

VANESSA ROCHA

ESTERILIZAÇÃO DE MATERIAIS TERMOSSENSÍVEIS
ATRAVÉS DE APLICAÇÃO DE PLASMA GERADO POR
DESCARGA COM BARREIRA DIELÉTRICA (DBD)

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá, Universidade Estadual Paulista, para a obtenção do título de Mestre em Física na área de Aplicação Tecnológica de Plasma.

Orientador: Prof. Dr. Konstantin Georgiev Kostov

Guaratinguetá
2009

	Rocha, Vanessa
R672e	Esterilização de materiais termossensíveis através de aplicação de plasma gerado por descarga com barreira dielétrica (DBD) / Vanessa Rocha . – Guaratinguetá : [s.n.], 2009 160 f. : il. Bibliografia: f. 150-157 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá, 2009 Orientador: Prof. Dr. Konstantin Georgiev Kostov 1. Plasma(Gases ionizados) 2 Plasma de baixa temperatura.I. Título CDU 533.9

DADOS CURRICULARES

VANESSA ROCHA

NASCIMENTO	19.11.1982 – LIMEIRA / SP
FILIAÇÃO	Sérgio Rocha Ana Maria Kühl Rocha
2003/2006	Curso de Graduação Física Médica no Instituto de Biociências do Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – Unesp.
2007/2009	Curso de Pós-Graduação em Física, nível de Mestrado, na Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá da Universidade Estadual Paulista.

de modo especial, à minha família que foi a grande incentivadora e apoiadora para que eu continuasse meus estudos.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, fonte da vida, pela minha vida, minha inteligência, minha família e meus amigos.

aos meus pais *Sérgio e Ana*, que apesar das dificuldades enfrentadas, sempre incentivaram meus estudos,

ao meu orientador, *Prof. Dr. Konstantin Georgiev Kostov* por todo incentivo, orientação, dedicação e auxílio, para que o estudo aqui apresentado pudesse ser efetuado,

ao *Prof. Dr. Roberto Yzumi Honda*, por todo auxílio prestado,

ao *Prof. Dr. Maurício Antônio Algatti* pelas contribuições nesse estudo,

ao *Prof. Dr. Rogério Pinto Mota* por todo apoio dado,

ao técnico *José Benedito Galhardo*, pela grande ajuda prestada,

à *Prof. Dra. Cristiane Yumi Koga Ito*, por toda dedicação e auxílio no nosso estudo e experimentação microbiológica,

ao Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia da Unesp de São José dos Campos pelo apoio na realização da parte biológica dos experimentos, em particular nas pessoas dos mestrandos *Bruno Mello Matos e Guilherme Rodrigues Teodoro*, por todo auxílio prestado na parte microbiológica do trabalho.

Este trabalho contou com apoio da entidade

- CAPES, através do Programa de Fomento à Pós-Graduação (PROF).

“Há três maneiras de agir sabiamente:
a primeira pela meditação, que é a mais sábia
a segunda pela imitação, que é a mais fácil
a terceira pela experiência, que é a mais amarga”

Confúcio

ROCHA, V. **Esterilização de materiais termossensíveis através da aplicação de plasma gerado por Descarga com Barreira Dielétrica (DBD)**. 2009. 160f. Dissertação (Mestrado em Física) – Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá, Universidade Estadual Paulista, Guaratinguetá, 2009.

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo estudar a propriedade do plasma em pressão atmosférica para esterilização de materiais termossensíveis. Para testar a propriedade do plasma frio de esterilizar materiais termossensíveis, concentramos nossos experimentos no plasma gerado por descarga com barreira dielétrica (DBD). Para realizar nossos experimentos usamos os microrganismos *Cândida albicans* ATCC18804, *Escherichia coli* ATCC23922, *Bacillus subtilis* ATCC19659, e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Primeiramente, realizamos descarga DBD sobre uma placa de microtitulação contendo suspensões de microrganismos, mas observamos que, neste caso, a descarga DBD não teve eficácia na esterilização, devido a não penetração das entidades reativas (ozônio, UV), dentro desse volume de microrganismos. Modificamos nosso sistema, colocando um eletrodo adaptado a uma placa de Petri, e aplicamos a descarga DBD sobre os microrganismos em suspensão semeados em Agar. Realizamos exposição de 2, 5, 10, 15 e 20 minutos, com 1,1W de potência, tensão de 40kV pico-a-pico e aproximadamente 1 cm de distância entre o eletrodo superior e o meio de cultura. Observamos o crescimento dos meios de cultura tratados (contagem de UFC) e analisamos a morfologia dos microrganismos tratados em comparação com as amostras sem tratamento, através de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Através desses experimentos, pudemos observar que, no caso de superfícies, o plasma é um método de esterilização eficiente e rápido. Isso porque, durante a descarga são formados ozônio, fótons UV, e partículas livres carregadas, que podem contribuir para o efeito esterilizante.

PALAVRAS-CHAVE: Esterilização, plasma, Descarga com Barreira Dielétrica (DBD).

ROCHA, V. **Sterilization of termosensitive materials through plasma generated by a Dielectric Barrier Discharge (DBD)**. 2009. 160f. Dissertation (Master's degree in Physics) - University of Engineering of the Campus of Guaratinguetá, from São Paulo State University, Guaratinguetá, 2009.

ABSTRACT

The objective of this work was to investigate the application of plasma at atmospheric pressure for sterilization of termosensitive materials. To test the capability of cold plasma to sterilize termosensitive materials, we concentrated our study on the plasma generated by a dielectric barrier discharge (DBD). In our experiments we used the microorganisms *Candida albicans* ATCC18804, *Escherichia coli* ATCC23922, *Bacillus subtilis* ATCC19659, and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Firstly, we produce a DBD discharge in a microtitulation plate containing suspensions of the microorganism and no sterilization effect was observed. This is due to the fact that no penetration of the reactivates species (ozone, UV) inside of the volume of microorganisms. We modified our system, putting an adapted electrode on the cover of a Petri plate, and we applied the DBD discharge on microorganisms in suspension sowed in Agar. We used different times of treatment (2, 5, 10, 15 and 20 minutes), with mean power of 1,1W, 40kV pick-to-pick voltage and approximately 1 cm of distance between the superior electrode and the culture media. We evaluate the growth on the treated culture media (counting the colony-forming unit - CFU) and also analyzed the morphology of the treated microorganisms in comparison with the samples without treatment, through scanning electronic microscopy (SEM). Through these experiments, we could observe that, applied on a surfaces, the plasma is an efficient and fast sterilization method. This is because during the discharge are formed ozone, UV photons, and free particles, that can contribute to the effect of sterilization.

KEYWORDS: Sterilization, plasma, Dielectric Barrier Discharge (DBD).

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 3.1 – Matéria no estado gasoso e no estado de plasma	34
FIGURA 3.2 – (a) Sol emitindo radiação eletromagnética na faixa do ultravioleta distante, (b) Efeito de blindagem de potenciais elétricos em plasmas, (c) Resultante da força elétrica devido às várias n partículas carregadas numa dada carga A	38
FIGURA 3.3 – Evolução da temperatura do plasma (elétrons e partículas pesadas) com a pressão, em um arco de plasma de mercúrio	44
FIGURA 3.4 – Diagrama Temperatura-Densidade, mostrando os diferentes tipos de plasma	45
FIGURA 3.5 – Configurações diferentes de reator com descarga DBD.	48
FIGURA 3.6 – A forma típica da corrente e da voltagem de descarga DBD obtida pelo reator de plasma que opera no laboratório de Plasma, FEG, UNESP.....	50
FIGURA 3.7 – Foto de micro-descargas em um reator de plasma com barreira dielétrica.	50
FIGURA 3.8 – Figura de Lissajous para o reator de plasma aplicado sobre uma placa de microtitulação do laboratório de Plasma, FEG, UNESP	51
FIGURA 4.1 – Ilustração das três fases características da curva de sobrevivência dos microrganismos proposta por Moisan et al. 2001	59
FIGURA 4.2 – <i>S. aureus</i> (a) amostra sem tratamento (b) 120 s de exposição ao plasma, (c) 10 min. de exposição ao ozônio, e (d) 30 min. de exposição à lâmpada UV	66
FIGURA 4.3 – <i>E. coli</i> (a) amostra sem tratamento (b) 120s de exposição ao plasma, (c) 10 min. de exposição ao ozônio, e (d) 30 min. de exposição à lâmpada UV. ...	66
FIGURA 4.4 – Esquema da descarga DBD usada no experimento citado	67
FIGURA 4.5 – Imagem de TEM feitas por Yue Ma et al. 2008: (a) <i>S. aureus</i> antes do tratamento por plasma, (b) <i>S. aureus</i> depois do tratamento por plasma, (c) <i>S. aureus</i> antes do tratamento por plasma, (d) <i>S. aureus</i> depois do tratamento por plasma.	73
FIGURA 4.6 – Imagem de SEM de <i>E. coli</i> com aumento de 2000 vezes	

dos tratamentos de (a) 0 segundo, (b) 10 segundos, (c) 30 segundos, (d) 50 segundos, (e) 70 segundos. (feitos por Choi et al. 2006).....	76
FIGURA 4.7 – Imagem de SEM de <i>E. coli</i> com aumento de 10000 vezes dos tratamentos de (a) 0 segundo, (b) 10 segundos, (c) 30 segundos, (d) 50 segundos, (e) 70 segundos. (feitos por Choi et al. 2006).....	76
FIGURA 4.8 – Diagrama esquemático do aparato de esterilização para distinguir entre dano físico e químico na bactéria tratada com plasma.....	77
FIGURA 5.1 – Auto transformador Variac e transformador de alta tensão	83
FIGURA 5.2 – Circuito de obtenção de medidas elétricas	83
FIGURA 5.3 – Esquema do circuito de obtenção de medidas elétricas	84
FIGURA 5.4 – Gráfico da curva de calibração de tensão do experimento.....	85
FIGURA 5.5 – Configuração do reator formado pela placa de microtitulação	87
FIGURA 5.6 – Configuração do reator formado interno a placa de Petri	89
FIGURA 5.7 – Aparato experimental com eletrodo sobre tampa de vidro.....	91
FIGURA 5.8 – Reator de plasma e formação de descarga DBD	91
FIGURA 5.9 – Aparato experimental com eletrodo sobre tampa de plástico.....	92
FIGURA 6.1 – Figura de Lissajous para o experimento com placa de micro titulação contendo suspensão em solução salina, com área compreendida de 92,51mJ	96
FIGURA 6.2 – Figura de Lissajous para o experimento com placa de micro titulação com suspensão em água, com área compreendida de 5,83mJ.....	98
FIGURA 6.3 – Crescimento de <i>C. albicans</i> no Agar tratado.....	99
FIGURA 6.4 – Figura de Lissajous para o tratamento em suspensões semeadas Com área compreendida de 62,90mJ.....	100
FIGURA 6.5 – Crescimento de <i>C. albicans</i> em suspensões semeadas tratadas com plasma, comparado com suspensões semeadas sem tratamento.....	100
FIGURA 6.6 – Figura de Lissajous para o tratamento em suspensões sobre laminulas, com área compreendida de 34,87mJ.....	101
FIGURA 6.7 – Crescimento de <i>C. albicans</i> em suspensões sobre laminulas tratadas com plasma, comparada com suspensões sobre laminulas sem tratamento.	102

FIGURA 6.8 – Crescimento de <i>C. albicans</i> tratadas com plasma, comparado a culturas sem tratamento.	103
FIGURA 6.9 – Figura de Lissajous para o tratamento em suspensões semeadas com eletrodo sobre tampa de vidro, com área compreendida de 66,42mJ	104
FIGURA 6.10 – Crescimento de <i>C. albicans</i> em suspensões semeadas tratadas com plasma em 2, 5, 10 e 15 minutos (em duplicata)..	104
FIGURA 6.11 – Figura de Lissajous para o tratamento em suspensões semeadas com eletrodo sobre tampa da placa de Petri.....	105
FIGURA 6.12 – Crescimento de <i>C. albicans</i> com duplicata do a) controle, e com tratamentos de b) 2 minutos, c) 5 minutos, d)10 minutos, e) 15 minutos	108
FIGURA 6.13 – Curva de sobrevivência de <i>C. albicans</i> ATCC18804.....	109
FIGURA 6.14 – Crescimento de <i>C. albicans</i> com duplicata do a) controle, e com tratamentos de b) 2 minutos, c) 5 minutos, d)10 minutos, e) 15 minutos, f) 20 minutos.....	111
FIGURA 6.15 – Curva de sobrevivência de <i>C. albicans</i> ATCC18804.....	112
FIGURA 6.16 – Exemplo de MEV de microrganismo <i>C. albicans</i>	113
FIGURA 6.17 – MEV com aumento de 2000x de <i>C. albicans</i> : a) tratada em TSB, b) controle em TSB, c) tratada em água, d) controle em água	114
FIGURA 6.18 – MEV com aumento de 7500x de <i>C. albicans</i> : a) tratada em TSB, b) controle em TSB, c) tratada em água, d) controle em água	115
FIGURA 6.19 – MEV com aumento de 15000x de <i>C. albicans</i> : a) tratada em água, b) controle em água.....	116
FIGURA 6.20 – Crescimento de <i>E. coli</i> com duplicata do a) controle, e com tratamentos de b) 2 minutos, c) 5 minutos, d)10 minutos, e) 15 minutos	118
FIGURA 6.21 – Curva de sobrevivência de <i>E. coli</i> ATCC23922.....	119
FIGURA 6.22 – Crescimento de <i>E. coli</i> com duplicata do a) controle, e com tratamentos de b) 2 minutos, c) 5 minutos, d)10 minutos, e) 15 minutos	121
FIGURA 6.23 – Curva de sobrevivência de <i>E. coli</i> ATCC23922	122
FIGURA 6.24 – Exemplo de MEV de microrganismo <i>E. coli</i>	123

FIGURA 6.25 – MEV com aumento de 2000x de <i>E. coli</i> : a) tratada em TSB, b) controle em TSB, c) tratada em água, d) controle em água	124
FIGURA 6.26 – MEV com aumento de 7500x de <i>E. coli</i> : a) tratada em TSB, b) controle em TSB, c) tratada em água, d) controle em água	125
FIGURA 6.27 – MEV com aumento de 15000x de <i>E. coli</i> : a) tratada em TSB, b) controle em TSB, c) tratada em água, d) controle em água	126
FIGURA 6.28 – Crescimento de <i>S. aureus</i> com duplicata do a) controle, e com tratamentos de b) 2 minutos, c) 5 minutos, d)10 minutos, e) 15 minutos, f) 20 minutos.....	129
FIGURA 6.29 – Curva de sobrevivência de <i>S. aureus</i> ATCC 6538.....	130
FIGURA 6.30 – Crescimento de <i>S. aureus</i> com duplicata do a) controle, e com tratamentos de b) 2 minutos, c) 5 minutos, d)10 minutos, e) 15 minutos, f) 20 minutos.....	132
FIGURA 6.31 – Curva de sobrevivência de <i>S. aureus</i> ATCC 6538.....	133
FIGURA 6.32 – Exemplo de MEV de microrganismo <i>S. aureus</i>	134
FIGURA 6.33 – MEV com aumento de 2000x de <i>S. aureus</i> : a) tratada em TSB, b) controle em TSB, c) tratada em água, d) controle em água	135
FIGURA 6.34 – MEV com aumento de 7500x de <i>S. aureus</i> : a) tratada em TSB, b) controle em TSB, c) tratada em água, d) controle em água	136
FIGURA 6.35 – MEV com aumento de 15000x de <i>S. aureus</i> : a) tratada em TSB, b) controle em TSB, c) tratada em água, d) controle em água	137
FIGURA 6.36 – Crescimento de <i>B. subtilis</i> com duplicata do a) controle, e com tratamentos de b) 2 minutos, c) 5 minutos, d)10 minutos, e) 15 minutos, f) 20 minutos.....	140
FIGURA 6.37 – Curva de sobrevivência de <i>B. subtilis</i> ATCC19659.....	141
FIGURA 6.38 – Exemplo de MEV de microrganismo <i>B.subtilis</i>	142
FIGURA 6.39 – MEV com aumento de 2000x de <i>B.subtilis</i> : a) tratada em TSB, b) controle em TSB, c) tratada em água, d) controle em água	143
FIGURA 6.40 – MEV com aumento de 7500x de <i>B.subtilis</i> : a) tratada em TSB, b) controle em TSB, c) tratada em água, d) controle em água	144

FIGURA 6.41 – MEV com aumento de 15000x de *B.subtilis*: a) tratada em TSB, b) controle em TSB, c) tratada em água, d) controle em água 145

LISTA DE TABELAS

TABELA 4.1 – Densidades típicas dos íons e átomos de oxigênio, de ozônio e espécies carregadas nas descargas de plasmas	57
TABELA 5.1 – Curva de Calibração de Tensão	85
TABELA 6.1 – Tratamento de <i>C. albicans</i> em Agar úmido	107
TABELA 6.2 – Tratamento de <i>C. albicans</i> em Agar seco	110
TABELA 6.3 – Tratamento de <i>E.coli</i> em Agar úmido	117
TABELA 6.4 – Tratamento de <i>E.coli</i> em Agar seco.....	120
TABELA 6.5 – Tratamento de <i>S. aureus</i> em Agar úmido	128
TABELA 6.6 – Tratamento de <i>S. aureus</i> em Agar seco	131
TABELA 6.7 – Tratamento de <i>B.subtilis</i> em Agar seco	139

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS E SÍMBOLOS

DBD	- Descarga com Barreira Dielétrica
UFC	- Unidades Formadoras de Colônias
kHz	- quilohertz
kV	- quilo-volts
μC	- micro Coulomb
Hz	- Hertz
° C	- graus Celsius
mg/ml	- miligramas por mililitro
IF	- Fator de Inativação
UV	- Ultravioleta
nm	- nanômetro
W	- Watts
PBS	- Phosphate buffered saline (Tampão Fosfato-salino)
ppm	- parte por milhão
TSB	Tryptone Soya Broth
TSA	Tryptone Soya Agar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 ESTERILIZAÇÃO DE MATERIAIS	20
2.1 CONCEITOS IMPORTANTES.....	20
2.2 MÉTODOS DE ESTERILIZAÇÃO	21
2.2.1 Esterilização por calor seco (Estufa ou Forno de Pasteur).....	22
2.2.2 Esterilização pelo Calor Úmido - Autoclavagem.....	23
2.2.3 Esterilização por radiação gama.....	24
2.2.4 Esterilização por raios X.....	25
2.2.5 Esterilização por radiações não ionizantes (raios UV).....	25
2.2.6 Esterilização por formaldeído e vapor de formaldeído	26
2.2.7 Esterilização por óxido de etileno – ETO	27
2.2.8 Esterilização por produção de ozônio proveniente de descargas elétricas (plasma)	28
2.3 CONTROLE DE ESTERILIZAÇÃO	30
2.3.1 Indicadores	31
2.4 DESINFECÇÃO.....	31
3 FÍSICA DO PLASMA.....	33
3.1 INTRODUÇÃO.....	33
3.2 CONCEITOS BÁSICOS DE IONIZAÇÃO	34
3.3 DEFINIÇÃO DE PLASMA	37
3.3.1 Neutralidade Macroscópica	38
3.3.2 Blindagem de Debye	39
3.3.3 Frequência do Plasma	42
3.4 TIPOS DE PLASMA	43
3.4.1 Plasma térmico, ou plasma em equilíbrio	45
3.4.2 Plasma não térmico, ou plasma de não equilíbrio	46
3.5 PLASMA EM PRESSÃO ATMOSFÉRICA	46
3.5.1 Jato de plasma.....	47
3.5.2 Descarga Corona	47
3.5.3 Descarga com Barreira Dielétrica (DBD)	48
3.5.1.1 Aplicações da descarga DBD	52
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	54
4.1 COMPARAÇÃO ENTRE TIPOS DE DESCARGA UTILIZADAS NA ESTERILIZAÇÃO	54
4.1.1 Esterilização pelo uso de descarga corona	54
4.1.2 Esterilização pelo uso de descarga glow (ou de brilho).....	54
4.1.3 Esterilização pelo uso de jato de plasma à pressão atmosférica (APPJ) ..	55
4.1.4 Esterilização pelo uso de descarga de barreira resistiva	55
4.1.5 Esterilização pelo uso de descarga com barreira dielétrica	56
4.2 CINÉTICA QUÍMICA DA DESCARGA DE PLASMA.....	56
4.3 CINÉTICA DO PROCESSO DE INATIVAÇÃO DE BACTÉRIAS	58
4.4 AGENTES DE INATIVAÇÃO DE BACTÉRIAS.....	60

