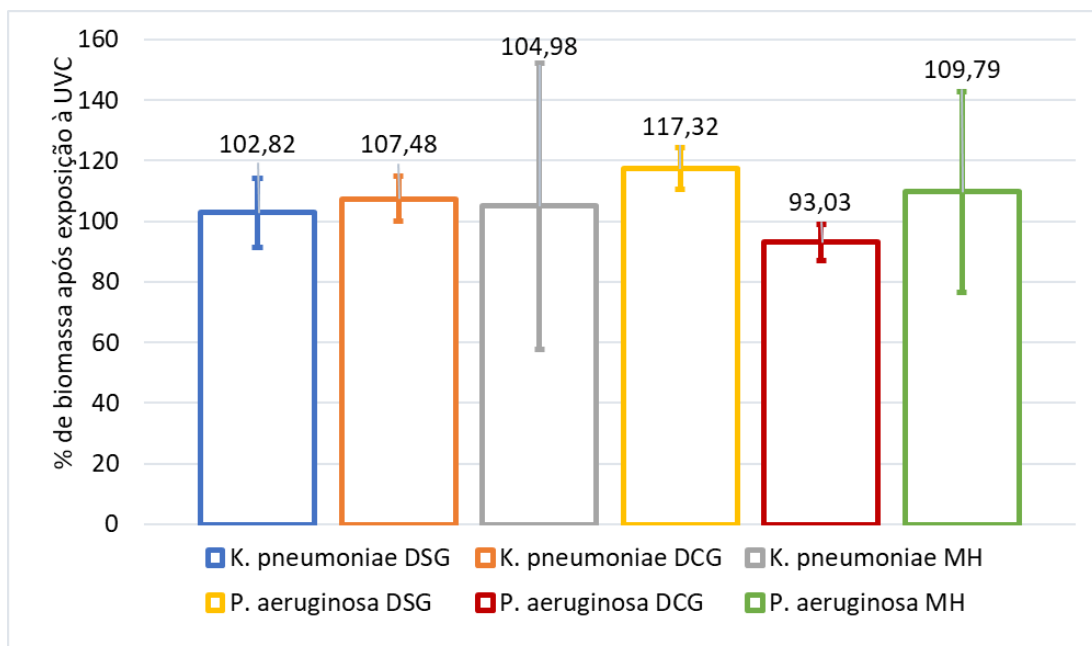


Figura 22 – Porcentagem de biomassa dos biofilmes de *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* após exposição UVC

Por fim, foi feito o tratamento estatístico da quantificação de biomassa através do Cristal Violeta adotando-se as mesmas metodologias de análise dos outros Itens, que são mostrados na Tabela 4. Como podemos ver na Tabela 4, nenhum dos valores de P apontou diferença significativa em relação ao grupo controle, o que indica que não

houve uma redução significativa na biomassa de nenhum dos biofilmes das duas bactérias testadas.

Biofilme	Número de amostras	Tipo de Teste aplicado	Valor de P
<i>K. pneumoniae</i> em meio DSG	10	MANN-WHITNEY	0,2137
<i>K. pneumoniae</i> em meio DCG	10	MANN-WHITNEY	0,1537
<i>K. pneumoniae</i> em meio MH	10	MANN-WHITNEY	0,2727
<i>P. aeruginosa</i> em meio DSG	10	Teste-t	0,0819
<i>P. aeruginosa</i> em meio DCG	8	MANN-WHITNEY	0,1241
<i>P. aeruginosa</i> em meio MH	9	Teste-t	0,3214

Tabela 4 – Análise estatística para redução de biomassa através do método cristal violeta para *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*

5.3.3. Contagem de Unidades Formadoras de Colônias em *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*

Os testes de UFC foram realizados em duplicata e são mostradas na Figura 23 e Figura 24. Na Figura 23, são apresentados apenas os controles de crescimento de UFC, pois não houve o crescimento de UFC dos biofilmes de *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* cultivados nos meios DSG e DCG após as 2h de exposição à radiação UVC. A Figura 25 exemplifica que a inviabilização completa desses biofilmes após exposição impediu que houvesse quaisquer crescimentos de UFC após o período protocolar de incubação. Por outro lado, a Figura 24 mostra o número de UFC dos controles em comparação a redução do número de UFC dos biofilmes expostos a radiação, quando cultivados em caldo MH. Na sua legenda, “CC” indica grupo controle e “UV” indica grupo testado. É possível observar que, assim como os experimentos de viabilidade celular e de quantificação de biomassa, os biofilmes de *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* apresentaram um crescimento de UFC mesmo após serem expostos à UVC, embora seu crescimento tenha sido reduzido. Observou-se que o número de UFC do grupo controle em relação ao testado foi praticamente o dobro, indicando que

houve certa influência da radiação UVC sobre os biofilmes bacterianos, mas não o suficiente para inviabilizá-los.

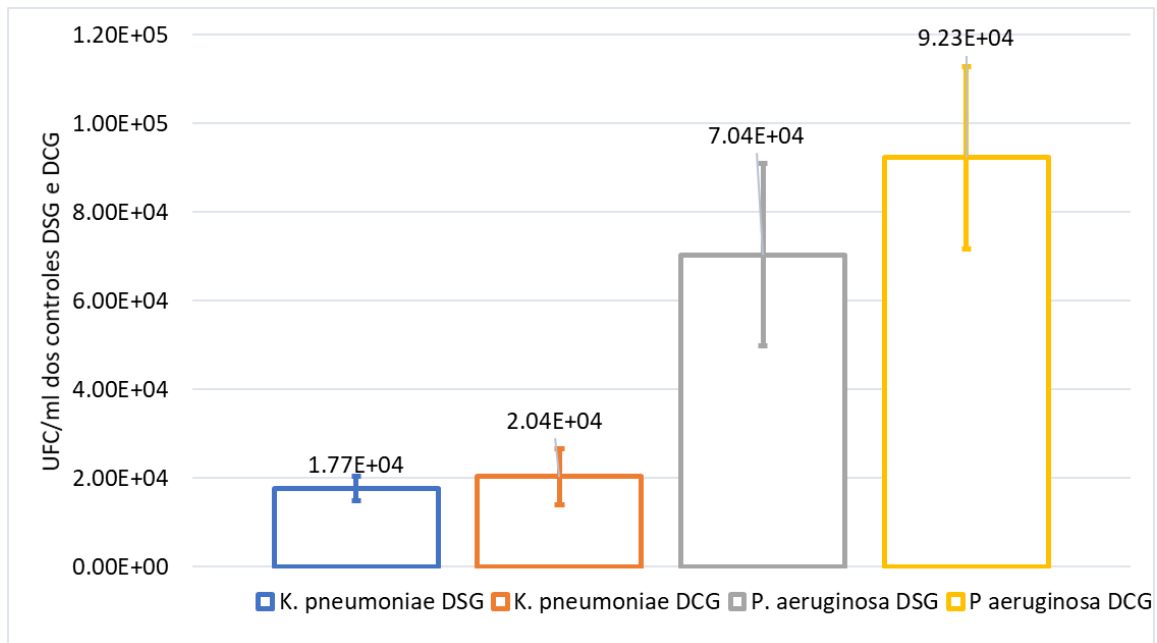


Figura 23 – Contagem de UFC dos controles de *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* em meios DSG e DCG

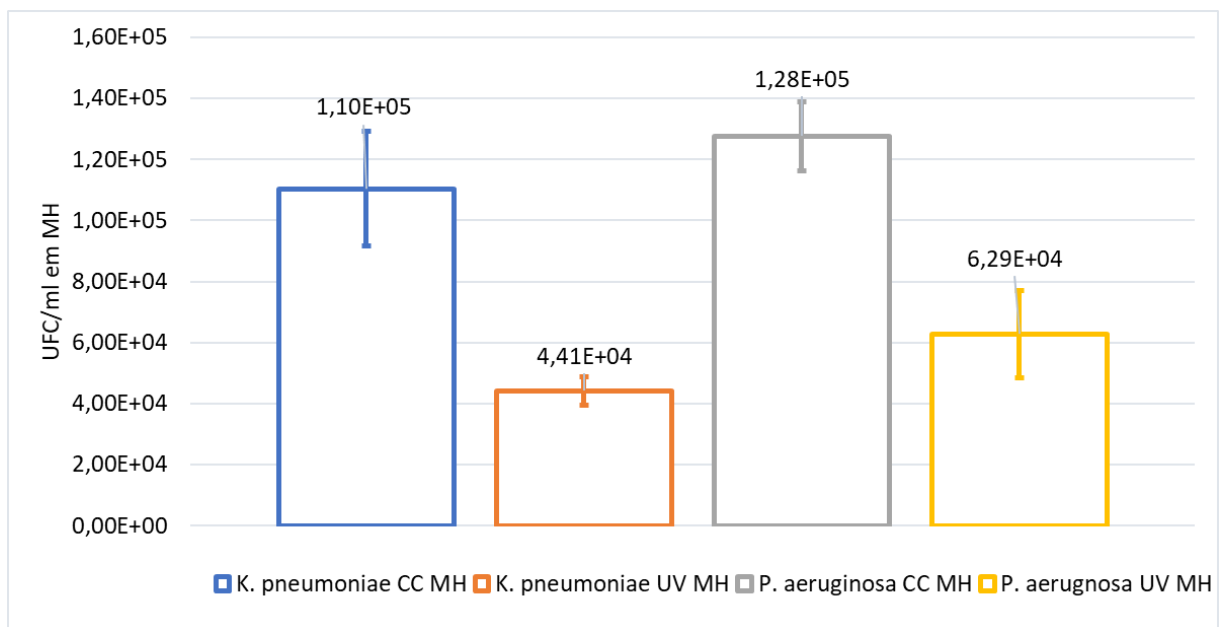


Figura 24 – Contagem de UFC de *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* em meio caldo MH