4.4.1 Efeito UV	60
4.4.2 Efeito de Espécies Reativas.....	61
4.4.3 Efeito de Partículas Carregadas.....	62
4.5 MECANISMO DE MORTE CELULAR.....	62
4.6 DESCRIÇÃO DE ALGUNS EXPERIMENTOS REALIZADOS	64
4.6.1 Suspensão em lamínulas lavadas com PBS	64
4.6.2 Comparação através de microscopia eletrônica entre esterilização por plasma, por ozônio e por radiação UV	65
4.6.3 Suspensão em lamínulas úmidas, e com acréscimo de solução salina	67
4.6.4 Análise do estado dos componentes biológicos e bacteriófagos durante inativação por descarga DBD	69
4.6.5 Análise de extravasamento de K^+ e ácidos nucleicos após tratamento por descarga DBD.....	72
4.6.6 Experimento para comparação entre dano físico e químico nos microrganismos causados por descarga DBD.....	75
4.6.7 Coagulação sanguínea e esterilização de tecidos por descarga com barreira dielétrica no ar usando eletrodo flutuante.....	77
4.6.8 Modelagem matemática da descontaminação por uso da descarga com barreira dielétrica (DBD).....	79
5 METODOLOGIA.....	81
5.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	81
5.2 REATOR DE PLASMA.....	82
5.3 PREPARAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA	86
5.4 EXPERIMENTO COM SUSPENSÕES EM PLACA DE MICROTITULAÇÃO	86
5.4.1 Placa de microtitulação com suspensões em solução salina	87
5.4.2 Placa de microtitulação com suspensões em água destilada	88
5.5 EXPERIMENTO COM ELETRODO DE ALTA TENSÃO DENTRO DA PLACA DE PETRI.....	88
5.5.1 Teste do Agar	89
5.5.1 Tratamento de suspensões semeadas no agar	89
5.5.3 Tratamento de suspensões em lamínula	90
5.5.3 Tratamento em microrganismos crescidos	90
5.6 EXPERIMENTO COM ELETRODO DE ALTA TENSÃO SOBRE TAMPA DE VIDRO	90
5.6.1 Tratamento de Suspensões semeadas no Agar	91
5.7 EXPERIMENTO COM ELETRODO DE ALTA TENSÃO SOBRE A PLACA DE PETRI.....	92
5.7.1 Tratamento de <i>Cândida albicans</i>	93
5.7.2 Tratamento de <i>Escherichia coli</i>	93
5.7.3 Tratamento de <i>Bacillus Subtilis</i>	94
5.7.4 Tratamento de <i>Staphylococcus aureus</i>	94
5.8 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	95
6 RESULTADOS E DISCUSSÕES	96

6.1 EXPERIMENTO COM SUSPENSÕES EM PLACA DE MICROTITULAÇÃO	96
6.1.1 Placa de microtitulação com suspensões em solução salina	96
6.1.2 Placa de microtitulação com suspensões em água destilada	97
6.2 EXPERIMENTO COM ELETRODO DE ALTA TENSÃO DENTRO DA PLACA DE PETRI.....	98
6.2.1 Teste do Agar	98
6.2.1 Tratamento de suspensões semeadas no Agar	99
6.2.3 Tratamento de suspensões em lamínula	101
6.2.3 Tratamento em microrganismos crescidos	102
6.3 EXPERIMENTO COM ELETRODO DE ALTA TENSÃO SOBRE TAMPA DE VIDRO	103
6.3.1 Tratamento de Suspensões semeadas no Agar	103
6.4 EXPERIMENTO COM ELETRODO DE ALTA TENSÃO SOBRE A PLACA DE PETRI.....	105
6.4.1 Tratamento de <i>Cândida albicans</i>	106
6.4.1.1 Tratamento com Agar úmido.....	106
6.4.1.2 Tratamento com Agar seco.....	109
6.4.1.3 Análise da estrutura e morfologia de <i>Cândida albicans</i>	112
6.4.2 Tratamento de <i>Escherichia coli</i>	116
6.4.2.1 Tratamento com Agar úmido.....	117
6.4.2.2 Tratamento com Agar seco.....	120
6.4.2.3 Análise da estrutura e morfologia de <i>Escherichia coli</i>	122
6.4.3 Tratamento de <i>Staphylococcus aureus</i>	127
6.4.3.1 Tratamento com Agar úmido.....	127
6.4.3.2 Tratamento com Agar seco.....	130
6.4.3.3 Análise da estrutura e morfologia de <i>Staphylococcus aureus</i>	133
6.4.4 Tratamento de <i>Bacillus Subtilis</i>	138
6.4.4.1 Análise da estrutura e morfologia de <i>Bacillus Subtilis</i>	141
7 CONCLUSÃO.....	147
REFERÊNCIAS	151
BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	156
APÊNDICE A – Obtenção da Potência através da figura de Lissajous.....	158

1 INTRODUÇÃO

Esse trabalho tem como objetivo estudar a física do plasma e suas aplicações em processos de esterilização de materiais termossensíveis.

A esterilização é o processo de inativação de todos os microrganismos presentes em determinado material ou ambiente. Atualmente, a melhor maneira de garantirmos a destruição de microrganismos presentes em instrumentos e equipamentos é mediante o uso do calor (calor úmido – autoclave, ou seco – estufa, ou forno de Pasteur). Porém devem ser estudados outros métodos para esterilização de materiais termossensíveis.

No âmbito da esterilização de materiais poliméricos termossensíveis empregados na fabricação de ampla gama de produtos médicos hospitalares, os processos que operam sob temperaturas compatíveis com estes materiais, gás de óxido de etileno e radiação ionizante, agregam desvantagens importantes envolvendo, respectivamente, aspectos de toxicidade ocupacional, ambiental e ao paciente.

As técnicas de esterilização por plasma oferecem grandes vantagens em relação aos outros métodos, visto que, são efetivas em reduzir a carga microbiana em superfícies e se desenvolve em temperatura ambiente, sem a utilização de gases tóxicos.

Garate et al. 1998 explicou que atualmente o emprego do plasma na esterilização só tem sido feito na etapa final do ciclo de esterilização com utilização de plasma de peróxido de hidrogênio ou de ácido peracético, para eliminar os resíduos tóxicos gerados.

Portanto, é necessário mais estudo para viabilizar o emprego da esterilização de artigos médico-hospitalares por plasma, visto que ainda é preciso entender como as variáveis físicas do plasma podem afetar os microrganismos.

2 ESTERILIZAÇÃO DE MATERIAIS

Neste capítulo apresentaremos conceitos básicos sobre métodos de esterilização e desinfecção de materiais, analisando as vantagens e desvantagens de cada método. Esse estudo sobre os métodos de esterilização e desinfecção foi baseado principalmente em Rutala 1996, Jacobs e Kowatsh 1993, e Kramer et al. 1996.

2.1 CONCEITOS IMPORTANTES

Esterilização é o processo que visa destruição total de todas as formas de vida, formas vegetativas e esporuladas, de um material ou ambiente, através de métodos físicos e/ou químicos.

Desinfecção consiste na destruição, remoção ou redução dos microrganismos, na forma vegetativa, presentes num material. Visa eliminar a potencialidade infecciosa do objeto, superfície ou local.

Limpeza é a remoção de sujidades que indispensavelmente antecede os procedimentos de desinfecção ou esterilização.

As características de um esterilizante ideal seriam:

- Alta eficácia: deve ser viruscida, bactericida, tuberculicida, fungicida e esporicida.
- Ação rápida: deve esterilizar rapidamente.
- Grande penetração: deve penetrar em pacotes de materiais comuns e em lumens.
- Compatibilidade com materiais: as alterações devem ser imperceptíveis tanto na aparência quanto na função dos materiais, mesmo depois de repetidas esterilizações.
- Não tóxico: não devem apresentar riscos à saúde do operador, do paciente, e também não deve poluir o ambiente.

- Resistente à matéria orgânica: deve ter eficácia na presença de quantidade razoável de matéria orgânica.
- Adaptabilidade: deve ser adequado para grandes ou pequenos locais de instalação e ponto de uso.
- Capacidade de monitoração: deve ser monitorada de forma fácil e acurada com uso de indicadores físicos, químicos e biológicos.
- Custo-efetivo: deve ter custo razoável de instalação e de operação.

Porém não existe um método de esterilização ideal, que satisfaça todos esses parâmetros. Mas o plasma em pressão atmosférica pode cumprir alguns requisitos importantes para um método de esterilização viável, como rapidez e não toxicidade.

2.2 MÉTODOS DE ESTERILIZAÇÃO

Os métodos de esterilização estão divididos em:

- Métodos físicos: São métodos que empregam uso de calor úmido, calor seco, e radiações ionizantes.
- Métodos químicos: São métodos que consiste em banhos ou lavagens dos materiais em substâncias.
- Métodos físico-químicos: São métodos que envolvem uso de fatores físicos e químicos (como o esterilizador por óxido de etileno, vapor à baixa pressão de formaldeído, e o uso de gases ionizados como o plasma).

De forma geral os métodos físico-químicos são processos que são realizados com baixas temperaturas. A esterilização a baixa temperatura é requerida para materiais termossensíveis e/ou sensíveis à umidade.

2.2.1 Esterilização por calor seco (Estufa ou Forno de Pasteur)

Este tipo de esterilização é realizado a temperaturas de 140° C a 180° C, com tempo de exposição de 60 a 120 minutos em estufas elétricas equipadas com termostatos.

O calor seco ou ar quente em temperatura suficientemente alta levam a desnaturação e oxidação das proteínas, que resultam na morte dos microrganismos.

Segundo Goffi 1978, esse método é indicado para esterilizar vidrarias, instrumentos de corte ou de ponta, os quais podem oxidar na presença do vapor da autoclave, e materiais impermeáveis como ceras, pomadas e óleos.

Existem dois tipos de estufas, segundo a distribuição de calor:

- Estufa de convecção por gravidade;
- Estufa de convecção mecânica (mais eficiente devido à distribuição de calor mais uniforme).

Para ser eficiente, este processo depende de:

1. Aquecimento da estufa até a temperatura desejada antes da colocação do material.
2. Os materiais devem estar rigorosamente limpos e adequadamente embalados.
3. A colocação do material deve permitir a circulação do ar. Portanto, deve ser mantida uma distância de dois centímetros entre as caixas.
4. O tempo de esterilização deve ser contado apenas após a colocação do material na estufa, e a partir do momento em que a temperatura foi atingida novamente.

Segundo Berry 1977, existem algumas desvantagens nesse tipo de esterilização como a destruição de substâncias têxteis; exige um maior tempo para a esterilização (comparado com autoclave); o aquecimento lento da estufa; a variação do tempo e a temperatura necessários para diferentes objetos (porque o calor penetra lentamente nas substâncias mais grossas); e a superexposição pode arruinar algumas das substâncias.

2.2.2 Esterilização pelo Calor Úmido – Autoclavagem

A autoclavagem é feita a 121° C com tempo de exposição de 15 a 30 minutos à pressão de uma atmosfera. A penetração do vapor no material garante maior nível de destruição dos microrganismos, e por este motivo é mais rápido.

Numa atmosfera úmida e a uma temperatura elevada, os microrganismos morrem quando se dá a coagulação e desnaturação das enzimas e proteínas que fazem parte de sua estrutura.

A morte dos germes pelo calor envolve uma relação tempo-temperatura. Algumas experiências foram feitas por Berry 1977 para se determinar os tempos de morte térmica de algumas bactérias. Por exemplo, células vegetativas de bactérias são mortas de cinco a dez minutos à temperatura de 60-70°C; células vegetativas de fungos são mortas de cinco a dez minutos à temperatura de 50-60°C; e esporos de fungos são mortos de cinco a dez minutos à temperatura de 70-80°C.

A esterilização a vapor é realizada em autoclaves, cujo processo possui fases de remoção do ar, penetração do vapor, e secagem. A remoção do ar diferencia os tipos de autoclaves.

A eficiência desse processo de esterilização depende de alguns fatores:

- Os materiais devem ser limpos antes do processo, sendo adequadamente embalados. Isso porque a presença de matéria orgânica (óleo, gordura, pus, sangue, e outras secreções) protege o microrganismo da ação esterilizante.
- Depois de esterilizados, os equipamentos devem ser conservados em embalagens apropriadas, caso contrário, voltam a se contaminar com microrganismos presentes no ambiente.
- O tempo deve ser contado a partir do momento em que a temperatura atinge 121° C.
- A distribuição do material no interior da autoclave deve garantir que o vapor atinja todo o material por igual.

- Se o material sair úmido da autoclave indica falhas no processo, neste caso deve ser novamente esterilizado.

O principal problema desses métodos de alta temperatura é que pode alterar os materiais poliméricos utilizados em cateteres e outros materiais sensíveis a temperatura, como por exemplo, materiais usados em endoscopias, e outros materiais hospitalares plásticos e elastoméricos que são utilizados na rotina clínica, terapêuticas e cirúrgicas.

2.2.3 Esterilização por radiação gama

Segundo Guidolin et al. 1988, a energia radiante para esterilizações vem sendo aplicada com sucesso nestes últimos anos. Produtos alimentícios, cosméticos, materiais cirúrgicos descartáveis, vacinas, soros e outros produtos, são descontaminados por radiações.

As radiações de alta energia causam ionização das moléculas, rompendo em átomos ou grupos de átomos reativos. Os radicais hidroxilas, por exemplo, são altamente reativos e destroem compostos celulares como DNA e proteínas.

A radiação eletromagnética derivada do decaimento do isótopo radioativo de cobalto é a que se utiliza com maior frequência na esterilização desses materiais.

Este tipo de energia, como a radiação gama, não aquece o produto, podendo, assim, ser também aplicada a produtos biológicos que, na maioria das vezes, são susceptíveis a temperaturas relativamente elevadas.

Os raios gama têm comprimentos de onda menores do que o tamanho dos átomos, $\lambda \leq 1\text{\AA}$, por isso tem elevado poder de penetração. Os fótons de raio-gama carregam muita energia causando grandes danos nas células, podendo esterilizar os produtos até mesmo após terem sido acondicionados em embalagens.

Porém existe a desvantagem deste processo ser caro e perigoso, necessitando uma equipe altamente especializada para manusear o equipamento.

2.2.4 Esterilização por raios X

Os raios X, com comprimento de onda de $10^{-10} \leq \lambda \leq 10^{-8} m$, são utilizados principalmente para esterilização de material farmacêutico e cirúrgico. Também são usados no processo de esterilização de alimentos. Eles podem matar os microrganismos responsáveis pela rápida deterioração de legumes e frutas.

Dois efeitos são responsáveis pela eliminação dos microrganismos: o dano direto da radiação em moléculas importantes para o funcionamento dos microrganismos; e o fenômeno de radiólise, que leva a formação de radicais livres que por sua vez são responsáveis pelos danos ao microrganismo. Portanto, os raios X têm alta energia e poder de penetração, causando a morte celular por atuar sobre os constituintes da célula, DNA e proteínas celulares. Mas, também acarreta grande risco ocupacional.

2.2.5 Esterilização por radiações não ionizantes (raios UV)

As radiações ultravioletas (UV), com comprimento de onda entre 240 a 280 nm (comprimentos que são absorvidas pelo DNA), são radiações de fraca energia e menor poder de penetração.

Essas radiações, ao invés de ionizar uma molécula, excitam os elétrons, resultando em uma molécula que reage diferente das moléculas não-irradiadas. Atuam em nível de DNA, levando a formação de dímeros de timina no DNA, os quais interferem com o processo de transcrição e replicação deste, levando a morte.

Além da baixa penetrabilidade, os dímeros de timina podem ser desfeitos por um sistema de correção de erros no DNA presente nos microrganismos. Este sistema está normalmente relacionado à exposição à luz visível, sendo conhecido como fotoreativação.

Lâmpadas especiais que emitem luz UV, com comprimento de onda microbicida, são utilizadas para matar microrganismos, apenas da superfície. São usados na desinfecção do ar de gabinetes, recintos hospitalares (salas de operação), câmaras de fluxos, etc. Estas radiações são altamente agressivas para a pele e para os olhos, portanto não se deve trabalhar na presença delas sem a proteção adequada.

2.2.6 Esterilização por formaldeído e vapor de formaldeído

Formaldeído é um monoaldeído que existe na forma de gás solúvel em água. Embora tenha sido usado durante muitos anos, seu uso foi reduzido com o aparecimento do glutaraldeído. As principais desvantagens do formaldeído estão relacionadas a menor rapidez de ação e maior carcinogenicidade.

O formaldeído apresenta-se ativo apenas na presença de umidade, necessária para formação do grupo metanol. Ele interage com proteína, DNA e RNA. No entanto, é difícil especificar acuradamente seu modo de ação na inativação bacteriana. Ele tem um amplo espectro de ação, inclusive contra esporos. A exposição máxima no ambiente é de 0,1 a 0,5 ppm, visto ser um gás tóxico, e tem de um a dois dias de biodegradabilidade.

O vapor de formaldeído é gerado em máquina própria a partir de formaldeído a concentração de 2%. O formaldeído é indicado para materiais termossensíveis, embalados com papel grau cirúrgico, e costuma ser mais usado na Inglaterra. O

indicador biológico é o microrganismo *Bacillus stearothermophilus*. Esse processo é feito com temperatura de 50 a 60° C, com tempo do ciclo de três horas e meia.

Como existe uma fase, chamada fase líquida, em que o formaldeído é extraído, não há exposição do pessoal. No entanto, devem ser seguidas as normas de segurança já que é tido como um produto que pertence à categoria de substâncias perigosas.

2.2.7 Esterilização por óxido de etileno – ETO

A ação do óxido de etileno se dá pela alquilação protéica do DNA e RNA, prevenindo o metabolismo celular normal e a replicação microbiana.

O óxido de etileno tem sido o produto mais freqüentemente utilizado como processo de baixa temperatura. Porém, alguns estados americanos têm requerido redução da emissão de óxido de etileno de 90 a 99%, pelos seus efeitos nocivos.

O óxido de etileno é um produto altamente tóxico, na forma de gás. Apresenta riscos tóxicos aos operadores e pacientes por ser provavelmente carcinogênico e por ser inflamável.

Os clorofluorcarbonetos são usados como estabilizadores em combinação com o óxido de etileno, mas a Agência de Proteção Ambiental Americana banuiu a produção dos clorofluorcarbonetos. Foram então desenvolvidas alternativas como 100% de óxido de etileno ou com diferentes estabilizadores, como por exemplo, dióxido de carbono, hidroclorofluorcarbonetos, vapor de peróxido de hidrogênio, ozônio, ácido peracético e dióxido de carbono. As alternativas menos prejudiciais ao ambiente são:

- 8,5% de óxido de etileno e 91% de dióxido de carbono;
- Mistura de óxido de etileno com hidroclorofluorcarbonetos;
- 100% de óxido de etileno.

O óxido de etileno é um gás inodoro, incolor, inflamável e explosivo. A adição de estabilizantes, dióxido de cloro ou clorofluorcarboneto, reduz o risco de explosão.

No Brasil existe legislação específica sobre funcionamento de centrais de esterilização por óxido de etileno. No entanto, as questões relacionadas aos ciclos, tipo de gás e aeração não estão completas, embora constem os limites máximos de resíduos aceitáveis para os diferentes tipos de materiais.

Os limites operacionais são definidos como 450 a 1200 mg/L, 29°C a 65°C, 45% a 80%, e duas a cinco horas respectivamente. Dentro de certas limitações, o aumento da concentração do gás pode reduzir o tempo necessário para esterilizar os materiais.

A vantagem desse processo é que podem ser esterilizados materiais sem danificá-los. As desvantagens são o alto custo, alta toxicidade, e tempo longo do ciclo.

O ciclo possui cinco estágios, que inclui: preparo e umidificação, introdução do gás, exposição, evacuação do gás e injeções de ar, que requerem aproximadamente duas horas e meia, excluindo o período de aeração.

A aeração mecânica é de 8 a 12 horas à temperatura de 50°C a 60°C. A aeração ambiental é de sete dias a 20°C.

Os testes biológicos devem ser realizados no mínimo semanalmente, com o bacilo *B. subtilis*, sempre na primeira carga e ao término de todas manutenções preventivas e corretivas. Também pode ser usado indicador químico, que consiste na identificação dos pacotes por fitas contendo um indicador químico.

Atualmente tem sido substituído pelo plasma de peróxido e pelo formaldeído a 2% a baixa temperatura.

2.2.8 Esterilização por produção de ozônio proveniente de descargas elétricas (plasma)

As técnicas de esterilização por produção de ozônio (plasma) oferecem grandes vantagens em relação aos outros métodos, visto que, são efetivas em reduzir a carga microbiana e se desenvolve em temperatura ambiente, sem a utilização de gases tóxicos.

O peróxido de hidrogênio aplicado na forma de vapor possui uma maior eficácia na eliminação de microrganismo, sendo assim usado como agente esterilizante.

Conforme Gurley 1985, o mecanismo de ação deste se baseia na degradação do próprio peróxido, que forma radicais livres responsáveis pela eliminação dos microrganismos. Estes radicais danificam a membrana celular e proteínas importantes para o correto funcionamento levando a morte.

Segundo Greene et al. 1993, o ozônio ataca primeiro a membrana bacteriana pelos glicolípídeos ou aminoácidos como o triptofano e atua também nos grupos sulfidrilas de certas enzimas, resultando na ruptura da atividade enzimática celular normal. A morte bacteriana é rápida e freqüentemente atribuída a mudanças na permeabilidade celular seguida pela lise celular. Entretanto a lise, provavelmente, não é por um mecanismo primário de inativação, mas consequência de uma alta concentração de oxidante. O ozônio também promove ação no material nuclear de células bacterianas pela modificação nas bases purínicas e pirimidínicas dos ácidos nucléicos.

De acordo com Korol et al. 1995, a destruição microbiana se reduz quando as formas vegetativas e os esporos estão acompanhados de substâncias orgânicas que atuam como protetoras, limitando a penetração do desinfetante, e também no caso do ozônio, porque os radicais livres formados por este elemento, reagem com as substâncias orgânicas antes de alcançar os microrganismos.

Foram desenvolvidos comercialmente equipamentos que utilizam gerador de ozônio para a esterilização, mas não como principal agente de esterilização e sim na etapa final do processo, utilizando produtos como peróxido de hidrogênio (STERRAD®) e ácido peracético (PLAZLYTE®).

O plasma de peróxido hidrogênio é indicado para esterilização de superfícies. Usa-se embalagem de polipropileno, ou poliolefina. Não pode ser utilizada embalagem de celulose pela alta absorção do peróxido por este tipo de material comprometendo o término do ciclo.

Não é recomendado para bisfenol e epoxy ou componentes feitos de polissulfonas ou poliuretano; náilon e celulose; Polimetil-metacrilato, policarbonato e vinil acetato, isso porque esses materiais podem ficar quebradiços e terem problemas de absorção. Também é contra indicado para pós, líquidos e materiais de fundo cego.

É o método indicado para artigos termossensíveis, como por exemplo, cateteres, com no mínimo um milímetro de diâmetro interno e até dois metros; artigos metálicos e de corte; equipamentos elétricos; endoscópios rígidos; equipamentos pneumáticos; e matéria orgânica (Kyi et al. 1995).

A esterilização por geração de ozônio (plasma) não possui um indicador de eficácia definido.

Deve se atentar as recomendações de uso por se tratar de um aparelho extremamente sensível. Deve ser feita: limpeza com remoção completa de resíduos orgânicos; secagem; embalagem; e selagem adequada. A temperatura de funcionamento do equipamento está em torno de 45°C. A duração do ciclo de esterilização é de aproximadamente setenta minutos.

Não requer aeração, pois não deixa resíduo tóxico. É seguro para o ambiente e para os profissionais.

O plasma de ácido peracético consiste em dois agentes ativos. O primeiro é o ácido peracético (5%) com peróxido de hidrogênio (22%), e o segundo é o ácido peracético com uma mistura de gás argônio com O₂ e H₂ do qual irá ser formado o plasma. As fases de plasma são alternadas com fases de vapor.

2.3 CONTROLE DE ESTERILIZAÇÃO

É imprescindível o controle de qualidade nos processos de esterilização. Como se trata de um processo que inclui diversas variáveis (tempo, temperatura, limpeza prévia, conhecimento detalhado do processo, etc), se qualquer uma destas variáveis for negligenciada, o processo não será efetivo e o risco de contaminação é eminente. O controle deve ser realizado através de métodos químicos e bacteriológicos.

Os métodos químicos utilizam uma fita especial que mostra, através da mudança de cor, se a temperatura desejada foi atingida. Os métodos bacteriológicos utilizam a bactéria chamada *B. subtilis*, que por ser produtora de esporos, é uma eficiente indicadora da qualidade do processo.

Este controle deve fazer parte da rotina do laboratório para garantir a saúde de pacientes e isolamento correto dos microrganismos, como também biossegurança ocupacional. Deve-se realizar o controle periódico da qualidade do processo, através de profissionais preparados para tal procedimento.

2.3.1 Indicadores

Os indicadores que demonstram a eficácia dos métodos de esterilização podem ser mecânicos, químicos e biológicos.

- Indicadores mecânicos: monitores de tempo, temperatura, pressão, relatórios impressos computadorizados.
- Indicadores biológicos: indicam que a esterilização foi efetiva através da inativação dos indicadores. Os tipos de bacilos mais utilizados são os *B. subtilis* para esterilização a baixa temperatura e *B. stearothermophilus* para esterilização a vapor.
- Indicadores químicos: são fitas, etiquetas adesivas, ou tintas impregnadas com substâncias químicas termossensíveis específicas ao vapor, que ao serem retiradas da autoclave deverão apresentar mudança de coloração. Existem diversos tipos de indicadores químicos.

2.4 DESINFECÇÃO

Este processo pode ser realizado de forma física (pasteurização) e química (desinfetantes), e pode ser classificado como sendo uma desinfecção de alto, intermediário ou de baixo nível, dependendo da quantidade de microrganismos inativados.

1. Desinfecção de alto nível: Inativa todos os microrganismos, exceto esporos. Este tipo de desinfecção é indicado para itens classificados como “semicríticos”, ou seja, que entram em contato com mucosas íntegras e pele não íntegra.

2. Desinfecção de nível intermediário: é aquela que inativa as bactérias na forma vegetativa (inclusive *Mycobacterium tuberculosis*), fungos e a maioria dos vírus. É indicada para uso em itens classificados como “não-críticos”, ou seja, aqueles materiais que entram em contato apenas com a pele íntegra. (por exemplo, estetoscópios, termômetros, gorro, máscara, refletor, etc).

3. Desinfecção de baixo nível: é a que inativa a maioria das bactérias na forma vegetativa, exceto *M. tuberculosis*, alguns fungos e vírus. É indicada também para itens de uso “não-crítico”.

3 FÍSICA DO PLASMA

Neste capítulo apresentaremos conceitos básicos sobre a física do plasma, que serão importantes no processo de esterilização estudado. Estudo baseado principalmente em Chen 2006, Goldston e Rutherford 1995, Ichimaro 1980.

3.1 INTRODUÇÃO

Plasmas são comumente descritos como o “quarto estado da matéria”, com os outros três primeiros sendo os estados sólido, líquido e gasoso. Na realidade, embora essa definição não seja muito adequada, pois a passagem de um gás para a forma de plasma não ocorre através de uma “transição de fase” bem definida, como nas transições do estado sólido para líquido e deste para gás, certamente o plasma pode ser considerado um estado distinto da matéria, caracterizado por possuir um número de partículas eletricamente carregadas suficiente para afetar suas propriedades e comportamento.

Num gás ordinário, cada átomo ou molécula contém um número igual de cargas positivas e negativas; as cargas positivas no núcleo são cercadas por um igual número de elétrons negativamente carregados, e cada partícula é eletricamente "neutra". Um gás se torna um plasma quando a adição de calor ou outra forma de energia faz com que um número significativo de seus átomos libere alguns ou todos os seus elétrons. Estes átomos que perdem elétrons ficam "ionizados", ou seja, com uma carga positiva resultante, e os elétrons separados de seus átomos ficam livres para se mover pelo gás, interagindo com outros átomos e elétrons. Neste caso se diz que também o gás se torna um gás ionizado. Quando o número de átomos ionizados é relativamente pequeno, a interação entre as partículas carregadas do gás ionizado é dominada por processos colisionais, ou seja, que envolvem principalmente colisões binárias entre elas, como em um gás neutro. Quando o número de partículas carregadas é substancial, a

interação entre as partículas carregadas é dominada por processos coletivos, ou seja, a dinâmica de cada uma delas é determinada, em primeiro lugar, pelos campos elétricos e magnéticos produzidos por todas as outras partículas carregadas do meio. Neste caso, o gás ionizado passa a ser denominado plasma. Na Figura 3.1 podemos observar que essa transição de um gás de átomos neutros e em seguida um gás de íons e elétrons livres (plasma).

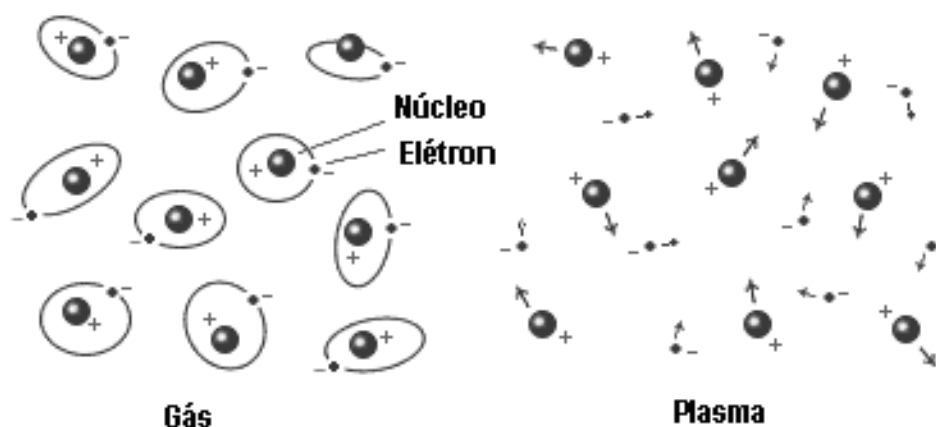


Figura 3.1 – Matéria no estado gasoso e no estado de plasma.

3.2 CONCEITOS BÁSICOS DE IONIZAÇÃO

Todos os gases à temperatura ambiente são constituídos por moléculas ou átomos, isto é, por partículas eletricamente neutras. Considerando uma colisão entre duas partículas de um gás, se a energia cinética do movimento relativo das partículas é maior do que a energia de ionização, $kT > E_{\text{ion}}$, pode acontecer que uma das partículas fica ionizada após a colisão, conforme a equação:



Dessa maneira, pode acontecer que neste gás estejam presentes não apenas moléculas ou átomos (partículas neutras), mas também íons e elétrons (partículas

carregadas). A quantidade de partículas carregadas depende do número de colisões com $kT > E_{\text{ion}}$, e este número depende da quantidade de partículas rápidas. À temperatura ambiente, partículas rápidas são muito raras, portanto o número de colisões descritas pela equação 3.1 é extremamente pequeno. Observamos isso no fato de todos os gases à temperatura ambiente serem constituídos apenas por moléculas ou átomos. Íons e elétrons estão praticamente ausentes. Por exemplo, o ar em uma sala é constituído pelas moléculas N_2 e O_2 . Quanto maior a temperatura, maior é o número de partículas rápidas, e maior é o número de colisões com ionização, e maior é o número de partículas carregadas.

Podemos definir o grau de ionização, α , como

$$\alpha = \frac{n_e}{n_i + n_a} \quad (3.2)$$

A temperaturas elevadas, átomos podem perder não apenas um elétron, mas dois, três, ou mais, dependendo da temperatura. Na equação 3.2, onde n_a é a densidade da espécie atômica, n_e é a densidade de elétrons, n_i significa a densidade de todos os íons $n_i = n_+ + n_{++} + \dots$, e x são as frações dos íons simplesmente, duplamente, e triplamente ionizados, onde:

$$x_+ = \frac{n_+}{n_i}$$

$$x_{++} = \frac{n_{++}}{n_i}$$

$$x_{+++} = \frac{n_{+++}}{n_i}$$

Ionização pode acontecer não apenas nas colisões entre partículas neutras, como na exemplificada pela equação 3.1, mas também nas colisões entre uma partícula neutra e um elétron.



Um elétron é muito mais eficaz para a ionização do que uma partícula neutra. Isto é, para as energias iguais e superiores a E_{ion} , a probabilidade de ionização pelo impacto de um elétron é muito maior. Por isso, o mecanismo de ionização é usualmente o seguinte: os elétrons iniciais são produzidos através da reação descrita pela equação 3.1. Depois cada um deles cria mais um elétron através da reação descrita pela equação 3.3 e o número de elétrons duplica-se. A seguir, o número de elétrons duplica-se mais uma vez, e assim por diante. Este mecanismo chama-se avalanche.

Um dos caminhos de criar um plasma é aquecer um gás. Tal aquecimento pode-se realizar por meio de um campo elétrico externo aplicado ao gás. A produção de calor é através do aquecimento Joule, $P = jE$. Como a corrente é produzida pelos movimentos de íons e de elétrons, $j = j_i + j_e \rightarrow P = j_i E + j_e E$. Os elétrons são muito mais leves do que os íons, $m_e \ll m_i$, então $|j_e| \gg |j_i|$ e $P \approx j_e E$. Em outras palavras, a energia do campo elétrico é fornecida principalmente aos elétrons. Os elétrons transferem uma parte desta energia às partículas pesadas, isto é, átomos e íons. O mecanismo de transferência é através das colisões, mas a troca de energia numa colisão é pouca, devido à desigualdade das massas, $m_e \ll m_i$.

Existem duas possibilidades de criação de plasma:

1. A pressão é alta, colisões entre elétrons e partículas pesadas são muitas, a temperatura dos elétrons é aproximadamente igual à das partículas pesadas, ou seja, $T_e \approx T_{\text{pesadas}}$.

2. A pressão é baixa ou intermediária, e a temperatura dos elétrons é maior que das partículas pesadas, $T_e > T_{\text{pesadas}}$.

O plasma criado através da primeira maneira chama-se plasma térmico. Todas as partículas neste plasma estão em equilíbrio térmico: $T_e \approx T_i \approx T_{\text{neutro}}$. Em muitos casos, este plasma está também em equilíbrio químico, onde todas as reações estão em

equilíbrio, em particular a reação de ionização, descrita pela equação 3.3, está equilibrada pela reação inversa (de recombinação).



Os aparelhos para geração do plasma térmico são chamados de aquecedores de arco (tochas de arco, ou plasmatron). Eles são usados para o processamento de materiais, metalurgia, processos químicos, tratamento de detritos perigosos, entre outros.

O plasma criado através da segunda maneira é de não-equilíbrio. Neste plasma os elétrons estão quentes e as partículas pesadas (átomos, moléculas e íons) estão frias. Por exemplo, plasma em lâmpadas luminescentes.

Ionização pode ser produzida não apenas em colisões entre partículas do plasma, mas também por uma radiação externa ao gás. Por exemplo, cada centímetro cúbico do ar numa sala contém aproximadamente dez íons, produzidos por raios cósmicos, que é pouco, não se pode falar em plasma. Mas se a radiação for mais forte (por exemplo, raios X da alta intensidade, ou uma radiação de um reator nuclear), plasma pode ser produzido. Tal plasma também é de não-equilíbrio.

3.3 DEFINIÇÃO DE PLASMA

O plasma pode ser definido como um gás ionizado que contém uma mistura de elétrons livres, íons e átomos neutros em proporções variadas que exibem um comportamento coletivo provocado pelas forças de Coulomb de grande alcance.

O termo plasma foi utilizado na física pela primeira vez pelo físico americano, Irving Langmuir no ano de 1928, quando estudava descargas elétricas em gases. A palavra plasma oriunda do grego, que designa um material moldável, vem da medicina onde é utilizada para apontar perturbação ou estado não distinguível.

Mais tarde, a definição foi estendida para definir o estado da matéria onde átomos e/ou moléculas estão parcialmente ou totalmente ionizados, sendo que as cargas apresentam um comportamento coletivo devido às interações Coulombianas. O grau de ionização do plasma pode variar muito, dependendo da forma de obtenção bem como de sua aplicabilidade.

Nem todas as substâncias que contêm partículas carregadas podem ser classificadas como plasma. Para que uma certa coleção de partículas carregadas e neutras interagindo entre si apresente o comportamento coletivo de plasma é necessário que ela satisfaça certos critérios como neutralidade macroscópica e a blindagem de Debye.

Três principais fenômenos caracterizam a matéria no estado de plasma (veja Figura 3.2): emissão de radiação eletromagnética, blindagem do campo elétrico das cargas e oscilações coletivas devido às forças coulombianas.