Na Figura 25: “BrH” é o controle de esterilidade do meio DSG; “BrG” é o controle de esterilidade do meio DCG; “BrM” é o controle de esterilidade do meio MH; “KHT” é o teste de *K. pneumoniae* em meio DSG; “KGT” é o teste de *K. pneumoniae* em meio DCG; “KMT” é o teste de *K. pneumoniae* em meio MH; “KHC” é o controle de *K. pneumoniae* em meio DSG; “KGC” é o controle de *K. pneumoniae* em meio DCG; “KMC” é o controle de *K. pneumoniae* em meio MH; “PHT” é o teste de *P. aeruginosa* em meio DSG; “PGT” é o teste de *P. aeruginosa* em meio DCG; “PMT” é o teste de *P. aeruginosa* em meio MH; “PHC” é o controle de *P. aeruginosa* em meio DSG; “PGC” é o controle de *P. aeruginosa* em meio DCG e “PMC” é o controle de *P. aeruginosa* em meio MH. Como podemos ver na Figura 25, não houve crescimento de UFC nos grupos testados dos biofilmes cultivados nos meios DSG e DCG, mostrando a inviabilização dos biofilmes causada pela radiação UVC. Por outro lado, foi possível observar que a UVC não inviabilizou nenhuma das duas espécies de biofilmes bacterianos quando cultivados em um meio altamente nutritivo como o MH.

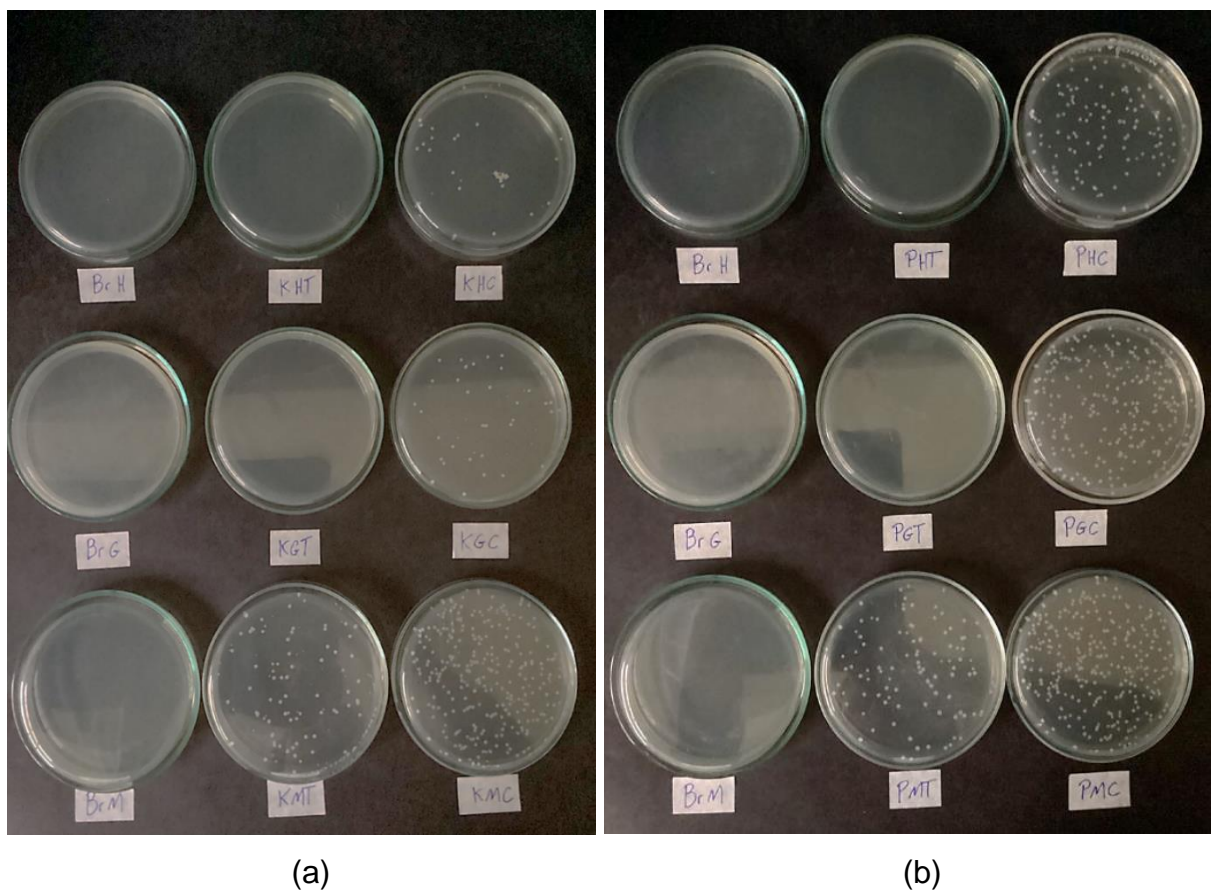


Figura 25 – Crescimento de UFC de *K. pneumoniae* (a) e *P. aeruginosa* após 24h de incubação (b)

5.4. Testes microbiológicos em *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus niger*

5.4.1. Testes de atividade metabólica através da Resazurina em *A. fumigatus* e *A. niger*

Os testes nos fungos filamentosos do gênero *Aspergillus sp.* Ocorreram de forma análoga aos demais testes dos outros microrganismos:

- Levantamento da curva de melhor concentração de inóculo para formação do biofilme e sua fixação na concentração de 10^6 cel/ml ;
- Substituição dos meios DSG e DCG imediatamente após a aplicação da Resazurina como forma de diminuir o estresse oxidativo;
- Levantamento de curva para análise do melhor tempo de incubação para que pudesse ser observado o maior pico de absorbância dos fungos em relação ao sal metabólico.

A Figura 26 e Figura 27 mostram as curvas de absorbância para o fungo *A. fumigatus* e *A. niger*, respectivamente.