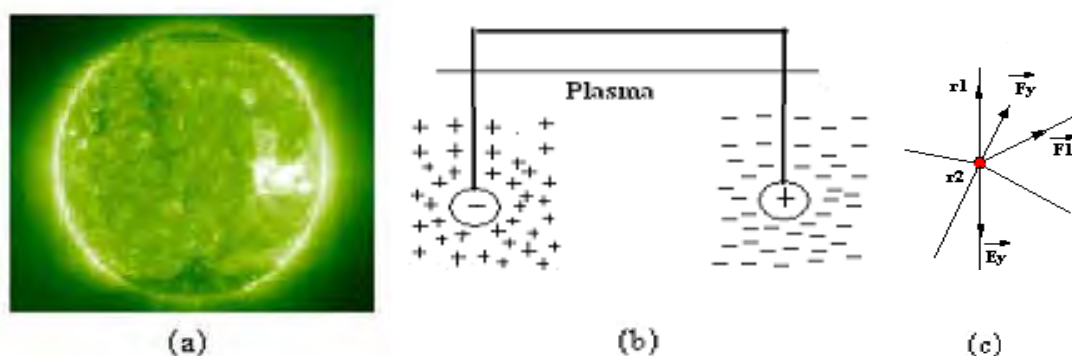


Figura 3.2 – (a) Sol emitindo radiação eletromagnética na faixa do ultravioleta distante
 (b) Efeito de blindagem de potenciais elétricos em plasmas,
 (c) Resultante da força elétrica devido às várias n partículas carregadas numa dada carga A
 (Figura obtida em Chen et al. 2006)

3.3.1 Neutralidade macroscópica

Na ausência de perturbações externas a quase neutralidade macroscópica é característica fundamental do conceito plasma. Isso quer dizer que em condições de equilíbrio (sem forças externas presentes), num volume de plasma suficientemente

grande para conter um número elevado de partículas, mas suficientemente pequeno comparado com o comprimento característico de variação dos parâmetros macroscópicos, tais como a densidade e a temperatura, a carga elétrica total é igual a zero. No interior do plasma, os campos das cargas positivas e negativas microscópicas cancelam-se entre si e a carga espacial líquida é zero para qualquer região macroscópica, ou seja:

$$n_e + \sum_i n_i = 0 \quad (3.5)$$

Onde n_e é a densidade de elétrons e n_i a densidade de íons positivos.

Os plasmas podem diferir em muitos aspectos, e com base neles é que os classificamos, como por exemplo: temperatura de elétrons e íons, densidade de elétrons e íons, comprimento de Debye, etc. Um outro parâmetro importante na descrição de um plasma é a presença de campos elétricos e/ou magnéticos.

A maioria dos plasmas estudados é do tipo gás ionizado produzidos por descargas elétricas em gases a baixa pressão.

3.3.2 Blindagem de Debye

Uma propriedade fundamental do plasma é sua habilidade de blindar qualquer potencial elétrico detectado dentro dele. Este fenômeno, conhecido como blindagem de Debye, impede a ocorrência de um campo elétrico espontaneamente no interior do plasma.

Considerando-se uma partícula do plasma, por exemplo, um íon positivo, o campo elétrico radial induz uma separação de cargas na vizinhança do mesmo, o que conduz à atração dos elétrons e a repulsão dos íons positivos. Esta separação de cargas gera um potencial V simétrico em torno do íon positivo, cujo valor é função da distância medida a partir do íon.

A concentração de íons positivos, n^+ , e elétrons, n^- , é obtida pela função distribuição de Boltzmann:

$$n^+ = n_p e^{\frac{-eV}{k_B T}} \quad (3.6)$$

$$n^- = n_p e^{\frac{eV}{k_B T}} \quad (3.7)$$

Onde k_B é a constante de Boltzmann, T a temperatura, suposta como sendo a mesma para elétrons e íons, V o potencial elétrico, n_p é a concentração de partículas carregadas no plasma, que deve ser a mesma para partículas positivas e negativas do gás, para satisfazer a condição de neutralidade macroscópica, e é a carga do elétron.

Supondo-se que a energia potencial de separação de cargas é muito menor que a energia térmica, isto é:

$$eV \ll k_B T \quad (3.8)$$

Então se pode escrever (3.6) e (3.7) da seguinte forma:

$$n^+ = n_p \left(1 - \frac{eV}{k_B T} \right) \quad (3.9)$$

$$n^- = n_p \left(1 + \frac{eV}{k_B T} \right) \quad (3.10)$$

Um parâmetro físico importante para a descrição do plasma é o comprimento de Debye. Da equação de Poisson, tem-se:

$$\nabla^2 V = -\frac{\rho}{\epsilon_0} \quad (3.11)$$

onde ρ é a densidade de carga e ϵ_0 a permissividade elétrica do meio.

Como se tem simetria esférica a partir do centro do íon positivo, pode-se usar coordenadas esféricas. Portanto, a equação (3.11) é reescrita como:

$$\frac{\partial^2 V(r)}{\partial r^2} + \frac{2\partial V(r)}{r\partial r} = -\frac{\rho}{\epsilon_0} \quad (3.12)$$

Considerando-se somente uma espécie de íons, tem-se:

$$\rho = e(n^+ - n^-) \quad (3.13)$$

Substituindo as equações (3.9) e (3.10) na equação (3.13):

$$\rho = 2n_p \frac{eV}{kT} \quad (3.14)$$

Substituindo (3.14) em (3.12) tem-se:

$$\frac{\partial^2 V(r)}{\partial r^2} + \frac{2\partial V(r)}{r\partial r} = 2n_p \frac{eV}{\epsilon_0 kT} \quad (3.15)$$

Resolvendo a equação (3.15), com a condição de $V = 0$ para $r \rightarrow \infty$, tem-se:

$$V = -\frac{e}{4\pi\epsilon_0 r} \exp\left[-r\left(\frac{n_p e^2}{\epsilon_0 kT}\right)^{\frac{1}{2}}\right] \quad (3.16)$$

Nota-se que quando $r \rightarrow 0$, o potencial se aproxima de $e/4\pi\epsilon_0 r$, que é o potencial de uma carga puntiforme não blindada. Define-se o comprimento de Debye λ_d , como:

$$\lambda_d = \left(\frac{\epsilon_0 k_B T_e}{n_e e^2}\right)^{\frac{1}{2}} \quad (3.17)$$

Tem-se:

$$V = -\frac{e}{4\pi\epsilon_0 r} \exp\left(-\frac{r}{\lambda_d}\right) \quad (3.18)$$

O comprimento de Debye estabelece a distância abaixo da qual, a influência do campo elétrico de uma partícula carregada, é sentida pelas outras partículas do plasma.

Na distância acima do valor do comprimento de Debye, ocorre uma blindagem de campos eletrostáticos de uma partícula carregada em relação às demais. O comprimento de Debye, além de ser uma escala de distância, na qual, ocorre blindagem de campos eletrostáticos, também define uma distância acima da qual, as flutuações do potencial elétrico podem aparecer em um plasma. Este potencial é devido à conversão de energia cinética térmica das partículas em energia potencial eletrostática e vice-versa.

Define-se uma esfera de raio λ_d , ou esfera de Debye, onde os campos eletrostáticos originados fora dela, não contribuem significativamente para o campo

elétrico existente no seu interior. Conseqüentemente, cada carga do plasma interage somente com cargas que permanecem dentro de sua esfera de Debye.

O número de elétrons N_d , dentro da esfera de Debye é dado por:

$$N_d = \frac{4\pi}{3} \left(\frac{\epsilon_0 kT}{n_e^{\frac{1}{3}} e^2} \right)^{\frac{3}{2}} \quad (3.19)$$

Uma das condições para existência do plasma, é que a dimensão física do sistema, L , seja muito grande comparada com comprimento de Debye, ou:

$$L \gg \lambda_d$$

Uma outra condição resulta do efeito de blindagem dentro da esfera de Debye. O número de elétrons no interior da esfera de Debye é muito grande:

$$n_e \lambda_d^3 \gg 1$$

Existem vários processos de obtenção de um plasma dependendo das características exigidas em cada aplicação, como por exemplo, os plasmas produzidos por descargas elétricas.

Dentro dos tipos de descargas o mais usual é a descarga luminescente ou descarga “glow”. Esta é obtida pela aplicação ao gás, em pressão baixa, de tensões de corrente contínuas (cc) ou correntes alternadas (ac) ou ainda de radiofrequência (RF) ou microondas, dependendo das aplicações desejadas. A tensão pode ser aplicada entre eletrodos internos, externos ou em uma bobina colocada ao redor do reator.

3.3.3 Frequência do plasma

Outra propriedade importante do plasma é a estabilidade de sua neutralidade macroscópica. Quando um plasma é instantaneamente perturbado do seu estado de equilíbrio, o campo elétrico resultante das cargas espaciais internos provoca um movimento coletivo das partículas carregadas que tende a restaurar a neutralidade inicial do plasma. Esse movimento coletivo é caracterizado por uma frequência natural de oscilação conhecida como a frequência do plasma. O período desta oscilação

natural constitui uma escala de tempo significativa com o qual pode ser comparado o mecanismo dissipativo tendendo a destruir o movimento coletivo dos elétrons. A frequência de oscilação eletrônica do plasma é dada pela expressão:

$$\omega_{pe} = \left(\frac{n_e e^2}{\epsilon_0 m_e} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (3.20)$$

Onde m_e é a massa do elétron.

Para garantir a existência desta oscilação é necessário que o tempo de colisões entre a partícula carregada e a neutra seja superior ao período de oscilação do plasma. Assim devemos ter uma densidade de partículas neutras limitada para garantir que estas colisões sejam infreqüentes.

3.4 TIPOS DE PLASMA

Os plasmas são categorizados como naturais ou de laboratório, e cobrem uma grande faixa de temperatura e pressão.

Como exemplos de plasmas naturais citam-se corona solar, nebulosas, vento solar, aurora boreal, descarga elétrica atmosférica, centro do Sol, ionosfera terrestre.

Com relação aos plasmas de laboratório, basicamente podem ser estabelecidas duas subcategorias: plasmas térmicos (em equilíbrio termodinâmico local) e plasmas frios (de não equilíbrio).

A Figura 3.3 mostra a influência da pressão na transição de uma descarga luminescente com temperaturas iônicas e eletrônicas diferentes ($T_e > T_h$) para uma descarga de arco.

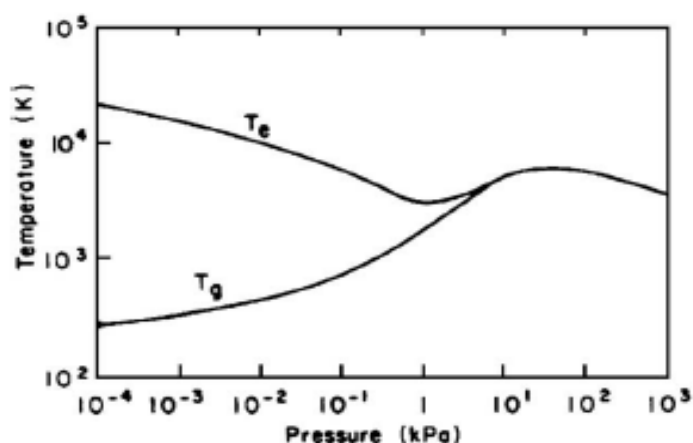


Figura 3.3 – Evolução da temperatura do plasma (elétrons e partículas pesadas) com a pressão, em um arco de plasma de mercúrio.

Plasma de baixa pressão (10^{-4} a 10^{-2} kPa) geralmente não está em equilíbrio térmico. A temperatura das partículas pesada é mais baixa que a temperatura eletrônica. As colisões não elásticas entre elétrons e partículas pesadas são excitativas ou ionizantes. Estas colisões não aumentam a temperatura das partículas pesadas.

Quando a pressão é aumentada, as colisões intensificam. Elas induzem tanto reações químicas no plasma (através de espécies altamente reativas obtidas nas colisões inelásticas), como aquecimento de partículas pesadas (através de colisões elásticas). A diferença entre T_e e T_h fica reduzida e o estado do plasma se torna mais próximo do equilíbrio, mas não o alcança.

A densidade da potência aplicada influencia muito o estado do plasma. Em geral, uma potência de alta densidade induz plasmas em equilíbrio (por exemplo, plasmas de arco) e uma potência de baixa densidade ou uma potência pulsada favorece plasmas de não equilíbrio.

Dependendo do tipo de energia aplicada e da quantidade de energia transferida ao plasma, as propriedades do plasma mudam, em termos de densidade eletrônica ou temperatura. Estes dois parâmetros distinguem os plasmas em categorias diferentes, apresentadas na Figura 3.4.

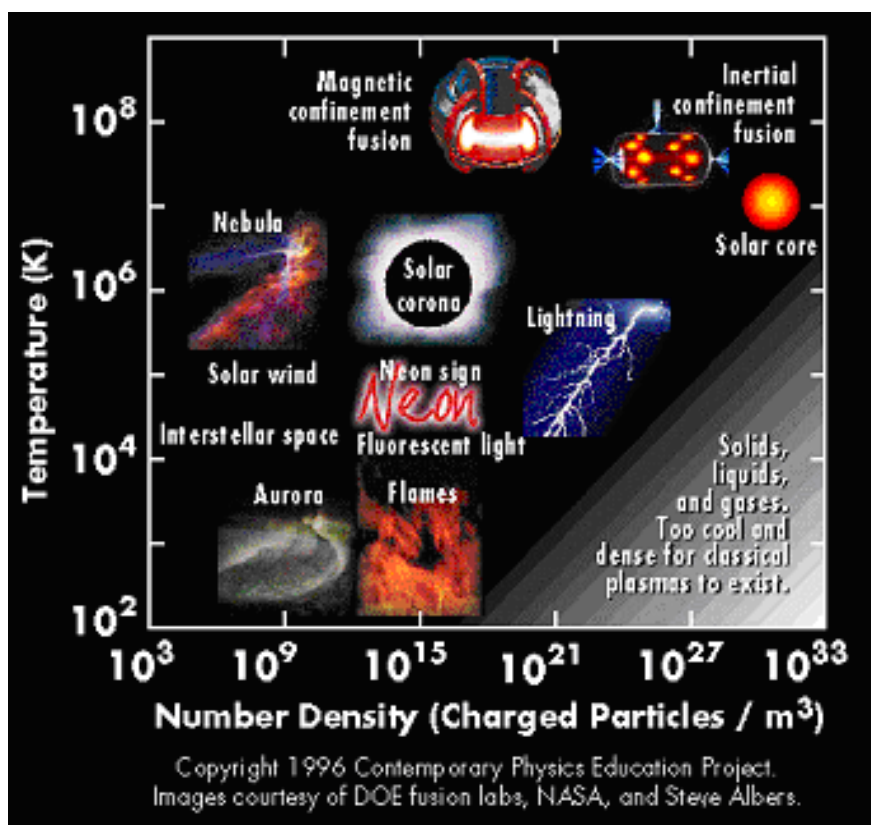


Figura 3.4 – Diagrama Temperatura-Densidade, mostrando os diferentes tipos de plasma.

3.4.1 Plasma térmico, ou plasma em equilíbrio.

O termo plasma térmico é empregado para descrever os gases que se apresentam altamente ionizados quando aquecidos a altas temperaturas (entre 5000 e 50000K), em pressões próximas à atmosférica.

Em geral são produzidos por descargas elétricas e caracteriza-se pela alta densidade (partículas na ordem de $10^{23} - 10^{28} \text{ m}^{-3}$) e pela proximidade entre as temperaturas dos elétrons e das partículas pesadas, isto é, o estado termodinâmico do plasma aproxima-se do equilíbrio termodinâmico local. Apresentam colisões inelásticas entre os elétrons e as partículas pesadas criando um plasma de espécies reativas, onde colisões elásticas aquecem as partículas pesadas.

Exemplos típicos de plasma térmicos são aqueles gerados por arcos voltaicos transferidos, por tochas de plasma.

O plasma térmico é aplicado na indústria para corte de metais, soldagem, produção de aços especiais e de metais refratários, reciclagem de alumínio, deposição de partículas em substratos, deposição de vapor químico, fusão de vidro, aquecimento de produtos, tratamento de lixo hospitalar, destruição de materiais tóxicos, entre outros.

3.4.2 Plasma não térmico, ou plasma de não equilíbrio.

São plasmas caracterizados pela grande diferença de temperatura dos elétrons e das partículas pesadas, e pela baixa densidade de elétrons (número de partículas menor que 10^{20}m^{-3}). Apresentam colisões inelásticas entre os elétrons e as partículas pesadas induzindo um plasma reativo. Partículas pesadas são ligeiramente aquecidas por algumas colisões elásticas.

São produzidos em laboratório por descargas elétricas, como coronas dc, coronas pulsadas, microondas, centelhas transitórias, micro descargas em DBD.

3.5 PLASMA EM PRESSÃO ATMOSFÉRICA

Segundo Laurossi et al. 2001, plasmas em pressão atmosférica receberam mais atenção recentemente em várias aplicações modernas, como modificações de superfície de polímero, desinfecção biológica e química de meios, por que eles possuem muitas vantagens, como: baixo custo; fácil implantação; não necessidade de câmara, o que possibilita o tratamento de materiais de grandes volumes; entre outras.

Por isso, nosso trabalho focaliza-se nesse tipo de plasma, em especial o gerado por descarga com barreira dielétrica (DBD).

3.5.1 Jato de plasma

O jato de plasma de pressão atmosférica (APPJ) é um dispositivo acoplado a um capacitor que consiste em dois eletrodos coaxiais entre os quais um gás (hélio) flui em altas taxas. O eletrodo central é excitado por rádio frequência (RF) com frequência de megahertz. Os elétrons livres estão acelerados pelo campo da RF e entram em colisões com as moléculas do gás. Estas colisões não elásticas são muito eficientes em produzir várias espécies reativas (átomos excitados e moléculas, os radicais livres). As espécies reativas podem reagir então com uma superfície colocada em proximidade do bocal.

Um jato de plasma atmosférico pode ser dividido em duas zonas: uma zona central de plasma em equilíbrio, e uma zona periférica de não equilíbrio. Nesta região, a temperatura das partículas pesadas é muito mais baixa que a dos elétrons.

Por exemplo, para um arco de argônio, operando com pressão de 300 kPa, corrente de 300 a 400 A, pode-se chegar a um estado de equilíbrio na porção central. Estas condições conduzem a uma densidade de elétron de 10^{24}m^{-3} no centro.

3.5.2 Descarga Corona

A descarga corona é um tipo de descarga elétrica que ocorre muito próximo ou na pressão atmosférica, entre dois eletrodos com áreas e/ou formas diferentes e é caracterizada pelo consumo relativamente baixo da energia elétrica. A corona é gerada por um campo elétrico intenso associado com pequenas agulhas, fios ou pontas de um eletrodo. Uma característica fundamental da descarga corona é que a temperatura dos elétrons, T_e , do plasma ($T_e > 1 \text{eV}$) é muito maior do que a temperatura ambiente do gás ($T \sim 0,025 \text{eV}$). Os elétrons energéticos da descarga induzem excitação, ionização e dissociação das moléculas, introduzindo ao mesmo tempo grande número de radicais ativos que estimulam reações químicas diversas. Existem vários tipos de descargas coronas em função da forma, da geometria e da configuração dos eletrodos utilizados, bem como da polaridade e do tipo da tensão aplicada continua ou alternada.