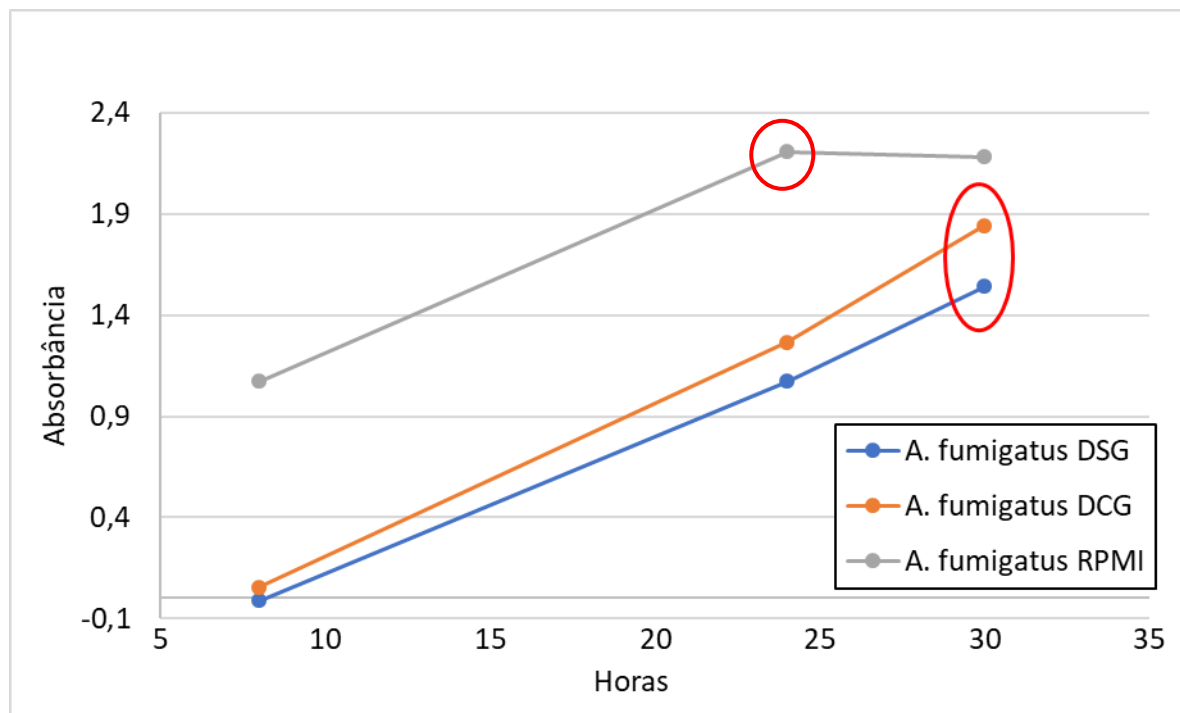


Figura 26 – Curva de absorbância da resazurina para o *A. fumigatus*

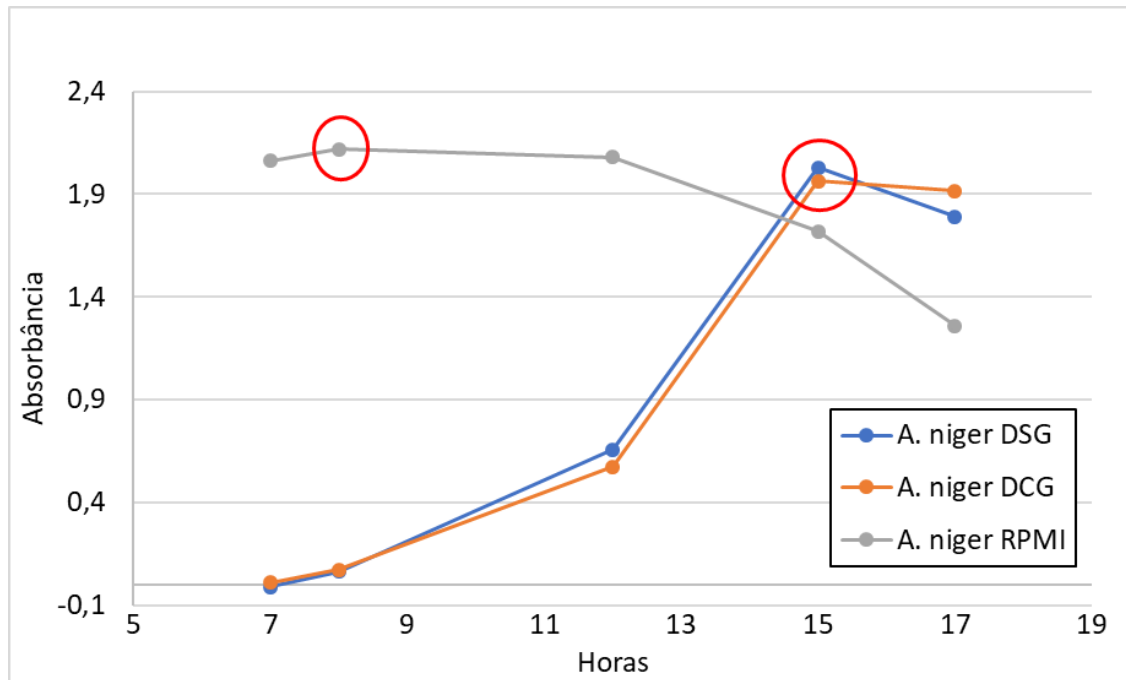


Figura 27 – Curva de absorvância da resazurina para o *A. niger*

Como podemos observar na Figura 26, o *A. fumigatus* atingiu seu pico de absorvância após 30h de incubação para os meios DSG e DCG, enquanto para o meio RPMI o período de incubação de 24h atingiu o seu pico de absorvância. Já para o *A. niger* da Figura 27, o melhor tempo de incubação foi de 15h para os meios dialisato e de 8h para o meio RPMI, observando-se nesses tempos o pico máximo de absorvância.

Podemos observar que, quando comparados aos outros microrganismos, o tempo dos fungos filamentosos para indicar atividade metabólica através da Resazurina foi bem maior. Isso aconteceu porque o ciclo de reprodução dos *Aspergillus* é consideravelmente maior que das leveduras de *Cândida* e das bactérias, tornando seu período de metabolização também maior.

A Figura 28 mostra a porcentagem de inibição celular dos biofilmes maduros de *A. fumigatus* e *A. flavus* após a exposição a 2h de radiação UVC, quando comparados com o grupo controle que não recebeu exposição à radiação e observados após incubação pelo período que apresenta seus picos de absorvância.

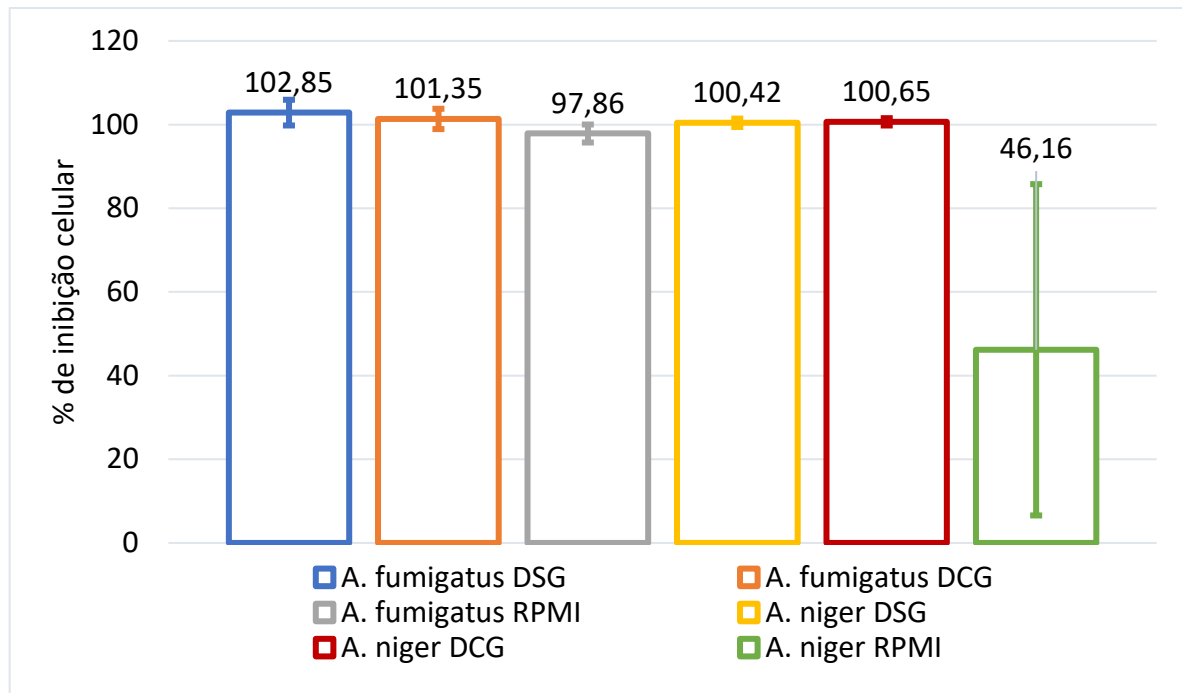


Figura 28 – % de inibição celular dos biofilmes de *A. fumigatus* e *A. niger* após 2h de exposição à UVC

Como podemos ver, a inibição celular foi de 100% para o *A. fumigatus* após a exposição à UVC para todos os meios de cultura utilizados, incluindo o RPMI que é considerado um meio altamente nutritivo e que oferece as melhores condições de cultivo possíveis. Para o *A. niger*, a radiação UVC também proporcionou inibição de 100% de suas células viáveis quando cultivadas nos meios DSG e DCG e uma inibição de 46,16% quando cultivado em meio RPMI. Embora não tenha sido totalmente inibido quando em RPMI, esse resultado mostra que os biofilmes dos fungos filamentosos do gênero *Aspergillus sp.* apresentaram alta susceptibilidade à radiação UVC, maior do que quando comparado aos fungos de levedura e com as bactérias.

Por fim, foi realizado também o estudo estatístico de confiabilidade dos resultados através do teste de hipótese, utilizando-se o método de MANN-WHITNEY para distribuições não normais e teste-t presumindo variâncias diferentes entre o grupo teste e o grupo controle para curvas normais. A Tabela 5 mostra os dados estatísticos para os testes de exposição à radiação dos *Aspergillus* em relação ao grupo controle, para uma confiabilidade de 95%, onde um valor $P < 0,05$ mostra que houve mudança significativa das amostras testadas em relação as amostras utilizadas como controle.

Biofilme	Número de amostras	Tipo de Teste aplicado	Valor de P
<i>A. fumigatus</i> em meio DSG	20	MANN-WHITNEY	< 0,0001
<i>A. fumigatus</i> em meio DCG	17	Teste-t	$9,96 \times 10^{-22}$
<i>A. fumigatus</i> em meio RPMI	20	MANN-WHITNEY	<0,0001
<i>A. niger</i> em meio DSG	20	Teste-t	$4,14 \times 10^{-35}$
<i>A. niger</i> em meio DCG	19	MANN-WHITNEY	<0,0001
<i>A. niger</i> em meio RPMI	9	Teste-t	$2,72 \times 10^{-5}$

Tabela 5 – Análise estatística de inibição de viabilidade celular para os biofilmes de *A. fumigatus* e *A. niger*

Como mostrado na Tabela 5, os valores de P demonstram a confiabilidade dos dados de inibição celular da Figura 28, pois todos os valores P foram menores que 0,05, ou seja, que houve uma variação significativa dos testes em relação aos grupos controle e que houve uma redução contundente na viabilidade celular dos biofilmes que foram expostos à UVC.

5.4.2. Quantificação de biomassa através de Cristal Violeta em *A. fumigatus* e *A. niger*

A Figura 29 mostra a quantificação de biomassa dos biofilmes presente na parede dos poços após o teste em relação a biomassa dos biofilmes do controle. Na Figura 29 é possível observar que não houve variação na quantidade de biomassa após os testes, indicando que a radiação UVC não foi capaz de quebrar as cadeias de polissacarídeos que formam a estrutura da matriz extracelular dos fungos. Entretanto, diferentemente dos outros microrganismos, houve uma variação na biomassa dos biofilmes quando cultivados em meio RPMI. Tal resultado mostra que, para os biofilmes maduros do gênero *Aspergillus sp.*, quanto mais nutritivo o meio em que são cultivados e conseqüentemente quanto maior e mais complexa é a sua estrutura, maior a sua susceptibilidade em relação a radiação UVC. De forma análoga ao item anterior, foi realizado o estudo estatístico para uma confiabilidade de 95% e

$P < 0,005$ para a quantificação de biomassa dos biofilmes testados em relação ao grupo controle que não recebeu exposição à radiação. O estudo estatístico é mostrado na Tabela 6.