Esse tipo de descarga tem sido usado para tratamento de materiais e controle da poluição atmosférica.

3.5.3 Descarga com Barreira Dielétrica (DBD)

A descarga com barreira dielétrica (DBD), ou simplesmente descarga com barreira, já é conhecida por mais de um século. Essa descarga é proveniente de uma alta tensão alternada (geralmente alta voltagem entre 5 a 15 kV e frequência de 60 a 10^5 Hz) aplicada entre dois eletrodos, sendo que o espaço entre eles é parcialmente preenchido com um meio dielétrico. As primeiras investigações experimentais foram relatadas por Werner Von Siemens em 1857. Foi ele quem propôs o nome de “descarga silenciosa”, termo que ainda é muito utilizado nas literaturas inglesa, alemã e francesa.

O esquema típico de um reator de descarga DBD é mostrado na Figura 3.5.

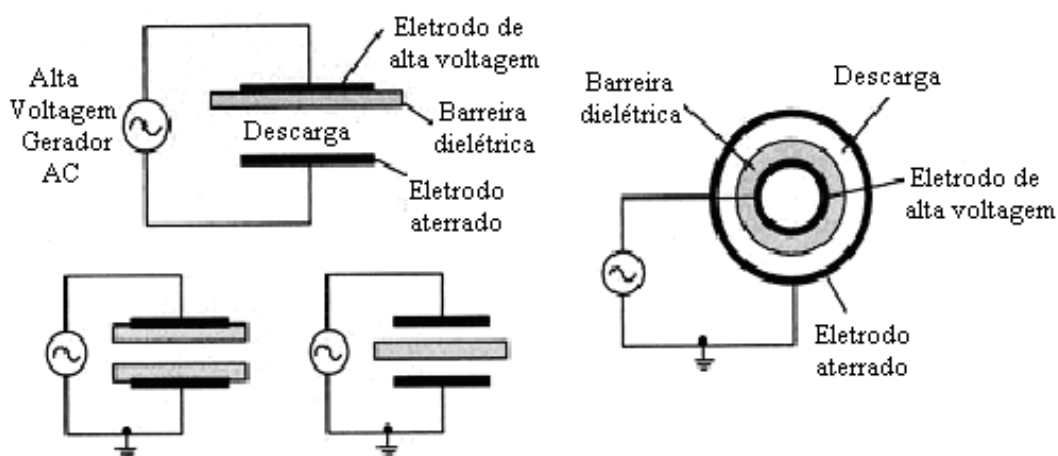


Figura 3.5 - Configurações diferentes de reator com descarga DBD.

Como consequência da presença de pelo menos uma barreira dielétrica, esta descarga requer voltagem alternada para sua operação. A descarga DBD pode ser obtida em frequências entre 60 Hz até centenas de kHz e com formas diferentes da tensão aplicada (tensão senoidal, pulsos retangulares ou com forma especial). Para aplicações na indústria é preferida tensão senoidal com frequência entre 50 Hz e 500

kHz. Basicamente existem dois modos diferentes de operação da descarga silenciosa: descarga com múltiplos filamentos ou micro-descargas que é mais comum e descarga DBD difusa.

Normalmente a descarga DBD é operada no modo com filamentos que ocorre em frequências mais baixas (menos de kHz). A alta tensão alternada (entre 5 e 20 kV) de um transformador elevador é aplicada entre dois eletrodos metálicos. Entre os eletrodos é colocada uma camada fina de dielétrico (vidro, quartzo ou cerâmica). O dielétrico pode cobrir um ou os dois eletrodos do reator. Existem duas configurações típicas deste reator, em geometria plana e geometria cilíndrica. A consequência da presença do dielétrico entre as placas de DBD é que o reator pode funcionar somente com alta tensão alternada. Se o campo elétrico entre o dielétrico e o eletrodo livre é suficientemente grande dentro do espaço vazio do reator iniciará uma descarga elétrica. As formas típicas da voltagem e da corrente da descarga DBD são mostradas na Figura 3.6. Os resultados foram obtidos no reator experimental desenvolvido para esterilização de microrganismos sobre uma placa de microtitulação, no Laboratório de Plasma, FEG, UNESP.

Observa-se que a corrente da descarga, apresentada por conjuntos de picos com duração muito curta, flui somente quanto existe variação da tensão aplicada. O plasma da descarga é constituído por várias micro-descargas (*filamentary discharges*) e pode ser visto na Figura 3.7.

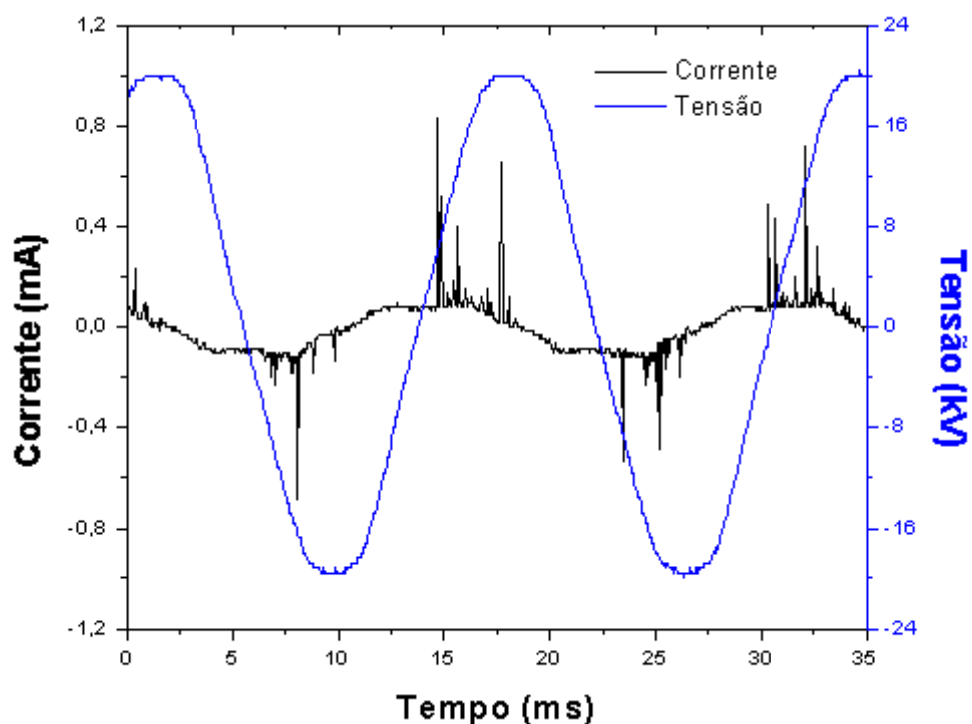


Figura 3.6 - A forma típica da corrente e da voltagem de descarga DBD obtida pelo reator de plasma que opera no laboratório de Plasma, FEG, UNESP.

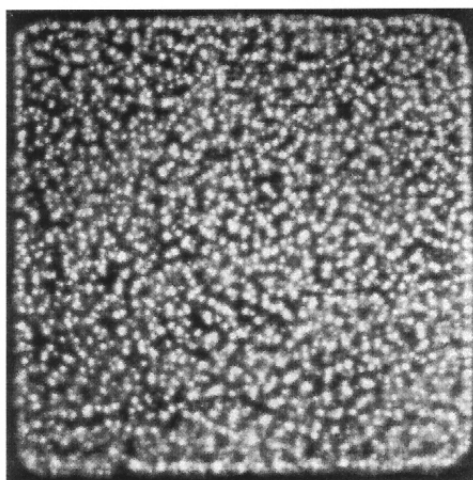


Figura 3.7 - Foto de micro-descargas em um reator de plasma com barreira dielétrica.

A constante dielétrica do material isolante e a taxa de variação da voltagem aplicada determinam a corrente de deslocamento que ultrapassa o dielétrico e deve ser igual a corrente da descarga no espaço vazio do reator. A função principal do dielétrico é limitar a corrente da descarga, desta maneira evitando a formação de arco. Para frequências muito altas (acima de um MHz) a limitação da corrente através do

dielétrico torna-se insuficiente e por isso os reatores DBD são operados em frequências moderadas.

Como pode ser visto na Figura 3.6, a descarga DBD é constituída de vários picos de micro descargas, cada um com uma duração de alguns ns, é difícil medir experimentalmente a corrente e a potencia média da descarga. No caso de correntes alternadas um método simples e bastante eficaz para medir a potência média dissipada e a defasagem entre a corrente e a tensão é através da figura de Lissajous (Fig. 3.8). Ao invés de tentar medir a corrente de cada micro-descarga individual é melhor medir a corrente integrada no tempo. Usa-se a carga acumulada sobre um capacitor ligado em série ao reator que é proporcional a corrente média que flui no circuito. Então a figura de Lissajous observada no osciloscópio é formada pela superposição de dois sinais: a voltagem aplicada no reator de plasma com descarga DBD e a tensão nos terminais do capacitor que é proporcional à carga acumulada sobre as placas do capacitor. A área compreendida pela figura de Lissajous representa a energia consumida durante um período. Então, quanto maior for esta área maior será a potência média dissipada. (veja APÊNDICE A)

A inclinação dos lados do paralelogramo da figura de Lissajous apresenta a capacitância equivalente do reator.

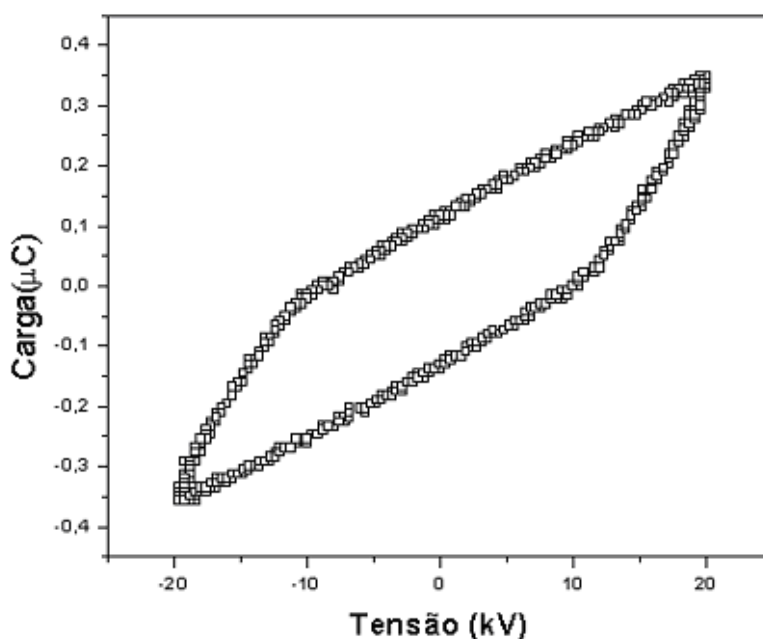


Figura 3.8 - Figura de Lissajous para o reator de plasma aplicado sobre uma placa de microtitulação do laboratório de Plasma, FEG, UNESP.

Quando a descarga silenciosa é operada sob condições especiais, geralmente em frequências mais altas (dezenas de kHz) e pressão igual ou um pouco abaixo da pressão atmosférica em alguns gases tais como He, Ar, N₂, ela pode transformar-se para o modo difuso (*atmospheric glow discharge*). Esse modo de operação é caracterizado por uma melhor uniformidade do plasma e, portanto, é muito mais vantajoso para tratamento e esterilização de materiais. Porém, a descarga em modo difuso é instável e por isso difícil de ser controlada. Somente pequenas oscilações dos parâmetros da descarga são suficientes para ela retornar ao modo normal de operação com múltiplas micro-descargas. Portanto, para operar em modo difuso de descarga DBD é preciso utilizar um gerador de tensão alternada bastante estável com frequência de operação variável que geralmente não é possível em escala industrial.

3.5.3.1 Aplicações da descarga DBD

Como foi dito anteriormente, a descarga DBD ocorre próximo ou na pressão atmosférica e é capaz de produzir um plasma não-térmico em grande volume, um fato que pode ser usado em diversas aplicações tecnológicas tais como:

- a) Desenvolvimento de novas fontes de luz como, por exemplo, *excimer* lasers, novas lâmpadas fluorescentes e telas de plasma. Quando uma descarga DBD opera em atmosfera de gases nobres ou mistura de gases nobres com halogênios, é gerada intensa radiação ultravioleta UV. Então essa descarga é uma fonte eficiente e barata de luz UV que tem importantes aplicações tecnológicas. Se, um material fluorescente, como o fósforo é usado, a luz UV proveniente da descarga DBD poderá ser transformada em luz visível. Neste princípio operam as novas lâmpadas para iluminação baseadas na descarga DBD, que são muito mais eficientes e econômicas do que as lâmpadas incandescentes.
- b) Geração de ozônio que obtém aplicação para esterilização de material hospitalar, tratamento de águas residuais provenientes das indústrias, desinfecção de material biológico etc. Uma das aplicações mais importantes das

descargas silenciosas é a da produção de O_3 . Em atmosfera de oxigênio ou ar uma descarga DBD, que tem duração de apenas alguns minutos, é capaz de produzir grande quantidade de Ozônio.

- c) Reatores de plasma para controle de poluição atmosférica (gases, vapores e partículas). Aplicação de descarga DBD para controle de gases poluentes (NO_x , SO_x , hidrocarbonos) e para a destruição de componentes venenosos (VOCs, C_2F_6 , NF_3) recebem atenção significativa nos últimos anos. A vantagem desta técnica baseada na descarga DBD é que durante o processo é possível realizar a decomposição de diversos componentes simultaneamente com grande eficiência de remoção.
- d) Tratamentos a plasma são freqüentemente usados para modificar as propriedades da superfície de vários polímeros. Algumas propriedades importantes para as aplicações tecnológicas dos polímeros são a adesão, hidrofobicidade, hidrofilicidade, oleofobicidade. Elas basicamente determinam como a superfície de um polímero irá reagir com água, óleo ou outro reagente. Estudos mostram que o tratamento de polímeros com descarga DBD pode alterar significativamente estas propriedades. A descarga silenciosa pode ser usada para a deposição de filmes poliméricos, para a alteração da rugosidade da superfície de diferentes materiais e também para limpeza e ativação da superfície de diversos polímeros tais como polipropileno, poliamida, polietileno e outros. Tratamento de polímeros com descarga DBD, por alguns minutos, pode aumentar significativamente a energia superficial.
- e) A descarga DBD tem se mostrado importante no tratamento de madeira a plasma, que modifica o ângulo de contato da superfície e a madeira torna-se mais impermeável para água. Descarga DBD pode ser usada também para tratamento de tecidos, na área biomédica para esterilização e na biologia para o controle de insetos.
- f) Tratamento e esterilização de materiais com descarga silenciosa são aplicações mais recentes da descarga DBD com grande relevância para indústria e são os objetivos principais do presente projeto de pesquisa.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo iremos mostrar o que tem sido estudado sobre esterilização usando plasma.

4.1 COMPARAÇÃO ENTRE TIPOS DE DESCARGA UTILIZADAS NA ESTERILIZAÇÃO

4.1.1 Esterilização pelo uso de descarga corona

Siemens, em 1857, foi o primeiro a sugerir o uso de uma descarga corona para gerar ozônio para desinfetar suprimentos de água. Este foi o primeiro uso registrado de plasma para a inativação de microrganismos.

Garate et al. 1998 usou uma descarga corona, com gás inerte como o hélio e argônio, para destruir concentrações de até 10^{10} células/ml de *Escherichia coli*, e esporos de *B. subtilis* em menos de 15 minutos.

4.1.2 Esterilização pelo uso de descarga glow (ou de brilho) em pressão atmosférica

Laroussi et al. 1996 mostrou que pode ser usada descarga glow à pressão atmosférica para destruir células de *Pseudomonas fluorescens*. Ele usou suspensões das bactérias em placas de Petri colocadas em um eletrodo coberto com dielétrico. Os eletrodos foram colocados dentro de uma câmara com uma mistura de gases (principalmente hélio). Ele obteve destruição completa de concentrações de 10^6 células/ml em menos de 10 minutos.

4.1.3 Esterilização pelo uso de jato de plasma à pressão atmosférica (APPJ)

Herrmann et al. 1999 usou o APPJ para inativar esporos de *Bacillus globigii*. Ele constatou que houve redução de sete ordens de grandeza na concentração original de *B. globigii* em aproximadamente 30 segundos.

Brandenburg et al. 2007 realizou experimentos com jato de plasma de argônio excitado por RF, e também com descarga propagada por microondas, para tratar instrumentos médicos. Eles testaram esporos de *B. atrophaeus*, *S. aureus*, e *E. coli*, e observaram que para ambas as fontes, a esterilização dos materiais testados foi eficiente.

4.1.4 Esterilização pelo uso de descarga de barreira resistiva

Richardson et al. 2000 e Laroussi et al. 2001 observaram uma redução de quatro ordens de grandeza na concentração original de *B. subtilis* em aproximadamente 10 minutos. Eles também observaram que RBD inativa os esporos de *B. subtilis*, mas não tão efetivamente quanto as células vegetativas. Nestas experiências, eles usaram uma mistura de gás de 97% e 3% de hélio e oxigênio, respectivamente.

Alexeef et al. 2007, tratou superfícies contaminadas com suspensões de *E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*, e bacteriófago λ -fago, usando uma descarga de barreira resistiva em pressão atmosférica. Ele observou que nos primeiros dez minutos de tratamento ocorreu a esterilização da superfície. A esterilização foi bem mais rápida com o acréscimo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), já que em apenas um minuto houve esterilização completa de *E. coli*, e de λ -fago em cinco minutos. Eles construíram um gerador de plasma por descarga com barreira resistiva em pressão atmosférica com volume relativamente grande. Foi gerada uma alta tensão dc de 30kV, e frequência de 60Hz. Eles também realizaram teste com gás nitrogênio e com filtro elétrico, podendo observar assim que a esterilização ocorre pela combinação de tais processos e pelos produtos de oxigênio gerados, como ozônio.

4.1.5 Esterilização pelo uso de descarga com barreira dielétrica

Segundo Kanasawa et al. 1998, a descarga com barreira dielétrica (DBD) tem sido muito estudada para processos de geração de ozônio, e também tem sido aplicada em modificação de superfície, controle de poluição, excitação de lasers de CO₂, entre outras aplicações.

Xingmin et al. 2006 mostrou, pelo método de descarga com barreira dielétrica, que técnicas de esterilização por plasma estão em rápido desenvolvimento, visto ser um método efetivo, simples, rápido e sem resíduos tóxicos. Em seus experimentos, ele usou microrganismos na forma vegetativa, *Staphylococcus aureus* (representando bactérias Gram positivas) e *E. coli* (representando bactérias Gram negativas), e na forma de esporo, *B. subtilis var niger*. Esses microrganismos em suspensão foram semeados sobre lamínulas de acrílico e tratados com plasma gerado por DBD, com quatro tempos de exposição diferente 30, 60, 90 e 120 segundos. Observou-se, através da curva de sobrevivência, que a forma vegetativa era mais suscetível ao efeito de inativação que o esporo. Comparando as duas formas vegetativas empregadas em seu experimento, Xingmin et al. 2006, notou que *E. coli* é mais suscetível ao efeito de inativação que *S. aureus* porque tem estrutura peptídeo glicólica mais fina. Isso porque o plasma induzido por DBD destrói a estrutura exterior das bactérias.

4.2 CINÉTICA QUÍMICA DA DESCARGA DE PLASMA

Segundo Gaunt et al. 2006, as propriedades químicas das descargas de plasmas não térmicas são determinadas através de colisões entre elétrons e outros componentes do plasma.

No ar, reações químicas são principalmente iniciadas pelo impacto de elétrons com oxigênio e nitrogênio. Assim, entre os produtos básicos destas colisões estão o

oxigênio atômico, o oxigênio metastável e o nitrogênio, com colisões reativas subsequentes que produzem uma mistura de espécies neutras e iônicas.

Descargas em pressão atmosféricas diferem das descargas de baixa pressão pelas espécies neutras reativas como oxigênio atômico, oxigênio singlet, e ozônio, ao invés de íons.

Além disso, existem reações de superfície, quando se considera exposição de amostras biológicas, que está relacionado ao dano oxidativo causado por descargas de gás à pressão atmosférica em ar ou a presença de oxigênio. As espécies reativas mais significativas são ozônio (O_3), oxigênio atômico (O), íon metaestável (O^*), superóxidos ($O_2^{\cdot-}$), peróxidos (O_2^{-2} ou H_2O_2), e radicais de hidroxila (OH^*).

A Tabela 4.1 resume as densidades típicas de algum íon e espécies carregadas em vários dispositivos de plasma, segundo dados obtidos por Gaunt et al. 2006.

Tabela 4.1 – Densidades típicas dos íons e átomos de oxigênio, de ozônio e espécies carregadas nas descargas de plasmas.

Fonte	Densidades Típicas (cm^{-3})			
	$O^+ + O^{*-} + O_2^{\cdot-}$	O	O_3	Espécies carregadas
Descarga em baixa pressão	10^{10}	10^{14}	$<10^{10}$	10^8-10^{13}
Arco	10^{15}	10^{18}	$<10^{10}$	$10^{16}-10^{19}$
Corona	10^{10}	10^{12}	10^{18}	10^9-10^{13}
DBD	10^{10}	10^{12}	10^{18}	$10^{12}-10^{15}$
Tocha de Plasma	10^{12}	10^{16}	10^{16}	$10^{11}-10^{12}$

Em descarga corona e DBD, ozônio é o produto principal da reação, enquanto em outras fontes de plasma, átomos de oxigênio representam uma proporção maior das espécies reativas. Nas descargas DBD, as espécies de oxigênio carregadas são rapidamente extinguidas dentro micro ou milissegundos.

Radicais de hidroxila são espécies altamente reativas formada pelas descargas, que podem causar dano significativo à maioria das moléculas biológicas. A presença de vapor de água em um gás usado na descarga resulta na formação de hidroxila por dissociação da molécula de H_2O por impacto eletrônico e por reações eletrônicas de átomos de oxigênio excitados e moléculas de nitrogênio.

É provável que os radicais hidroxila sejam formados também durante reações na superfície da membrana dos microrganismos.

Ar seco é usado na maioria dos dispositivos de plasma, visto que o vapor de água reduz o número de microdescargas, e assim o volume de plasma. Por exemplo, uma descarga glow é operada com menos de 14% de umidade relativa para se obter uma descarga uniforme, segundo Gaunt et al. 2006.

A presença de superóxidos é de difícil detecção, visto que tem vida curta e não fica acumulado. Sua presença em ar ionizado é assumida mais freqüente quando peróxido de hidrogênio é encontrado. Esse radical pode ser gerado pela combinação de um elétron com uma molécula de oxigênio, e sua química pode envolver reação iônica com água de agrupamentos hidratados. Decomposição espontânea acontece por uma reação denominada desmutação.

Peróxidos de hidrogênio é um produto da ionização do ar na presença de água ou vapor de água, e é gerado pela maioria das ionizações. Também pode ser formado na superfície de células na presença de íons no ar.

4.3 CINÉTICA DO PROCESSO DE INATIVAÇÃO DE BACTÉRIAS

Um parâmetro de medida de cinética, que é extensivamente usado por pesquisadores é o chamado valor D (valor Decimal). O valor D é o tempo exigido para reduzir uma concentração original de microrganismos em 90%. Neste caso, o valor D é expresso em unidade de tempo.

Outro parâmetro que é de grande importância para sistemas práticos é o fator de inativação (IF). O IF é a porcentagem de morte de uma população microbiana por um tratamento particular, que depende da contagem inicial (antes do tratamento).

As curvas de sobrevivência têm formas diferentes dependendo do tipo de microrganismo, o tipo do meio de cultura dos microrganismos, e o método de exposição (exposição direta, ou exposição indireta – tem contato só com as espécies reativas, mas não com o próprio plasma).

Moisan et al. 2001 afirma que existem três fases no processo de esterilização em pressão baixa, conforme podemos ver exemplificado na Figura 4.1.

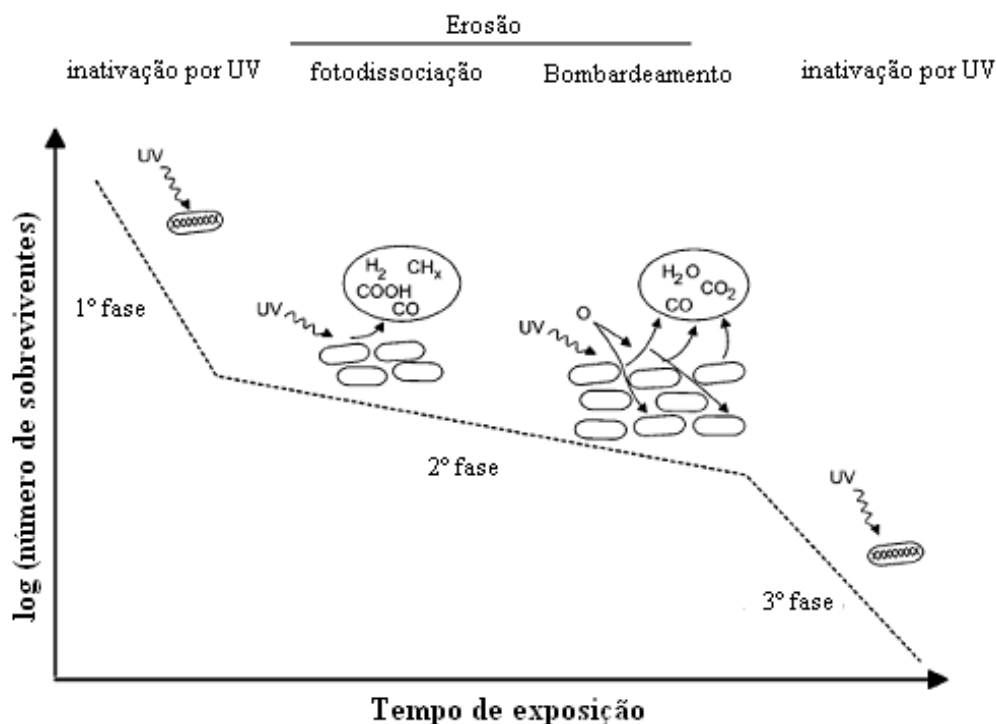


Figura 4.1 – Ilustração das três fases características da curva de sobrevivência dos microrganismos proposta por Moisan et al. 2001.

A primeira fase do processo de esterilização, que apresenta um valor D mais curto, é principalmente devido à ação de radiação UV em esporos isolados ou na primeira camada de esporos empilhados.

A segunda fase, que tem a cinética mais lenta, é atribuída a um processo lento de erosão da membrana dos microrganismos, através de espécies ativas.

Finalmente, a terceira fase entra em ação depois que esporos foram inativados pela fase 2, conseqüentemente, permitindo que o UV atinja o material genético dos esporos ainda vivos. Foi observado que o valor D desta fase está perto do valor D da primeira fase.

É importante notar que a explicação dada anteriormente ainda está em debate, e não é aplicável ao caso de plasmas de pressão atmosférica onde foi mostrado que UV faz um papel secundário no processo mortal.

4.4 AGENTES DE INATIVAÇÃO DE BACTÉRIAS

Trata-se principalmente à radiação ultravioleta (UV), espécies reativas, e de partículas carregadas (elétrons e íons). O efeito do calor não faz parte desta discussão, uma vez que a temperatura das amostras sob tratamento é mantida próxima à temperatura ambiente ou, pelo menos abaixo de um valor conhecido para causar dano celular.

4.4.1 Efeito UV

O UV afeta as células de bactérias por induzir a formação de dímeros timina no DNA. Isso inibe a capacidade da bactéria de se replicar.

Ao comparar a cinética de inativação de bactéria por radiação UV com lâmpada de vapor de mercúrio, Laroussi et al. 1996 concluiu que UV não era o principal agente de inativação. Essa conclusão foi apoiada pelo trabalho de Herrmann et al. 1999 que expôs *B. globigii* ao plasma APPJ com o efluente bloqueado por uma janela de quartzo. O quartzo é transparente para a radiação UV. Não foi observada redução substancial na fase inicial da concentração de bactérias.

Uma possível explicação para estes resultados, talvez seja o fato de que a inativação celular por UV só ocorre quando o seu comprimento de onda está dentro da “gama germicida” (220 nm a 280 nm) e sua dose (expressa em watts.s/cm) é alta o suficiente.

A maior parte das experiências de plasma à pressão atmosférica, simplesmente não resulta na emissão de qualquer dose de radiação UV substancial, nos comprimentos de onda germicida. Os curtos comprimentos de onda, que podem ser gerados, não têm comprimentos suficientes para propagação e profundidade de penetração para causar danos letais, especialmente para a exposição indireta. Assim, o UV gerado pelo plasma em pressão atmosférica não satisfaz as condições germicidas, portando a radiação UV não têm um efeito pronunciado.

4.4.2 Efeito de Espécies Reativas

As espécies reativas (O_3 , O^+ , OH , etc.) desempenham um importante papel nas suas características germicida. Herrmann et al. 1999, Richardson et al. 2000, e Kuzmichev et al. 2001 mostraram experimentalmente que as descargas que contêm oxigênio têm um forte efeito germicida. Ele comparou os resultados obtidos por tratamento com jato de plasma à pressão atmosférica (APPJ) com e sem oxigênio. Verificou que o valor D, no caso de ausência de oxigênio assume um valor mais elevado do que no caso quando o oxigênio é adicionado.

Richardson et al. 2000 mostrou que a descarga RBD tornou-se mais eficaz, em inativar *B. subtilis* (formas vegetativa e esporulada), quando oxigênio foi misturado ao hélio. Uma mistura contendo 3% de oxigênio produziu os melhores resultados.

Depois de experimentar com diferentes misturas de gás, Kuzmichev et al. 2001 concluiu que os melhores efeitos bactericidas são alcançados na presença de oxigênio e ar úmido.

Na presença de umidade, o radical hidroxila, OH , também desempenha um papel significativo em atacar quimicamente as estruturas exteriores das células bacterianas. No caso do ar, a produção de NO e NO_x acrescenta letalidade ao processo. E, claro, a presença do O_2 no ar ou em descargas contendo uma mistura de oxigênio leva à geração de ozônio (O_3). O ozônio interfere na respiração celular, tendo um forte efeito bactericida.

Outro método de obter um plasma rico em radicais ativos é acrescentando pequenas quantidades de peróxido de hidrogênio, H_2O_2 (na forma de aerossol, por exemplo) em um volume da descarga. Yamamoto et al. 2001 relatou uma eficácia de inativação reforçada (com um valor D de 15 segundos). Usando uma descarga corona de argônio com uma mistura de H_2O_2 na forma spray para inativar *E. coli*.

4.4.3 Efeito de Partículas Carregadas

Em altas pressões e com energias relativamente baixas, espera-se que bombardeamento de células bacterianas por partículas carregadas venha a desempenhar algum papel na destruição de microrganismos.

A maior parte dos pesquisadores tem negligenciado esse papel dos elétrons e íons no processo de inativação bactérias. No entanto, Mendis et al. 2000 sugeriu que partículas carregadas possam desempenhar um papel muito significativo na ruptura da membrana externa das células bacterianas, principalmente em bactérias Gram-negativas, que possui uma membrana irregular.

Mendis et al. 2000 afirma que as alterações morfológicas observadas experimentalmente por Laroussi et al. 1996, usando microscopia eletrônica, apóia essa alegação.

As bactérias normais têm diferença de potencial e as cargas elétricas na membrana da célula podem ajudar as bactérias a absorver nutriente. Se as bactérias são tratadas com uma voltagem alta, a estrutura da membrana da célula e a distribuição de cargas da membrana podem ser destruídas. Além disso, com o efeito penetrante do fluxo de partícula de alta velocidade na estrutura exterior de bactérias, poderia ser destruída a parede da célula, e o citoplasma seria liberado causando a morte das bactérias.

4.5 MECANISMO DE MORTE CELULAR

Várias propostas têm sido sugeridas para o mecanismo de destruição celular. Moisan et al. 2001 sugeriu que UV, com os seus efeitos conhecidos sobre o material genético, desempenha um papel primordial, seguido pela erosão da membrana celular, induzida por UV, que, por sua vez, é seguido por decapagem da membrana celular através de espécies reativas. As espécies reativas reagem quimicamente com o biomaterial das células formando compostos voláteis. No entanto, essa seqüência de

eventos não é aplicável ao caso dos plasmas de alta pressão onde o UV não desempenha um papel importante.

Montie et al. 2000 propõe três mecanismos de morte para o plasma de alta pressão.

1) Peroxidação lipídica resultante da susceptibilidade dos ácidos graxos insaturados a ataques de radicais hidroxila,

2) Oxidação de proteína resultante da susceptibilidade à oxidação dos aminoácidos;

3) Oxidação do DNA resultante da formação de bases, que são geradas através de reações com radicais oxigênio.

Laroussi et al. 1996 e Montie et al. 2000 mostraram que na bactéria *E. coli* (Gram-negativas), a membrana externa rompe após curtas exposições ao plasma (10 a 30 segundos). Montie et al. 2000 afirma que a rápida ruptura da membrana de bactérias Gram-negativas é devido a alterações da membrana lipídica causada pela formação de peróxido de ácidos graxos.

Mendis et al. 2000 sugeriu que a ruptura da membrana de bactérias Gram-negativas é causada pelo acúmulo cargas na superfície externa da membrana. As bactérias Gram-positivas não apresentam alterações morfológicas visíveis. No entanto, vários tipos de bactérias Gram-positivas tiveram uma redução da viabilidade celular.

Uma possível explicação é que algumas espécies reativas geradas pelo plasma são capazes de difundir através da robusta membrana externa, e de reagir diretamente com o biomaterial no interior da célula. Estas reações poderiam comprometer a integridade de toda a célula, que conduz à sua morte, ou pode simplesmente tornar a célula inativa.

Laroussi et al. 2001, realizaram experimentos sub-letais, e observaram que esses experimentos afetaram as funções metabólicas das células, sem necessariamente matar. Eles expuseram *E. coli* a pequenas doses de plasma e acompanharam a evolução heterotrófica, em relação aos controles, para observar se houve mudanças nas atividades enzimáticas. Observaram que a utilização de determinados nutrientes pelas células expostas pode aumentar ou diminuir. O que indica que o plasma pode ser utilizado apenas para alterar o comportamento metabólico dos microrganismos. Este

recém-descoberto efeito de biomanipulação dos plasmas frios pode potencialmente levar a novas e interessantes aplicações biológicas.

4.6 DESCRIÇÃO DE ALGUNS EXPERIMENTOS REALIZADOS

4.6.1 Suspensão em lamínulas lavadas com PBS

Xingmin et al. 2006 realizou testes com uma forma vegetativa (*E. Coli* e *S. Aureus*) um esporo (*B. Subtilis var niger*), usando um plasma de baixa-temperatura produzido por descarga de barreira dielétrica (DBD). Os microrganismos foram preparados em suspensão com concentração de 10^6 /ml.

Foi usado como dielétrico para a descarga DBD, um painel de resina de epóxi com uma espessura de 0,5 mm, colocada num dos eletrodos. A suspensão foi colocada em lamínula esterilizada (2cm x 2cm). Foram usadas quatro amostras experimentais e um controle. As lamínulas com as suspensões de bactérias foram colocadas entre os eletrodos e tratadas com plasma de baixa-temperatura. Quatro tempos de exposição foram usados (30, 60, 90 e 120 segundos). O valor de pico da voltagem externa do dispositivo experimental era 10 kV e a potência da descarga era 0,3 W. Cada lamínula foi posta num tubo e lavada com PBS. Depois essa suspensão foi semeada em meio de cultura e após incubação, as colônias foram contadas e as curvas de sobrevivência foram feitas.

As amostras tratadas por cerca de 120 segundos foram observadas com microscópio eletrônico. Os resultados da microscopia eletrônica mostraram que antes do tratamento, o contorno de *S. aureus* e *E. coli* estavam intactas e o citoplasma simétrico. O esporo de *B. subtilis var niger* tinha forma redonda, superfície lisa e circunferência intacta.

Depois do tratamento com plasma por 120 segundos, a forma da maioria de *S. aureus* e *E. coli* não estava mais intacta, e havia um grande número de fragmentos de bactérias. A superfície de algumas bactérias que não estavam quebradas ficou áspera e

a circunferência borrada. O tamanho do esporo de *B. Subtilis var niger* foi aumentado e sua forma ficou irregular. Alguns cortes foram vistos claramente em sua superfície.

Os resultados da microscopia eletrônica mostraram que o plasma destruiu a estrutura exterior das bactérias. A forma vegetativa era mais suscetível ao efeito de inativação que o esporo. Assim, pode-se concluir que os efeitos da alta voltagem e fluxo de partícula de alta velocidade que penetram pela estrutura exterior das bactérias podem exercer um papel dominante durante o processo.

4.6.2 Comparação através de microscopia eletrônica entre esterilização por plasma, por ozônio e por radiação UV.

Sun et al. 2007 fez experimentos de tratamento de *S. Aureus* (Gram positivas) e *E. coli* (Gram negativas) usando descarga de barreira dielétrica (DBD). Quatro tempos de tratamento, 30, 60, 90, e 120 segundos, foram usados. Nesse caso também foi aplicada a descarga sobre as lamínulas com bactérias em suspensão e depois lavadas com PBS. O valor do pico de voltagem aplicado era 10 kV e a potência da descarga era 0,3 W. Após 24 horas de incubação a 37° C, as UFC foram contadas.

Microscopia eletrônica foi usada para estudar o efeito de inativação e as mudanças estruturais nas bactérias devido à ação da descarga DBD, do gerador de ozônio, e da lâmpada UV (254 nm).

Resultados experimentais mostraram que o tempo de inativação das bactérias era diferente usando métodos diferentes. Aproximadamente 120 segundos com DBD, 10 minutos com gerador de ozônio, e 30 minutos com lâmpada UV.

Observamos na figura 4.2 a comparação dos resultados da microscopia eletrônica. Na amostra sem tratamento, tratada com ozônio e tratada com UV observamos as estruturas intactas, mas houve modificações estruturais de *S. aureus* após o tratamento com plasma.