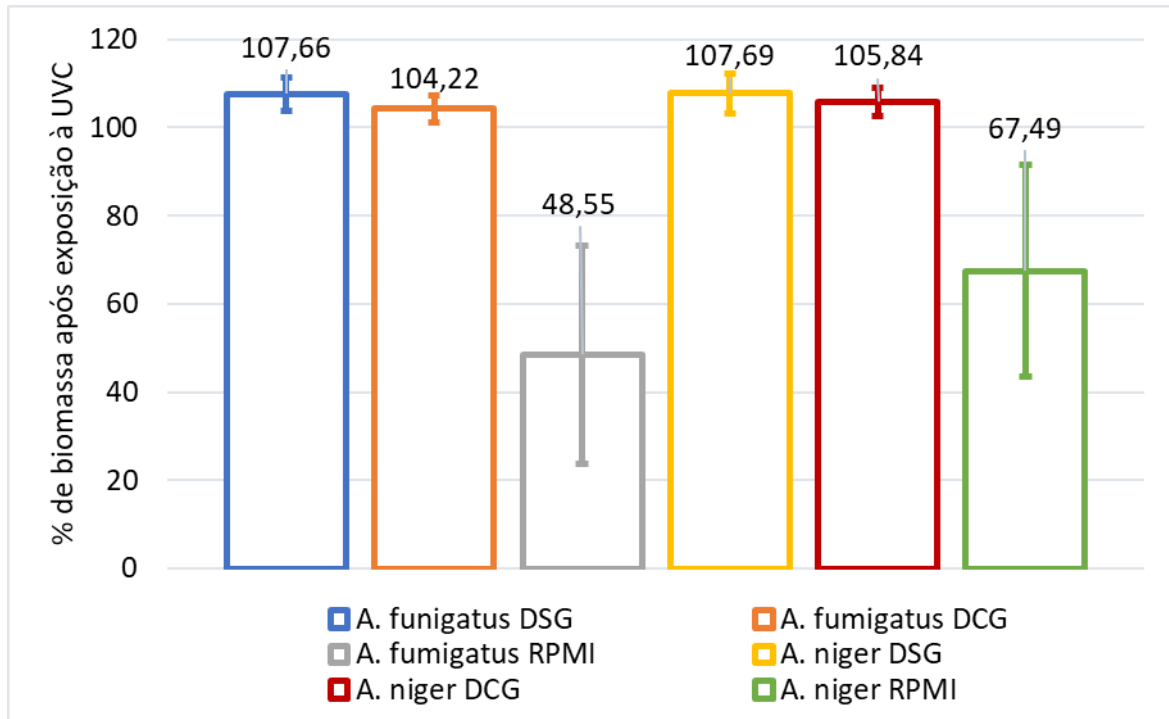


Figura 29 – % de biomassa dos biofilmes de *A. fumigatus* e *A. niger* após exposição UVC

Biofilme	Número de amostras	Tipo de Teste aplicado	Valor de P
<i>A. fumigatus</i> em meio DSG	15	MANN-WHITNEY	0,1227
<i>A. fumigatus</i> em meio DCG	12	Teste-t	0,2796
<i>A. fumigatus</i> em meio RPMI	15	Teste-t	$7,70 \times 10^{-7}$
<i>A. niger</i> em meio DSG	15	Teste-t	0,2051
<i>A. niger</i> em meio DCG	15	MANN-WHITNEY	0,0507
<i>A. niger</i> em meio RPMI	15	MANN-WHITNEY	$< 0,0001$

Tabela 6 – Análise estatística para redução de biomassa através do método cristal violeta para *A. fumigatus* e *A. niger*

Como mostrado na Tabela 6, e conformidade com a Figura 29, houve uma redução relevante da biomassa das duas espécies fúngicas quando cultivadas no meio RPMI se comparadas com os biofilmes de controle. Já para os biofilmes cultivados em DSG e DCG, não houve variação significativa na biomassa quando comparada com os meios de controle.

5.4.3. Contagem de Unidades Formadoras de Colônias em *A. fumigatus* e *A. niger*

A Figura 30 mostra o crescimento das unidades formadoras de colônias após serem semeadas em Ágar Batata Dextrose e serem incubadas por 30h.

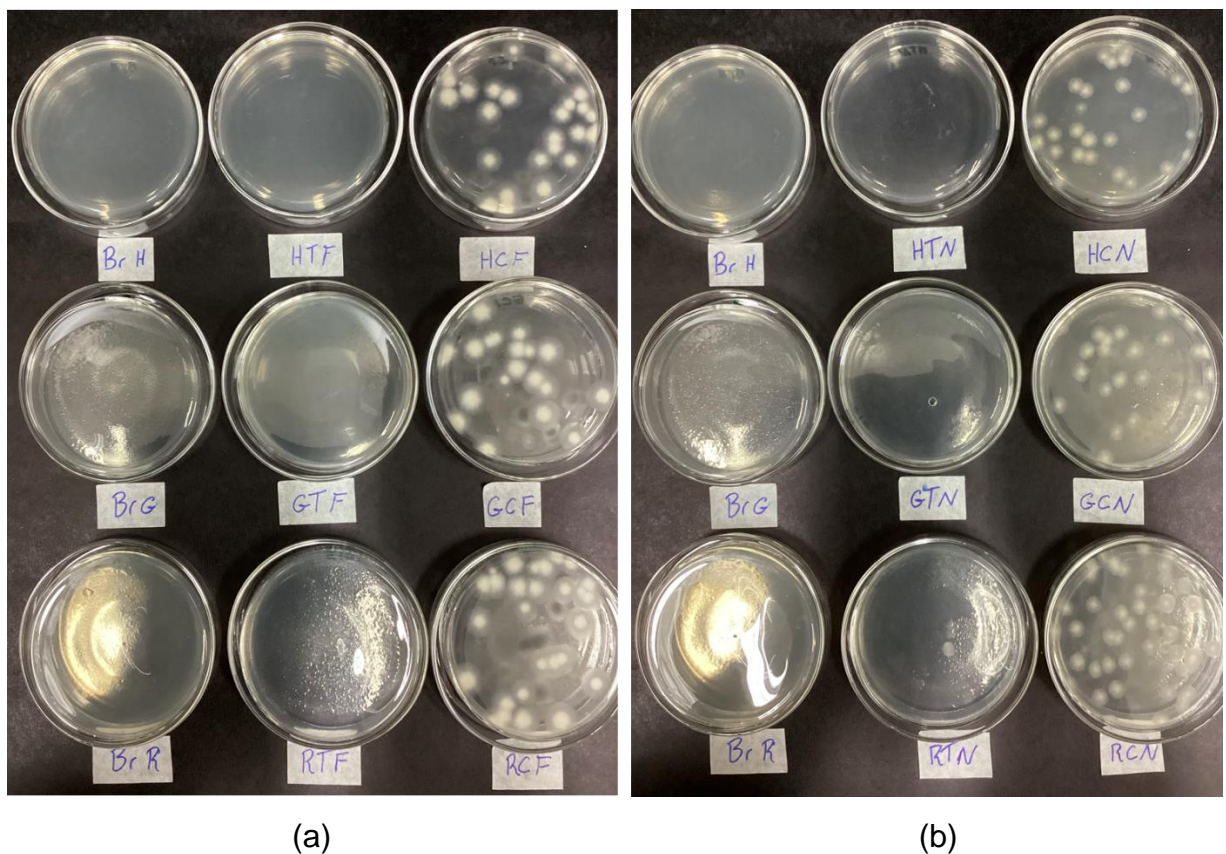


Figura 30 – Crescimento de UFC de *A. fumigatus* (a) e *A. niger* após 30h de incubação (b)

Na Figura 30: “BrH” é o controle de esterilidade do meio DSG; “BrG” é o controle de esterilidade do meio DCG; “BrR” é o controle de esterilidade do meio RPMI; “HTF” é o teste do *A. fumigatus* em meio DSG, “GTF” é o teste do *A. fumigatus* em meio

DCG; “RTF” é o teste do *A. fumigatus* em meio RPMI; “HCF” é o controle sem radiação UVC do *A. fumigatus* em meio DSG; “GCF” é o controle sem radiação UVC do *A. fumigatus* em meio DCG; “RCF” é o controle sem radiação UVC do *A. fumigatus* em meio RPMI; “HTN” é o teste do *A. niger* em meio DSG; “GTN” é o teste do *A. niger* em meio DCG; “RTN” é o teste do *A. niger* em meio RPMI; “HCN” é o controle sem radiação UVC do *A. niger* em meio DSG; “GCN” é o controle sem radiação UVC do *A. niger* em meio DCG; “RCN” é o controle sem radiação UVC do *A. niger* em meio RPMI.

Como podemos ver na Figura 30, não houve crescimento de UFC após 30h de incubação em nenhum dos grupos de teste, o que ratifica a comprovação de inviabilização celular através da Resazurina e mostra que a radiação UVC foi capaz de eliminar as células viáveis do *A. fumigatus* e *A. niger* em sua totalidade. Por fim, a Figura 31 mostra o crescimento de UFC dos controles apenas, dado que o crescimento dos testes foi nulo.