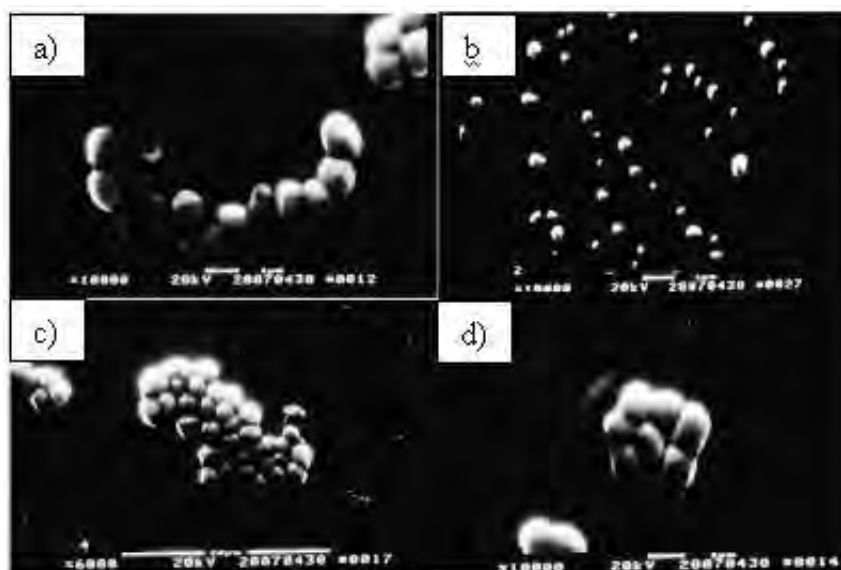


Figura 4.2– *S. aureus* (a) amostra sem tratamento (b) 120 s de exposição ao plasma, (c) 10 min. de exposição ao ozônio, e (d) 30 min. de exposição à lâmpada UV MEV com aumento de 10000 vezes (1cm equivale a 0,7µm)

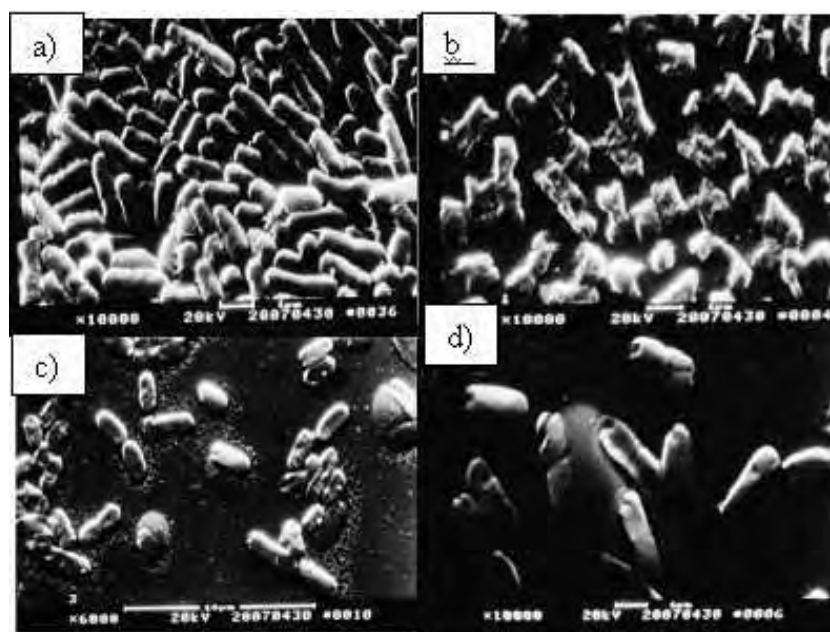


Figura 4.3– *E.coli* (a) amostra sem tratamento (b) 120 s de exposição ao plasma, (c) 10 min. de exposição ao ozônio, e (d) 30 min. de exposição à lâmpada UV MEV com aumento de 10000 vezes (1cm equivale a 0,7µm)

Na figura 4.3 observamos também que somente após o tratamento com plasma ocorreram significativas modificações estruturais de *E. coli*.

Depois do tratamento com DBD por 120 segundos, foram observados fragmentos bacterianos de *S. aureus* e *E. coli* em grande número. Foi observado dano na

integridade estrutural das bactérias tratadas. Porém, as bactérias inativadas ainda mantiveram integridade depois do tratamento usando o gerador de ozônio ou a lâmpada de UV. Por isso Sun et al. supõe que partículas carregadas e radicais livres ativos têm maior efeito na esterilização por plasma.

4.6.3 Suspensão em lamínulas úmidas, e com acréscimo de solução salina.

O efeito de esterilização de *B. subtilis* e *E. coli* foi investigado usando plasma de DBD a pressão atmosférica por Tanino et al. 2007.

A figura 4.4 ilustra o reator de descarga com barreira dielétrica. Uma folha de Teflon de dois milímetros foi fixada, como uma barreira de dielétrica, no eletrodo (100mm x 100mm).

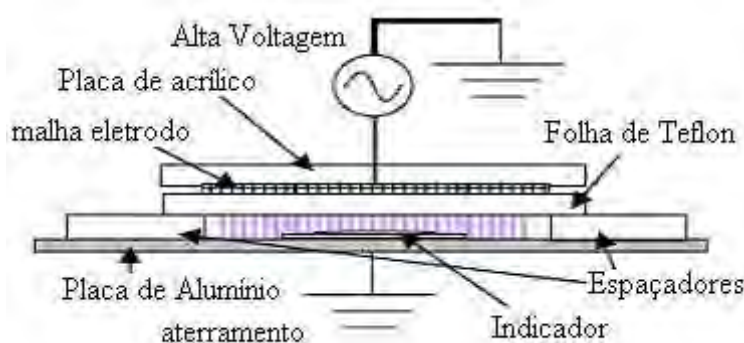


Figura 4.4 – Esquema da descarga DBD usada no experimento citado.

A voltagem, a frequência da forma de onda da voltagem aplicada e a potência média eram 24kV pico-a-pico, 34kHz e 230W, respectivamente.

As amostras (uma seca à temperatura ambiente, e outra úmida) foram colocadas sobre os eletrodos.

Foi examinado o efeito do tempo de tratamento de 1, 2, 3 e 4 minuto(s) para o método seco. O número de sobreviventes diminuiu com tempo de tratamento crescente, e a esterilização completa foi alcançada depois de 4 minutos de tratamento. O valor D do método seco era aproximadamente 40 segundos.

Para o método úmido, onde a amostra foi usada imediatamente após ser colocada sobre a lamínula, o tempo de tratamento foi de 10, 20, 30 e 40 segundos. O efeito de esterilização também aumentou com o tempo de tratamento e a esterilização completa foi alcançada depois de 40 segundos. O efeito de esterilização deste método foi muito mais alto que do método seco e o valor D era só 7 segundos neste caso.

Os resultados experimentais do teste de esterilização a seco e úmido sugerem que a água aumenta o efeito de esterilização devido à produção de radicais OH. Além disso, desarranjo elétrico da membrana da célula também é outra possível explicação do aumento de esterilização na presença de água, isso porque a corrente que flui pelos esporos é aumentada, e a presença de água poderiam ter induzido a transição dos esporos¹ para alimentar as células que são menos resistentes.

Embora o método úmido seja muito efetivo, sua aplicação é um pouco limitada. Então, foi modificado o método seco. Adicionando à amostra seca 0,1ml de água pura, antes do teste de esterilização. O tratamento foi feito com 230W, 34kHz. O número dos sobreviventes diminuiu com tempo de tratamento crescente. Esterilização completa foi alcançada depois de 70 segundos de tratamento, e o valor de redução decimal (valor D) era aproximadamente 12 segundos. O efeito de esterilização deste método foi mais alto que do método seco, mas ligeiramente mais baixo que o do método úmido. Isto pode ser, possivelmente, porque os esporos foram coagulados e acumulados durante preparação da amostra seca. Assim os radicais não podem difundir para dentro dos esporos acumulados.

Para examinar o efeito da condutividade da suspensão de esporo, foram feitos experimentos de esterilização com o método seco modificado adicionando água salgada. Os resultados mostram que a adição de 4g/L de sal aumentou o efeito de esterilização. Por outro lado, uma adição de 8 e 10g/L de sal diminui o efeito da esterilização, isso porque se os esporos estiverem cobertos com líquido altamente condutivo, eles são protegidos eletricamente e desarranjo elétrico da membrana pode ser suprimido.

¹ Em situações adversas o microrganismo se torna um esporo, sendo envolvido por uma parede celular que o protege até as condições ambientais se mostrarem novamente favoráveis à sua germinação.

4.6.4 Análise do estado dos componentes biológicos e bacteriófagos durante inativação por descarga DBD.

Plasmas de pressão atmosféricos não-térmicos tem sido recentemente aplicados no campo biomédico, mas para levar estas aplicações adiante, é muito importante saber os efeitos causados pelo plasma nas células e componentes celulares, especialmente nas membranas, proteínas, e DNA, a nível molecular.

Para tanto, Yasuda et al. 2008, fez um estudo da esterilização de esporos de *Bacillus subtilis*, semeados em lamínulas de vidro, usando DBD a pressão atmosférica, com 40 kV pico a pico de voltagem, frequência de 2kHz, e potência média de 8,8W.

Os resultados mostraram que o método de esterilização de plasma é realizado a uma velocidade relativamente alta para esporos de *B. subtilis* comparado com métodos convencionais. Tratamento de plasma com adição de H₂O mostrou ter um desempenho mais alto comparado com o método seco (Tanino et al. 2007). Tirando proveito da destruição da parede celular através da aplicação de DBD, um método de extração universal de DNA de micróbios que não usa enzimas digestoras de parede celular também foi proposto por Yasuda et al. 2008.

Além da esterilização, é interessante conhecer os estados de componentes biológicos antes da inativação celular (doses não letais).

Yasuda et al. 2008 realizou experiências com suspensões de bactérias e bacteriófagos. A investigação foi focalizada na análise de membrana, proteína, e DNA após tratamento com DBD atmosférico em *E.coli* e sistema bacteriófago- λ . Foi usado como eletrodo para descarga DBD, uma malha de aço conectada a alta tensão e uma placa de alumínio aterrada. Uma folha de Teflon de dois milímetros foi fixada no eletrodo de alta tensão como barreira dielétrica. Uma fonte de alta tensão ac foi usada para gerar a descarga uniforme na abertura de ar de três milímetros. A voltagem era de 40 kV pico-a-pico (ajustada por osciloscópio), a frequência era de 2kHz e a potencia útil de 8,8W (calculada pelo método da figura de Lissajous). Um pedaço de filme PET, de 90x30mm², foi coberto por meio de cultura gelatinoso. Esse filme PET com o meio gelatinoso foi seco por 5 minutos e deixado 24h sob luz UV. Depois, 20 μ L de

suspensão das amostras foram espalhadas sobre o filme PET e logo em seguida foi aplicado plasma em pressão atmosférica. As suspensões das amostras foram recuperadas em um microtubo, lavando a superfície do filme PET com 100µL de água destilada. Nas amostras recuperadas foram feitas experiências de estimativa de sobrevivência, medida de fluorescência, análise de proteína, análise de DNA, e observação microscópica.

Segundo os experimentos de Yasuda et al. 2008, podemos observar que a aplicação de DBD atmosférico para esterilização bacteriana, mantendo as células em uma solução de água, tem as seguintes vantagens experimentais:

- 1) o estado biologicamente ativo das células pode ser investigado.
- 2) as condições circunvizinhas das células podem ser controladas acrescentando substâncias químicas à solução.
- 3) a eficiência da inativação bacteriana é maior do que usando amostras secas, debaixo das mesmas condições elétricas.

Pela curva de sobrevivência de *E.coli*, Yasuda et al. 2008, observou uma redução decimal da concentração inicial em 30 segundos de tratamento, e esterilização completa foi alcançada após 40 segundos de tratamento. Pela medida de intensidade de GFP (*Green Fluorescent Protein*) em *E. coli* depois do tratamento com DBD, observou-se que a intensidade diminuiu com o aumento do tempo de tratamento, e inativação completa da função de GFP foi vista depois de 40 segundos de tratamento. Yasuda et al. 2008 sugeriram que essa diminuição foi causada pela desnaturação irreversível ou modificação química das células.

A análise de DNA das células tratadas, através de eletroforese em gel de agarose, mostrou que o padrão do cromossomo não mudou até 30 segundos de tratamento de DBD. Um pouco de degradação na amostra foi vista em 40 segundos de tratamento, o que pode ter sido causado pela acidez aumentada da amostra de DNA. Yasuda et al. 2008 concluiu que o cromossomo do DNA não degradou notavelmente durante inativação das células de *E.coli*.

Da mesma forma foi observado que o tratamento DBD não interfere no RNA ribossômico.

Pela análise em microscopia, observou-se que com o aumento do tempo de tratamento, as paredes das células ficam destruídas e, portanto, as células ficam interconectadas entre si. Yasuda et al. 2008 concluiu que danos na membrana das células são essenciais para esterilização bacteriana através de plasma de baixa temperatura.

Yasuda et al. 2008 fez experimentos de tratamento com DBD em bacteriófagos, que normalmente não têm membrana e consistem somente em proteínas e ácidos nucléicos. Nesse caso, o número de fagos infecciosos diminuiu depressa e a inativação completa foi alcançada depois de 30 segundos de tratamento. A taxa de inativação foi mais alta que a de *E.coli*, debaixo das mesmas condições elétricas. Também foi feita análise de eletroforese e foram observadas degradações mais rápidas das proteínas, quando comparado com tratamento de *E. coli*. Embora a taxa de degradação das proteínas tenha sido mais lenta em comparação com a taxa de inativação dos fagos, o tempo de desaparecimento das proteínas e de inativação dos fagos coincidiu. Por isso, foi sugerido que a membrana celular tem função protetora para o DNA contra a descarga DBD.

Com base nesses experimentos, concluiu-se que, na fase inicial de esterilização, algumas proteínas foram depressa e irreversivelmente inativadas por desnaturação ou modificação de substância química, como oxidação e redução, mas não por degradação. Não só a destruição de membrana ou dano no DNA, mas a inativação rápida de proteínas pode ter um papel significativo na esterilização por DBD. Por exemplo, a inativação ribossômica interrompe a síntese de proteína e causa a morte da célula, mesmo com o DNA mantido intacto.

Investigação do processo de inativação em outras proteínas celulares pode trazer elucidações ao mecanismo de esterilização através de aplicação de DBD.

4.6.5 Análise de extravasamento de K^+ e ácidos nucléicos após tratamento por descarga DBD

Yue Ma et al. 2008 realizou experimentos com descarga DBD a pressão atmosférica para tratamento de *E. coli* e *S. aureus*. O reator consistia em dois eletrodos de alumínio cobertos com placas de quartzo de 2mm (superior) e 1 mm (inferior). A descarga é gerada por alta tensão alternada, cujos parâmetros foram de 30 kV pico-a-pico, frequência de 60 kHz, e distancia de três milímetros. Para prevenir contaminação microbiana, antes de cada experiência, a superfície interna foi limpa com álcool 75%, e o dispositivo de reação foi colocado sob lâmpada UV por duas horas. Em lamínulas de vidro foram colocadas 50 μ l das suspensões dos microrganismos (*E. coli* e *S. aureus*) e tratadas com DBD. Depois essas suspensões foram transferidas para tubos de teste por lavagem das lamínulas com 2 ml de PBS. As amostras foram mantidas líquidas para análises. Foi feita microscopia eletrônica de transmissão para observar a integridade das células, e um analisador de bioquímica semi-automático foi usado para medir a concentração de K^+ na suspensão tratada. Além disso, um espectrofotômetro de UV visível (UVS) foi empregado para inspecionar as concentrações de proteína e ácidos nucléicos. Com estes métodos, o dano nas células tratadas por plasma foi analisado.

Yue Ma et al. 2008 observou que com 10 segundos de tratamento as células de *S. aureus* estavam quase todas mortas, enquanto a *E. coli* demorou 7 segundos. Isso porque a parede das células Gram-positivas contém uma camada de peptideoglicanos mais espessa.

Das amostras tratadas por 5 segundos e das amostras sem tratamento, foram feitas imagens de TEM ($\times 50000$), conforme observado na Figura 4.5.

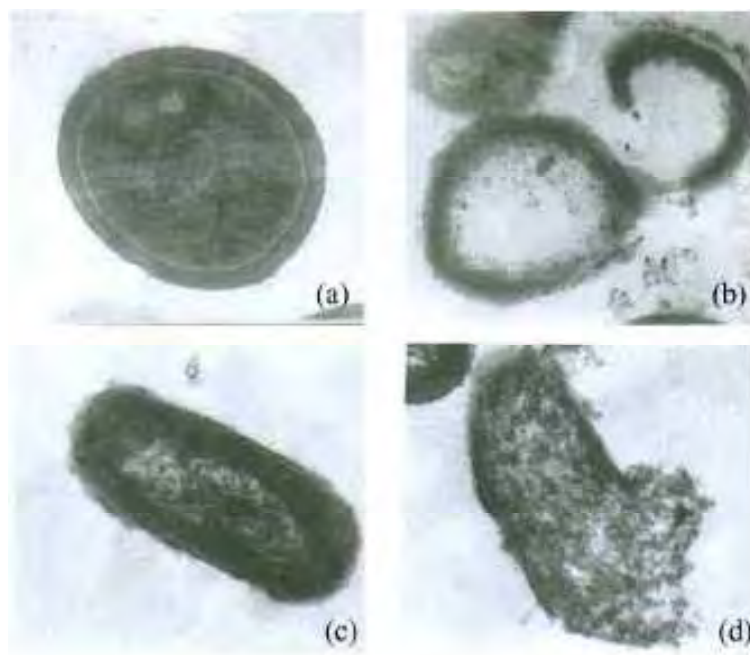


Figura 4.5 – Imagem de TEM feitas por Yue Ma et al. 2008: (a) *S. aureus* antes do tratamento por plasma, (b) *S. aureus* depois do tratamento por plasma, (c) *S. aureus* antes do tratamento por plasma, (d) *S. aureus* depois do tratamento por plasma.

Yue Ma et al. 2008 observou que antes do tratamento a membrana da célula era lisa, mas depois do tratamento ela ficou significativamente áspera. Também, observou-se que as membranas ficaram rompidas e o citoplasma extravasado.

Yue Ma et al. 2008 fez experiências adicionais para descobrir o estado de vazamento das células depois do tratamento com plasma. A suspensão bacteriana tratada foi centrifugada a $2000\times g$ por 10 minutos, e então, foram coletados os precipitados. O K^+ foi destilado e a concentração medida por um analisador de bioquímica semi-automático com o comprimento de onda de 620 nm. As concentrações de K^+ extravasados no precipitado das suspensões de *S. aureus* e *E. coli* aumentaram com o tempo de exposição ao tratamento de 0 a 10 segundos. Depois de 10 segundos, a concentração de K^+ nas duas suspensões bacterianas se tornaram saturadas. As concentrações de proteínas e ácido nucléico foram medidas por procedimentos semelhantes ao de K^+ , mas a suspensão bacteriana foi centrifugada a $5000\times g$ por 5 minutos. A densidade óptica (DO) do precipitado foi medida por UVS (com 280 nm para proteína e 260 nm para ácido nucléico). Isso porque o valor da

densidade ótica é proporcional à concentração do elemento. Observou-se que as concentrações de proteínas e ácido nucléico de *S. aureus* e *E. coli* aumentaram nitidamente com o tempo de exposição até quatro segundos, e depois, a concentração diminuiu com a extensão do tempo de exposição. Depois que o tempo de exposição excedeu 10 segundos, a taxa decrescente da concentração permaneceu praticamente constante.