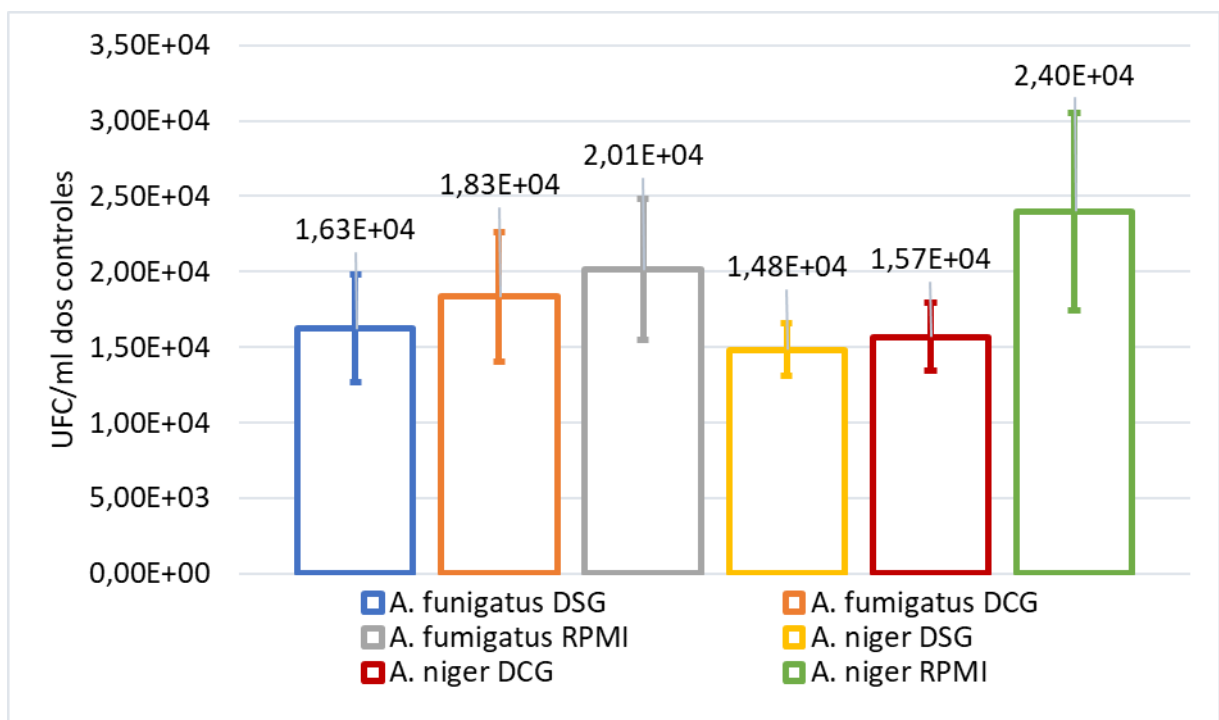


Figura 31 – Crescimento em UFC/ml dos controles de *A. fumigatus* e *A. niger* em meio DSG, DCG e RPMI

5.5. Definição de parâmetros para a construção do protótipo

5.5.1. Definição da fita de LED

Para a construção dos LEDs, foi buscado e encontrado junto a Companhia Chinesa *Shenzhen Suntech Company Limited* três fitas de LED, modelo STSN-30UVC3535-12, com tensão contínua de entrada DC de 12V, consumo de potência de 16W, comprimento de 1000mm, espessura de 10mm e com pico de radiação entre 265 e 280nm. A Figura 32 mostra a fita de LED.



Figura 32 – Fita de LED adquirida

Nessa fita de LED, a distância entre cada LED é de 3,3cm. Como seu ângulo de radiação é de 120° de forma cônica, foi possível calcular a distância mínima entre o a fita de LED e a parede da tubulação para que ocorra a iluminação completa da tubulação longitudinalmente, como mostra a Figura 33.

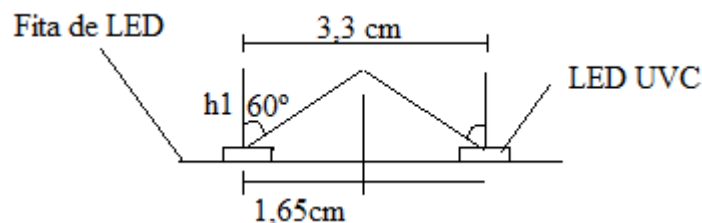


Figura 33 – Figura esquemática para a determinação da distância mínima

Através do cálculo da tangente de 60° , foi possível determinar a altura $h1=0,95cm$. Portanto, para que ocorra longitudinalmente a varredura completa da

tubulação, é necessário que a fita de LED esteja posicionada a uma distância de no mínimo 0,95cm da parede das tubulações.

5.5.2. Definição do cateter

Segundo Cataldo (2017), dentro dos materiais poliméricos comercialmente empregados em tubos de reatores fotoquímicos, o etileno tetrafluoroetileno (ETFE) apresenta a maior transmitância para o comprimento de onda da radiação UVC, como mostra a Figura 34.

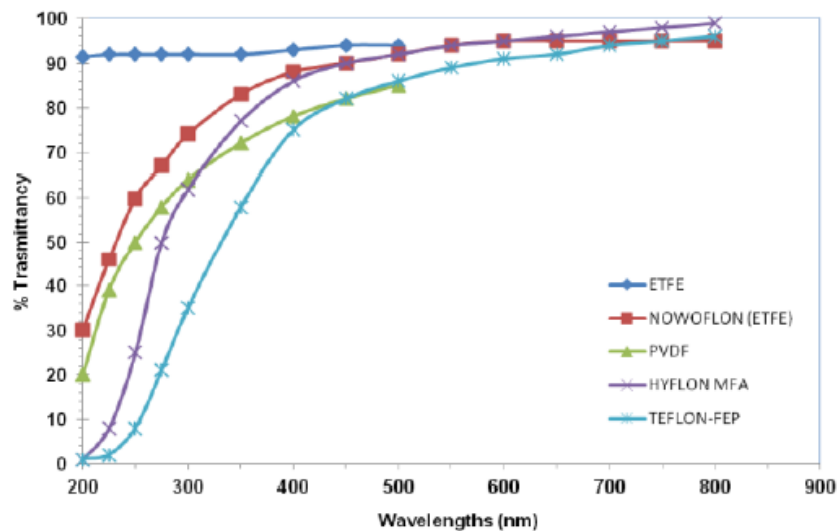


Figura 34 – Transmitância de materiais poliméricos fotoquímicos (CATALDO, 2017)

Ainda segundo Hu et. al (2017), em seu artigo de revisão, citando Robinson-Gayle et. al. (2001), a transmitância da radiação ultravioleta em filmes de ETFE variam de 83 – 88%. Para a empresa de tecnologia AGC, detentora da patente *Fluon® ETFE Film*, o ETFE apresenta uma transmitância superior a 90% a radiação ultravioleta e não apresenta quaisquer mudanças nessa transmitância após 15000h de exposição solar.

Quando analisamos o ETFE do ponto de vista de resistência mecânica, Charbonneau (2014) mostra que esse material não apresenta alongamento em sua estrutura quando submetido a uma pressão de tração inferior a 4MPa. Além disso, Hu et. al. (2015) mostram que a temperatura de trabalho desse material varia entre -50 a 200°C.

Com base em todas as pesquisas realizadas, foi concluído que o melhor material para ser utilizado como cateter foi o ETFE. Primeiramente, foi adquirida junto a empresa *Zeus – Polymer Solutions* uma amostra desse material na forma de cateter para a realizar a medição da transmitância desse material a radiação UVC. A Figura 35 mostra essa amostra adquirida.



Figura 35 – Amostra do cateter

Foram feitas 9 medições e, na média, foi obtida uma transmitância de 62,5% à radiação UVC. Esse resultado mostrou que a transmitância do ETFE, quando medida através da parede de um cateter, que é mais espessa, é menor se comparada a transmitância apontada em estudos feitos sobre esse mesmo material na forma de filme. Entretanto, essa transmitância medida é muito maior que a de qualquer outro material polimérico, flexível e com todas as características necessárias que a construção do protótipo demanda.

Por fim, foi determinado o material a ser utilizado como tubulação. A ANVISA, em sua RDC nº 154 que regulariza serviços de Diálise, não preconiza um tipo específico de tubulação a ser usada, fazendo com o que o Policloreto de Vinila (PVC) ainda seja o mais utilizado nas clínicas devido ao seu baixo custo. Porém, por se tratar de um material mais rugoso, o PVC favorece o crescimento de biofilmes fúngicos e bacterianos em ambiente aquoso e hospitalar (SEIL & WEBSTER, 2011; ZACHEUS et. al., 1999; LIU et. al., 2014). A partir desses estudos, foi definido que o PVC seria o material utilizado como tubulação alvo do estudo.

5.5.3. Desenho do protótipo

A Figura 36 mostra um desenho esquemático da estrutura inicial que constituirá o Cateter.

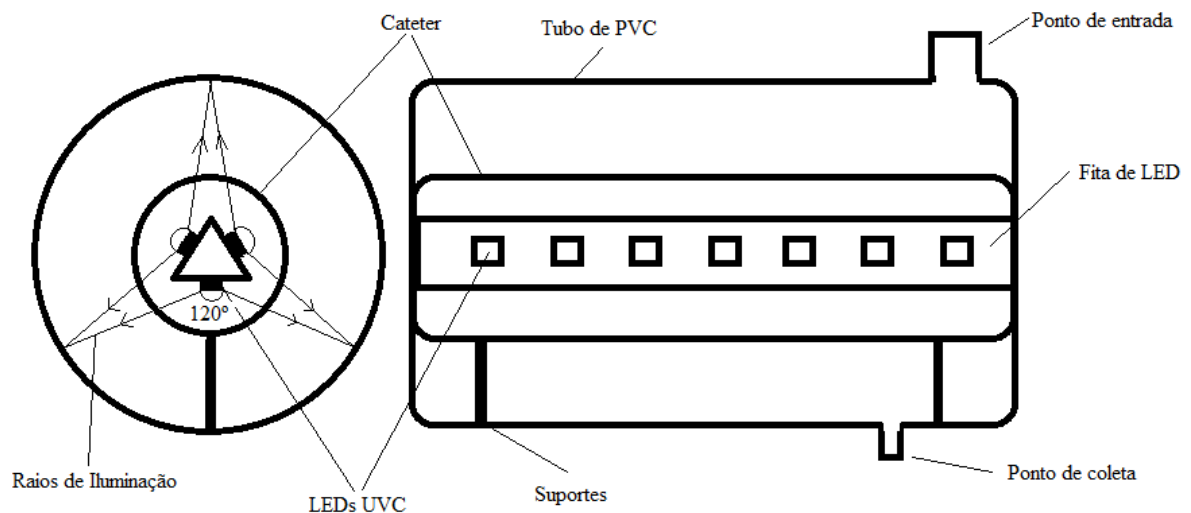


Figura 36 – Vistas frontal e lateral do sistema de esterilização do protótipo

A Figura 36 mostra a configuração do sistema de esterilização que ainda será montado até a finalização do programa de mestrado. A vista frontal mostra que as fitas de LED mostradas na Figura 32 serão montadas na forma de um triângulo equilátero e serão colocadas dentro do cateter mostrado na Figura 35. Esse cateter, por sua vez, contará com suportes que o sustentarão no ponto central da tubulação de forma que a iluminação nas paredes da tubulação seja a mesma em todas as direções radiais. Além disso, a sessão da tubulação contará com um ponto de coleta de água para análise e um ponto de entrada de água, que serão utilizados para testes de eficácia sobre o protótipo. A Figura 37 mostra o desenho técnico do protótipo construído e suas principais características, onde (1) representa a tubulação utilizada como teste e que simula um ducto de circuito de água do tratamento de hemodiálise. Para o protótipo foi escolhido como material da tubulação o Policloreto de Vinila (PVC), por ser um material de paredes rugosas que favorecem a proliferação e formação de biofilmes. O número (2) representa o invólucro na forma de cateter feito de ETFE, que é um material flexível, transmissível a UVC em cerca de 60% (valor medido na prática), resistente a radiação UVC, com temperatura de trabalho entre (-50) – 200 °C, hidrofóbico e com potencial biodegradável. (3) e (4) representa 3 fitas contendo LEDs

UVC configuradas geometricamente em triângulo equilátero de forma a garantir uma varredura axial e longitudinal por toda a parede da tubulação. (5) e (6) mostram uma estrutura móvel rolante que permite a inserção e retirada do cateter e garante que o cateter e os LEDs permaneçam no centro da tubulação, nivelando e homogeneizando a dose por toda a extensão da tubulação.

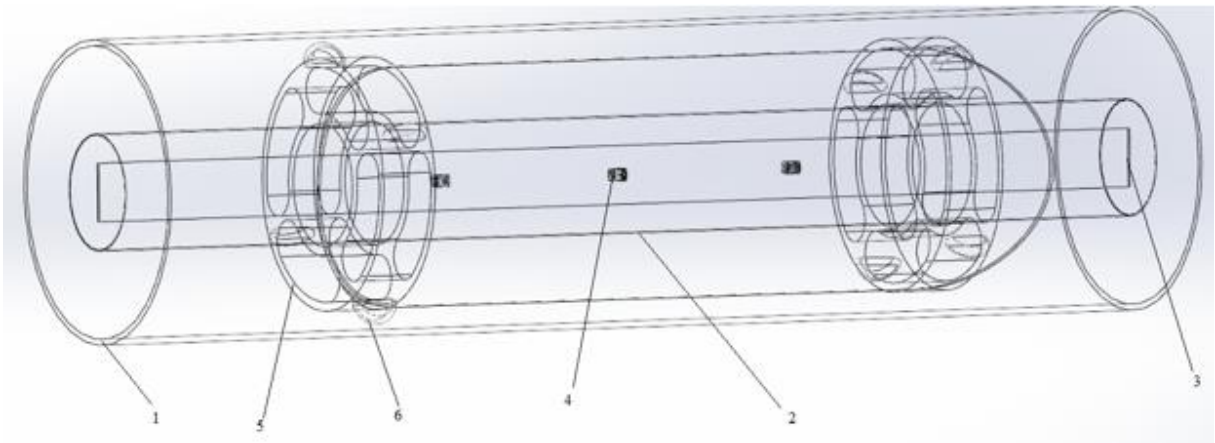


Figura 37 – Desenho técnico do protótipo

6. Discussão

Os resultados do trabalho mostraram que a eficácia dos LEDs UVC foi comprovada contra leveduras das espécies *C. albicans* e *C. Parapsilosis*, contra bactérias das espécies *K. pneumoniae* e *P. Aeruginosa* e contra os fungos filamentosos de *A. fumigatus* e *A. niger*. Em relação aos trabalhos mostrados na revisão bibliográfica acadêmica, mostrada no Item 2.1, foi possível observar a maior riqueza de detalhes trazidos por este trabalho de mestrado devido ao fato de ter analisado não só o experimento de viabilidade através da contagem por UFC/ml, mas também os testes de viabilidade celular através da Resazurina e da quantificação de biomassa através do Cristal Violeta. Essas três análises realizadas em conjunto permitiram identificar que a radiação UVC foi capaz de inibir completamente os biofilmes das 6 espécies citadas acima, porém não foi capaz de destruir a matriz extracelular de suas biomassas, como mostrou a análise do Cristal Violeta. Tal resultado mostrou que a irradiação UVC sobre os biofilmes requer atenção, pois a matriz extracelular dos biofilmes é uma das responsáveis pela geração de endotoxinas, causadoras de diversos problemas crônicos aos pacientes de

hemodiálise (VERMA et.al, 2015). Portanto, novos estudos precisarão ser feitos sobre essa biomassa inerte que não se desintegra após a irradiação. A adição de mais formas de análise em detrimento da utilização de apenas o método de UFC/ml permitiu ter uma visão mais completa do comportamento do biofilme após a exposição à irradiação e, com isso, uma visão mais global dos possíveis riscos existentes. Por isso, será necessário analisar essa matriz extracelular restante após UVC para verificar a presença de citotoxicidade nos meios de cultura aonde o biofilme foi cultivado.

Foi possível observar que também foi necessária uma dose de irradiação consideravelmente maior que aquela apresentada na literatura para realizar a completa inativação dos biofilmes. Enquanto maioria dos trabalhos mostraram doses na ordem de 10 – 100mJ/cm² para eliminar estes mesmos microrganismos em sua forma planctônica, este trabalho utilizou uma dose na ordem de 2 J/cm² para eliminá-los em sua forma de biofilme, ou seja, uma irradiação, na média, pelo menos 20 vezes maior. Tal resultado mostrou como biofilmes são essencialmente muito mais resistentes que microrganismos em sua forma celular suspensos em um meio de cultura. Além do fato dos testes terem sido realizados apenas em biofilmes, soma-se também o fato de que foram escolhidos líquidos dialisatos como meios de cultura dos testes ao invés da água, pois eles possuem mais sais minerais, facilitando a formação dos biofilmes e colocando ainda mais à prova a viabilidade de um protótipo construído com LEDs UVC como agente esterilizante de paredes de tubulações.

A partir da revisão bibliográfica foi possível observar que, quando se tratou de leveduras em sua forma planctônica, as doses de radiação (mJ/cm²) necessárias para atingir a eficácia desejada foi maior do que a dose necessária contra as bactérias. Entretanto, os resultados da pesquisa mostraram que os biofilmes bacterianos de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* apresentaram maior resistência que os biofilmes do gênero *Cândida sp.* e do gênero *Aspergillus sp.*, pois os primeiros resistiram a radiação UVC quando cultivados em meio caldo MH enquanto os segundos e os terceiros não resistiram à UVC quando cultivados em meio RPMI. Pôde-se observar, portanto, que os biofilmes formados pelas bactérias produziram uma matriz extracelular mais resistente a penetração da radiação que os biofilmes das leveduras do gênero *Candida sp.* e do gênero *Aspergillus sp.* quando cultivados em meio de cultura rico em nutrientes. Em meios dialisato, no entanto uma mesma dose foi suficiente para inibir 100% todas as espécies estudadas até o momento. Em relação

a comprovação de eficácia dos fungos filamentosos, foi possível observar que eles se mostraram altamente susceptíveis a radiação UVC, apresentando menor resistência quando comparados com outras espécies. O *A. fumigatus* e o *A. niger* foram as únicas espécies que apresentaram redução de viabilidade significativa quando cultivados no meio de cultura RPMI. Diferentemente das outras espécies, a biomassa dos fungos filamentosos se mostrou menos resistente quando cultivada em meios mais ricos, como foi o caso do RPMI em relação aos meios DSG e DCG.

Por fim, a busca por materiais, geometrias e configurações de LEDs para a construção do cateter mostraram que é possível se diferenciar de qualquer patente e/ou aplicação comercial existentes. O material encontrado para ser utilizado como cateter é, atualmente, majoritariamente usado na construção civil, fazendo com que a sua utilização em um ambiente clínico-hospitalar indique uma inovação científica e a não trivialidade da escolha. O uso de fitas de LED também facilita a construção do cateter devido a flexibilidade somada ao fato de conter as mesmas características técnicas dos LEDs utilizados na comprovação microbiológica nas placas de microtitulação. A geometria discutida mostra a capacidade dos LEDs de fazer uma varredura axial e longitudinal por todo o protótipo. Esse protótipo viabilizará, no futuro, a construção de um produto mínimo viável (MVP), sua aplicação em um ambiente real e a sua submissão a um pedido de patente e de regulamentação.

7. Conclusões

Os testes e estudos realizados nos permitiram chegar as seguintes conclusões:

- A radiação UVC atingiu eficácia de esterilização em biofilmes de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *K. Pneumoniae*, *P. Aeruginosa*, *A. fumigatus* e *A. niger* quando cultivados em meios dialisato sem glicose e dialisato com glicose com 2h de exposição e dose de radiação de 2,3J/cm²;
- Os LEDs não foram capazes de destruir a matriz extracelular dos biofilmes de nenhuma das espécies, conservando a biomassa produzida durante sua formação;
- A análise de viabilidade celular, quantificação de biomassa e UFC em conjunto trouxeram uma visão mais ampla e assertiva do comportamento dos biofilmes após a radiação UVC;
- Os biofilmes bacterianos não foram inviabilizados após 2h de irradiação quando cultivados em caldo MH;
- Foi possível encontrar o material que consistirá no cateter e as fitas de LEDs, de forma a possibilitar o cumprimento de todas as demandas de características técnicas que se definiram como essenciais para a viabilização da construção do protótipo;
- O desenho já realizado permite a construção de um protótipo que viabiliza a submissão de uma patente de processo e a viabiliza a escrita e submissão futura de uma patente de produto;

O desenvolvimento desse projeto demandará estudos futuros que viabilizarão este como um produto aplicável e que proporcionarão sua aplicação em ambiente clínico-hospitalar real. Os trabalhos futuros deste projeto são identificados abaixo.

7.1. Perspectivas da pesquisa

Para a perspectiva de pesquisa, existem pontos que ainda precisam ser analisados para viabilizar financeiramente o protótipo:

1. Testes de citotoxicidade da matriz extracelular após exposição à UVC. Como foi mostrado na seção dos Resultados, embora os LEDs tenham inviabilizado totalmente os biofilmes do gênero *Cândida* e as bactérias *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*, eles não foram capazes de destruir a matriz extracelular dos biofilmes formados. Portanto, será necessário analisar a possibilidade dessa matriz extracelular liberar endotoxinas na água que possam ser prejudiciais aos pacientes. Para analisar essa citotoxicidade, serão utilizados os animais alternativos *galeria melonella* e *zebrafish*, onde será feita a infecção desses animais utilizando-se os líquidos dialisato dos experimentos após a exposição à radiação UVC;
2. Testes de eficácia sobre o protótipo. O protótipo construído demandará testes de eficácia e citotoxicidade para comprovar que os testes que comprovaram a eficácia da radiação UVC *in vitro* funcionarão também em ambiente real.

7.2. Perspectivas de investimento

O projeto de pesquisa em desenvolvimento conta, atualmente, com um investimento do SEBRAE através do programa Catalisa ICT no valor de R\$ 146.000,00 não reembolsáveis para o desenvolvimento deste projeto. Desse valor, R\$ 126.000,00 são destinados ao pagamento de bolsas para três pesquisadores da pós-graduação das Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara que participam do desenvolvimento deste projeto: Fernando Antonio Storion Junior, Angélica Romão de Carvalho e Tiago Azevedo Cunha. O restante do valor é destinado para a compra de insumos de pesquisa e para o desenvolvimento do protótipo. Dentro do plano de atividades desse programa, foi estipulado que o projeto se desenvolvesse de uma *Time Readness Level* (TRL) 2 até uma TRL5, que prevê a finalização de testes em ambiente relevante. As TRLs são indicadores de desenvolvimento de um projeto de cunho tecnológico desde a sua ideação até a sua introdução no mercado.

No começo do ano de 2023 espera-se que haja o edital para a próxima fase do Catalisa ICT, prevendo um financiamento de R\$ 450.000,00. Além disso, este projeto será submetido diretamente a um edital PIPE Fase 2 direta com o pedido de investimento de R\$ 1.000.000,00. Estes dois programas de fomento terão o intuito de atingir uma TRL8, que indica um produto pronto para a sua regulamentação e posterior comercialização. Nesta próxima fase, serão buscados testes em ambiente

real através da interveniência do comitê de ética da clínica e/ou hospital parceiros, testes em laboratório credenciados ANVISA e estruturação do produto para a venda. Nessa próxima etapa também será montado o modelo de negócio que visará o tipo de venda que será realizada.

7.3. Perspectivas mercadológicas

Buscar-se-á, ao fim do programa de mestrado, submeter mais de um requerimento de pedido de propriedade industrial. Segundo pesquisas mercadológicas e de antecedentes de patentes mostrada na revisão da literatura, verificou-se a possibilidade de submissão de ao menos dois tipos diferentes de patentes:

1. Patente de processo: Será submetida uma patente que busca proteger a metodologia de esterilização de ductos de água do circuito de hemodiálise através da tecnologia de LEDs emissores de radiação UVC. Além disso, um levantamento futuro será realizado a fim de verificar se é possível aumentar a abrangência deste processo para outros tipos de tubulações de água que não são apenas destinadas ao tratamento de hemodiálise. Nesta patente, será protegido o uso de LEDs UVC como método de remoção de biofilmes que se formam na parede de tubulações, a metodologia de varredura de toda a superfície interna da tubulação e a metodologia de aplicação diária desse sistema;
2. Patente de produto: Também será submetida uma solicitação de pedido de patente em propriedade industrial sobre o protótipo de esterilização desenvolvido, que contará com o sistema de fitas de LED dispostos de forma a fazer a varredura radial e longitudinal de toda a superfície da tubulação, do cateter constituído de ETFE como invólucro protetor e transmissível dos LEDs UVC, um sistema de inserção e remoção na tubulação de forma estéril, anéis rolantes que permitam o posicionamento do cateter no centro da tubulação e sistema de segurança composto por câmeras e sensores que possibilitam o acompanhamento remoto do equipamento em utilização.

A ideia de utilizar esse mesmo sistema de esterilização por UVC na hemodiálise é de grande importância devido a sua originalidade e potencial de exclusividade. Portanto, esse projeto, se comprovado e regulamentado, pode se tornar uma solução única e escalável a nível internacional para um problema de difícil controle e que aflige cerca de 2 milhões de pessoas todos os anos. Além disso, por se tratar de um sistema de desinfecção em um ambiente altamente controlado, esse mesmo sistema pode se tornar replicável para diferentes áreas que necessitem de purificação de água com menor ou igual rigorosidade, abrindo um leque gigantesco de oportunidades.

Estima-se que, cerca de 750 milhões de pessoas, no mundo, apresentem algum tipo de doença renal crônica, onde, embora a maioria de casos reportados sejam oriundos de países desenvolvidos, avalia-se que a maioria desses casos venha de países subdesenvolvidos com baixa qualidade no sistema de saúde e consequentemente baixa reportagem de casos (CREWS; BELLO; SAAD, 2019). Além disso, estima-se que 2 milhões de pessoas se submetem anualmente ao tratamento de hemodiálise, porém tal número remete a cerca de 10% da necessidade mundial, indicando um baixo alcance para grande parte da população (COUSER et. al., 2011). Além disso, esse tratamento pode ser oneroso do ponto de vista financeiro, onde, por exemplo, no Brasil, os custos com hemodiálise superam 2,5 bilhões de reais por ano. Outro exemplo, nos Estados Unidos, os gastos com doenças renais crônicas excedem o valor de 48 bilhões de dólares por ano (CREWS; BELLO; SAAD, 2019).

Segundo o Censo Brasileiro de Diálise (2018) (NEVES, 2020), aproximadamente 133 mil pessoas se submeteram ao processo de hemodiálise no Brasil em 2018 e esse número apresenta uma tendência de aumento linear de cerca de 5500 novos casos por ano. O estudo mostra uma alta taxa de mortalidade, onde 19,5% das pessoas vêm a óbito durante o tratamento, sendo estimado que a contaminação seja a segunda maior causa de mortes desses pacientes. Estima-se que no Brasil existam cerca de 1000 clínicas de hemodiálise e nos Estados Unidos cerca de 7000 clínicas, o que mostra um enorme potencial de venda por se tratar de um produto único que pode solucionar um problema crônico e com potencial de se tornar unanimidade no mercado.

8. Referências

ARGYRAKI, Aikaterini et al. UV light assisted antibiotics for eradication of in vitro biofilms. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2018.

BAK, Jimmy et al. Disinfection of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm contaminated tube lumens with ultraviolet C light emitting diodes. **Biofouling**, v. 26, n. 1, p. 31-38, 2010.

BOODAGHIANS, Razmik; LASSEGARD, Jeff; TRAM, Nguyen; ORTOLAN, Christina; CHAUHAN, Vikram; ***Inline UV LED water disinfection and heating, US9376333B2***, Jun, 28, 2016

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária [ANVISA]. **Resolução da Diretoria Colegiada nº 11, de 13 de março de 2014**. Dispõe sobre os Requisitos de Boas Práticas de Funcionamento para os Serviços de Diálise e dá outras providências. Brasília: Ministério da Saúde, 13 mar. 2011. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0011_13_03_2014.pdf. Acesso em: 20 jul. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária [ANVISA]. **Resolução da Diretoria Colegiada nº 154, de 15 de julho de 2004**. Estabelece o Regulamento Técnico para o funcionamento dos Serviços de Diálise. Brasília: Ministério da Saúde, 17 jun. 2004. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2004/rdc0154_15_06_2004_rep.html. Acesso em: 20 jul. 2022.

BURMEISTER, Jayme Eduardo; CAMPOS, Juliana Fernandes; MILTERSTEINER, Diego da Rosa. Effect of different levels of glucose in the dialysate on the risk of hypoglycaemia during hemodialysis in diabetic patients. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 34, n. 4, p. 323-327, 2012.

BINNS, Randold et al. Effect of ultraviolet radiation on *Candida albicans* biofilm on poly (methylmethacrylate) resin. **Journal of Prosthodontics**, v. 29, n. 8, p. 686-692, 2020.

CATALDO, Franco. Uridine as photochemical actinometer: application to LED-UV flow reactors. **European Chemical Bulletin**, v. 6, n. 9, p. 405-409, 2017.

CHARBONNEAU, Linda; POLAK, Maria Anna; PENLIDIS, Alexander. Mechanical properties of ETFE foils: Testing and modelling. **Construction and Building Materials**, v. 60, p. 63-72, 2014.

COULLIETTE, Angela D.; ARDUINO, Matthew J. Hemodialysis and water quality. In: **Seminars in dialysis**. 2013. p. 427-438.

COUSER, William G. et al. The contribution of chronic kidney disease to the global burden of major noncommunicable diseases. **Kidney international**, v. 80, n. 12, p. 1258-1270, 2011.

CREWS, Deidra C.; BELLO, Aminu K.; SAADI, Gamal. 2019 World Kidney Day Editorial-burden, access, and disparities in kidney disease. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 41, n. 1, p. 1-9, 2019.

ELASRI, Mohamed O.; MILLER, Robert V. Study of the response of a biofilm bacterial community to UV radiation. **Applied and environmental microbiology**, v. 65, n. 5, p. 2025-2031, 1999.

GALEZZO, María-Angélica; SUSA, Manuel Rodríguez. Effect of single and combined exposures to UV-C and UV-A LEDs on the inactivation of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in water disinfection. **Journal of Water, Sanitation and Hygiene for Development**, v. 11, n. 6, p. 1071-1082, 2021.

GORA, Stephanie L. et al. Inactivation of biofilm-bound *Pseudomonas aeruginosa* bacteria using UVC light emitting diodes (UVC LEDs). **Water research**, v. 151, p. 193-202, 2019.

GUPTA, Vineet; H YASSIN, Mohamed. Infection and hemodialysis access: an updated review. **Infectious Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Infectious Disorders)**, v. 13, n. 3, p. 196-205, 2013.

HOLMES, C. J. et al. Effectiveness of various chemical disinfectants versus cleaning combined with heat disinfection on *Pseudomonas* biofilm in hemodialysis machines. **Blood purification**, v. 22, n. 5, p. 461-468, 2004.

HTAY, Htay et al. Hemodialysis use and practice patterns: an international survey study. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 77, n. 3, p. 326-335. e1, 2021.

HU, Jianhui et al. Buildings with ETFE foils: A review on material properties, architectural performance and structural behavior. **Construction and Building Materials**, v. 131, p. 411-422, 2017.

HU, Jianhui et al. Uniaxial tensile mechanical properties and model parameters determination of ethylene tetrafluoroethylene (ETFE) foils. **Construction and Building Materials**, v. 75, p. 200-207, 2015.

ISAKOZAWA, Yutaka; MIGITA, Heihachi; TAKESAWA, Shingo. Efficacy of biofilm removal from hemodialysis piping. **Nephro-urology Monthly**, v. 8, n. 5, 2016.

KIM, Do-Kyun; KANG, Dong-Hyun. UVC LED irradiation effectively inactivates aerosolized viruses, bacteria, and fungi in a chamber-type air disinfection system. **Applied and environmental microbiology**, v. 84, n. 17, 2018.

LIU, Ruyin et al. Molecular analysis of long-term biofilm formation on PVC and cast iron surfaces in drinking water distribution system. **Journal of Environmental Sciences**, v. 26, n. 4, p. 865-874, 2014.

LUO, Xueru et al. Advances in application of ultraviolet irradiation for biofilm control in water and wastewater infrastructure. **Journal of Hazardous Materials**, v. 421, p. 126682, 2022.

MACKENZIE, Dana. Ultraviolet light fights new virus. **Engineering (Beijing, China)**, v. 6, n. 8, p. 851, 2020.

MALAYERI, Adel Haji et al. Fluence (UV dose) required to achieve incremental log inactivation of bacteria, protozoa, viruses and algae. **IUVA News**, v. 18, n. 3, p. 4-6, 2016.

MARION-FEREY, Karine et al. Biofilm removal from silicone tubing: an assessment of the efficacy of dialysis machine decontamination procedures using an in vitro model. **Journal of Hospital Infection**, v. 53, n. 1, p. 64-71, 2003.

MONTANARI, Lilian Bueno et al. Microbiological contamination of a hemodialysis center water distribution system. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, p. 37-43, 2009.

NERBASS, Fabiana B.; et al. Censo Brasileiro de Diálise 2020. **Brazilian Journal of Nephrology**, 2022, p. 349-357. Disponível em: https://www.bjnephrology.org/wp-content/uploads/articles_xml/2175-8239-jbn-2021-0198/2175-8239-jbn-2021-0198-pt.pdf. Acesso em: 22 ago. 2022.

NEVES, Precil Diego Miranda de Menezes et al. Censo Brasileiro de Diálise: análise de dados da década 2009-2018. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 42, n. 2, p. 191-200, 2020.

NOURMORADI, H. et al. Ultraviolet irradiation: An effective inactivation method of *Aspergillus* spp. in water for the control of waterborne nosocomial aspergillosis. **water research**, v. 46, n. 18, p. 5935-5940, 2012.

NOVOSAD, Shannon A. et al. Multicenter outbreak of gram-negative bloodstream infections in hemodialysis patients. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 74, n. 5, p. 610-619, 2019.

OLIVEIRA, Lariane Teodoro et al. Fungal biofilms in the hemodialysis environment. **Microbial pathogenesis**, v. 123, p. 206-212, 2018.

PETTI, Allegra A. et al. Survival of starving yeast is correlated with oxidative stress response and nonrespiratory mitochondrial function. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 45, p. E1089-E1098, 2011.

PIRES-GONÇALVES, R. H. et al. Occurrence of fungi in water used at a haemodialysis centre. **Letters in applied microbiology**, v. 46, n. 5, p. 542-547, 2008.

POHL, Johannes et al. Carbamazepine ozonation byproducts: toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos and chemical stability. **Environmental science & technology**, v. 54, n. 5, p. 2913-2921, 2020.

REED, Nicholas G. The history of ultraviolet germicidal irradiation for air disinfection. **Public health reports**, v. 125, n. 1, p. 15-27, 2010.

RENZEL, Dipl.-Ing Andreas. Disinfection with UVC. 2016.

ROBINSON-GAYLE, S. et al. ETFE foil cushions in roofs and atria. **Construction and Building Materials**, v. 15, n. 7, p. 323-327, 2001.

ROBISON, Martin L.; BUKHARI, Zia; TU, Yunjie; VENKATESH, Chandan; ***Disinfection of water mains using ultraviolet light and oxidizing agentes***, US20170174536A1, Dec, 07, 2021

SEIL, Justin T.; WEBSTER, Thomas J. Reduced *Staphylococcus aureus* proliferation and biofilm formation on zinc oxide nanoparticle PVC composite surfaces. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 6, p. 2579-2584, 2011.

SISTI, M. et al. Ultraviolet germicidal irradiation in tap water contaminated by *Aspergillus* spp. **Journal of preventive medicine and hygiene**, v. 58, n. 4, p. E315, 2017.

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

UNITED STATES RENAL DATA SYSTEM [USRDS]. **USRDS Annual Data Report: Epidemiology of kidney disease in the United States.** Bethesda [Maryland]: National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2019. Disponível em: <https://www.usrds.org/media/2371/2019-executive-summary.pdf>. Acesso em: 14 maio 2022.

VAL, Dra. Maria Luiza do. Qual o papel da hemodiálise em pediatria? 2º CONEP-MT, **Congresso de Nefrologia do Mato Grosso**, UNIFESP, Universidade Federal de São Paulo, 2019. https://www.conepmt.com.br/palestras/4.%20Qual%20o%20lugar%20da%20hemodi%C3%A1lise%20em%20pediatria_%20Prof.%20Maria%20Luiza%20Daltro%20Moreira%20do%20Val.pdf

VERMA, Shiva et al. Bacteriological quality of treated water and dialysate in haemodialysis unit of a tertiary care hospital. **Journal of clinical and diagnostic research: JCDR**, v. 9, n. 10, p. DC14, 2015.

WARD, Richard A. Avoiding toxicity from water-borne contaminants in hemodialysis: new challenges in an era of increased demand for water. **Advances in chronic kidney disease**, v. 18, n. 3, p. 207-213, 2011.

WIDEL, Maria et al. Induction of bystander effects by UVA, UVB, and UVC radiation in human fibroblasts and the implication of reactive oxygen species. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 68, p. 278-287, 2014.

WU, Qian-Yuan et al. Ammonia-mediated bromate inhibition during ozonation promotes the toxicity due to organic byproduct transformation. **Environmental Science & Technology**, v. 54, n. 14, p. 8926-8937, 2020.

YUFENG, Gu; **Ultraviolet disinfection pipeline, CN104045125A**, Apr, 13, 2016.

ZACHEUS, Outi M. et al. Bacterial biofilm formation on polyvinyl chloride, polyethylene and stainless steel exposed to ozonated water. **Water Research**, v. 34, n. 1, p. 63-70, 2000.

ZHANG, Xin; ZHANG, Chen; YANG, Yifeng Dong; LEI, Cui He, ***Ozone and ultraviolet combined disinfection device for sewage pipeline***, CN111533242B, Mar, 19, 2021.