A ação de campo elétrico aplicado em esterilização de bactéria foi explorada por Yue Ma et al. 2008, através de um experimento com 60 segundos de tratamento e variação da voltagem, aumentada até a voltagem de descarga crítica. Nesta experiência, a voltagem crítica era aproximadamente 12 kV. Observou-se que com os aumentos de voltagem aplicados, o numero de sobreviventes de *S. aureus* e *E. coli* não mudaram muito. Assim, Yue Ma et al. 2008, em seu experimento, concluiu que é improvável que o campo elétrico tenha contribuição significativa na inativação bacteriana.

Yue Ma et al. 2008, considera que em plasma de pressão atmosférica, a maior parte da radiação UV produzida é reabsorvido no plasma e não atinge a superfície tratada. Mas, a descarga DBD pode criar espécies reativas, como átomos de oxigênio, ozônio, moléculas de oxigênio metaestáveis, peróxidos, superóxidos, e radicais de hidroxila, e todos eles são bactericidas. Essas espécies reativas podem oxidar a membrana das células e causar o vazamento do citoplasma, resultando nas concentrações de K^+ , proteína, e ácido nucléico aumentadas nas suspensões bacterianas. Porém, com o tempo de exposição ao plasma estendido, as proteínas extravasadas e o ácido nucléico são oxidados gradualmente pelas espécies reativas, conduzindo à diminuição da concentração deles nas suspensões, mas o K^+ não pode ser oxidado, e assim, sua concentração satura.

Assim, Yue Ma et al. 2008, concluiu que as espécies reativas têm o papel principal no processo de inativação.

4.6.6 Experimento para comparação entre dano físico e químico nos microrganismos causados por descarga DBD.

Choi et al. 2006, produziu um sistema de esterilização eficiente que utiliza DBD pulsado, analisando o efeito germicida através de espectroscopia óptica de emissão (OES). Foi usada uma suspensão de *E. coli* em 0,9% de solução salina. Essa suspensão foi inoculada sobre lamínulas de vidro. Depois de secar a temperatura ambiente por duas horas, as lamínulas foram colocadas na abertura de ar do reator sob uma placa de alumínio para tratamento de DBD. Para o tratamento, Choi et al. 2006 usou frequência de 1kHz e tensão de 11 kV.

Depois do tratamento, as lamínulas foram colocadas em suspensão salina e mexidas por 10 minutos para remoção e dispersão das colônias de *E. coli*. Essa solução foi diluída em 10^{-1} e semeadas em placas de petri com agar. O número de UFC foi contado depois de 24 horas de incubação a 37°C.

Para a observação em microscópio eletrônico (SEM) da morfologia da *E. coli* as lamínulas foram cobertas por L-lisina, para desenvolver adesão entre células e a placa. Depois, as lamínulas foram cobertas por uma fina camada de ouro e as morfologias observadas por SEM.

Choi et al. 2006 observou que conforme aumenta o tempo de tratamento, maior é o poder de esterilização. As figuras 4.6 e 4.7 mostram as imagens de SEM da *E.coli* com aumento de 2000 e 10000 vezes.

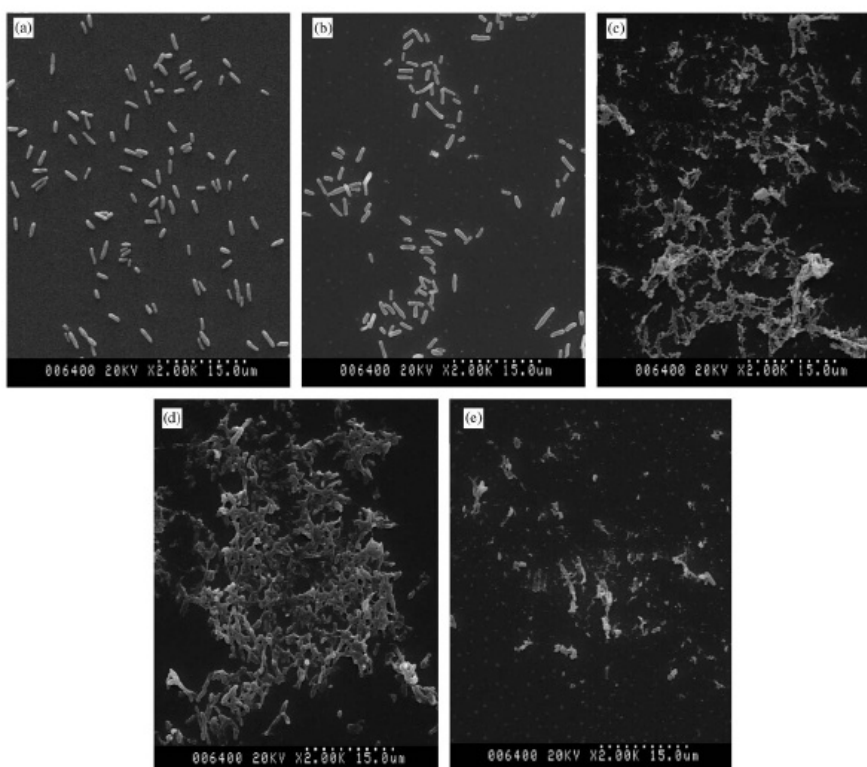


Figura 4.6 – Imagem de SEM de *E. coli* com aumento de 2000 vezes dos tratamentos de: (a) 0 segundo, (b) 10 segundos, (c) 30 segundos, (d) 50 segundos, (e) 70 segundos. (feitos por Choi et al. 2006).

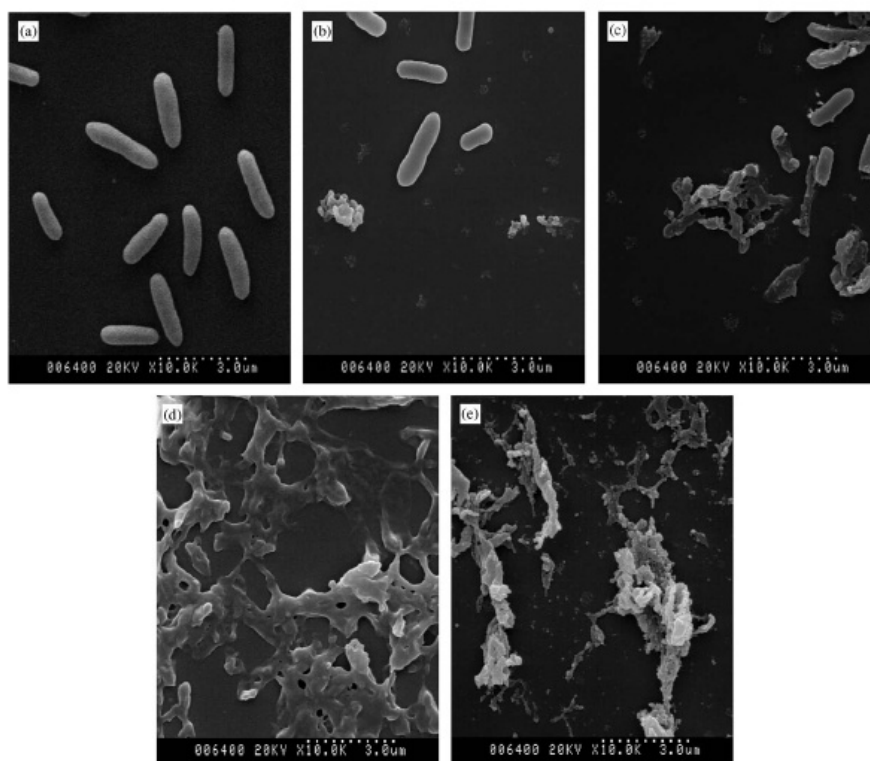


Figura 4.6 – Imagem de SEM de *E. coli* com aumento de 10000 vezes dos tratamentos de: (a) 0 segundo, (b) 10 segundos, (c) 30 segundos, (d) 50 segundos, (e) 70 segundos. (feitos por Choi et al. 2006). (1cm equivale a 0,7 μ m)

Estas imagens indicam que o tratamento com plasma separa as colônias de *E. coli* e corroem a superfície do esporo ou divide os esporos em muitos pedaços.

Para determinar qual o processo predominante (físico ou químico) Choi et al. 2006, realizou o seguinte experimento: Inoculou *E. coli*, *B. subtilis* e *Pseudomonas aeruginosas* no meio de cultura em placa de Petri. Sob a placa de Petri foi colocado um eletrodo de cobre fixo. Além disso, uma placa de alumina com um eletrodo de cobre foi colocada sobre a placa de Petri com o meio de cultura a uma distância de 1 mm, funcionando como barreira dielétrica. Para esta experiência, foi aplicado 18kV pulsado com de 2 kHz, e tempo de duração de tratamento foi de um minuto. (veja Figura 4.8).

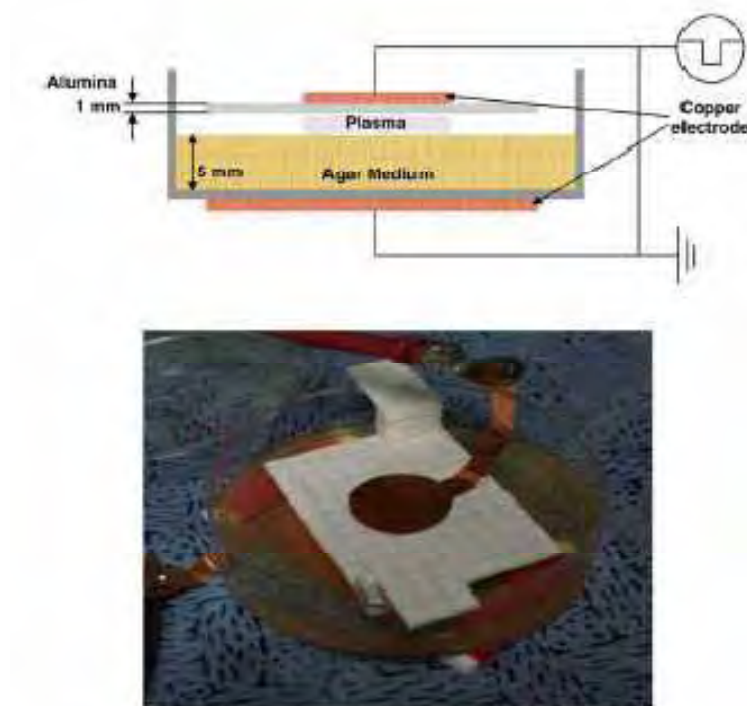


Figura 4.8 – Diagrama esquemático do aparato de esterilização usado por Choi et al. 2006, para distinguir entre dano físico e químico na bactéria tratada com plasma.

Para confirmar a esterilização química através de espécies neutras durante o tratamento, duas amostras de cada bactéria foram tratadas com papel manteiga (papel impermeável transparente) tampando a região do plasma para excluir as espécies químicas neutras. Deste experimento pode-se observar o efeito químico entre amostras com ou sem papel manteiga. No caso de amostras com papel manteiga, também houve

esterilização. Assim, podemos concluir que o dano causado por substâncias químicas (ozônio, oxigênio atômico, etc) também é importante para esterilização através do plasma.

4.6.7 Coagulação sanguínea e esterilização de tecidos por descarga com barreira dielétrica no ar usando eletrodo flutuante.

Foi proposto por Fridman et al. 2006 e Kalghatgi 2007 métodos de tratamento direto de tecido vivo que acontece a temperatura e pressão ambiente sem dano de tecido visível ou microscópico. A descarga com barreira dielétrica, usando eletrodo flutuante, é eletricamente segura para uso em humanos e pode ser usada para esterilização completa da flora da pele em segundos, e formação de coágulo de sangue em segundos de tratamento. Além disso, Fridman et al. 2007 pesquisou o uso de descarga com barreira dielétrica com eletrodo flutuante, para promoção de apoptose em células cancerosas (melanomas).

Tecido vivo de animal ou humano, que contém muita água e uma constante dielétrica relativamente alta, tem a exigida capacidade alta para armazenamento de carga e, então, pode ser empregado facilmente como o eletrodo flutuante (FE) da DBD. Neste caso o plasma é gerado entre o tecido vivo e o outro eletrodo.

O plasma gerado deste modo pode ser aplicado diretamente a um tecido humano vivo sem aquecimento ou dano químico do mesmo. Além da esterilização de tecido, o plasma coagula o sangue rapidamente. Foi observada a catálise no processo natural de coagulação de sangue.

Com o tratamento com plasma, observaram redução do tempo de coagulação do sangue. Visualmente, uma gota de sangue tirada de um doador saudável coagula em aproximadamente 15 min, enquanto uma gota semelhante tratada 15 segundos com plasma coagula em menos de 1 minuto. Tratamentos em órgãos mostraram resultados semelhantes sem qualquer dano visível ou microscópico do tecido. Isso porque, foi observada mudança significativa em concentrações de proteína do plasma sanguíneo depois do tratamento, acelerando o processo de coagulação.

Descargas elétricas convencionais (pressão alta e baixa e temperatura) são conhecidas pela sua capacidade de esterilizar várias superfícies. A vantagem do sistema FE-DBD proposto é sua capacidade de esterilizar tecido animal ou humano vivo sem qualquer dano para o tecido tratado, em até 5 minutos de tratamento.

Para quantificar a extensão de esterilização e determinar possíveis fatores responsável, foram feitos testes uma grande quantidade de bactérias obtida em swab de tecido de cadáver cultivada em agar sangue (10^9 ufc/ml). Esses meios de cultura foram tratados com plasma. Também foi feito teste da viabilidade do agar após tratamento com plasma. Observou-se a esterilização da flora bacteriana sem danos aos tecidos.

4.6.8 Modelagem matemática da descontaminação por uso da descarga com barreira dielétrica (DBD)

Para entender o mecanismo de desativação rápida, um estudo de caracterização numérica foi executado por Gallagher et al. 2007 para identificar qual fator do plasma (espécies químicas ativas e carregadas e espécies excitadas) é mais efetivo para esterilização. Como cada tipo de microrganismo tem uma composição celular diferente e respostas diferentes a fatores externos, eles construíram um modelo que pode descrever a cinética de desinfecção para todos os tipos de microrganismos no plasma de DBD. Este modelo utiliza uma cinética química aproximada que usa equações de taxa de crescimento para descrever as mudanças nas concentrações de um microorganismo viável considerando o efeito de cada fator do plasma individualmente. A equação diferencial seguinte descreve a taxa de mudança em concentração de um microorganismo viável $[M]$ com tempo:

$$\frac{d[M]}{dt} = -\sum_{i=1}^n k_i [M] [A_i], \quad (4.1)$$

onde n é o número de espécies do plasma que interagem com microrganismos, k_i é a taxa constante de reação dada como volume por unidade de tempo, $[M]$ é a concentração por unidade de volume de microrganismos viáveis, A_i é a concentração

por unidade de volume da i -ésima espécie. A concentração $[M]$ é específica para uma determinada experiência. O número n e a concentração $[A]$ de espécies interagindo é dependente do tipo de descarga de plasma, e k_i é uma constante específica do tipo da espécie A_i .

As constantes de taxa de reação podem ser derivadas de dados experimentais básicos pela fórmula seguinte:

$$k_{i,m} = \frac{\ln\left(\frac{1}{S}\right)}{[A_i] \cdot t}, \quad (4.2)$$

onde S é a fração de microrganismos sobreviventes, e t é o tempo de exposição. O produto $[A_i] \cdot t$ também é conhecido como tempo de contato (CT). As constantes de taxa de reação são derivadas de dados empíricos.

A partir desse modelo, Gallagher et al. 2007 realizou um estudo de caracterização numérica simples para quantificar o efeito da esterilização de três fatores do plasma (O_3 , OH, e UV) em bactérias *E. coli* tratadas no sistema DBGD. Os resultados mostram que a hidroxila tem um efeito significativo (responsável por ~13.5% das mortes); porém, ozônio e UVC têm um efeito desprezível num tempo de exposição muito curto (~1 ms). Estas estimativas numéricas devem ser ampliadas para incluir outras espécies quimicamente ativas: radicais (por exemplo, oxigênio atômico), partículas carregadas (íons e elétrons), e moléculas eletronicamente excitadas para caracterizar completamente e quantificar o efeito de esterilização do plasma de DBD. Para alcançar isto devem ser providos dados experimentais do efeito individual destas espécies em diferentes microrganismos.

5 METODOLOGIA

Neste capítulo vamos descrever como realizamos os experimentos de esterilização de meios de culturas pelo uso do plasma.

5.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

- Reator de plasma confeccionado no laboratório de Plasma da Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá;
- Estufa para esterilização (170°C/1h ou 160°C/2h);
- Autoclave;
- Estufa de incubação 37°C;
- Erlenmeyer;
- Agar Sabouraud;
- Meio de cultura líquido TSB (Tryptone Soya Broth);
- Agar TSA (Tryptone Soya Agar);
- Balança de alta precisão da marca Mettler Toledo, modelo AB204, com capacidade de 10mg - 210g, erro de 1 mg e desvio de 0,1mg;
- Bicos de Bunsen;
- Placas de Petri;
- Tubos de ensaio 13x10cm;
- Água destilada;
- Solução salina 0,85%;
- Alça bacteriológica de Platina;
- Espectrofotômetro da marca Micronal modelo B582;
- Cubetas para espectrofotometria;
- Escala de McFarland;
- Alças de Drigalski;
- Micropipeta estéril e ponteiros azuis (capacidade de 100 µl a 1000 µl);
- Micropipeta estéril e ponteiros amarelos (capacidade de 10 µl a 100 µl);

- Placas de microtitulação com 96 poços;
- Lamínulas de vidro;
- Lamínulas de silício;
- Glutaraldeído 2,5%;
- Álcool (25%, 50%, 75% e 100%);
- Tubos Falcon;
- Microscópio eletrônico de varredura (JEOL modelo JSM - 5310) do laboratório de sensores e materiais (LAS) do INPE em São José dos Campos;
- *Candida albicans* ATCC18804, *Escherichia coli* ATCC23922, *Bacillus Subtilis* ATCC19659, e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, cedidos pela Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (Unesp);
- Software Origin 6.0.

5.2 REATOR DE PLASMA

O reator é constituído por dois eletrodos submetidos a altas tensões alternadas (dezenas de kV) e permeados pelo ar em pressão atmosférica. Entre os eletrodos foi colocado um material dielétrico (a própria placa de Petri ou de microtitulação com o meio de cultura foi utilizada como dielétrico).

Devido à presença do dielétrico, a descarga DBD é caracterizada por um grande número de rápidas microdescargas, distribuídas aleatoriamente no tempo e no espaço entre os eletrodos.

A tensão empregada no reator vem de um gerador de tensão variável, operando a 60 Hz, constituído de um auto transformador Variac (gera tensão alternada entre 0 e 110V) e de um transformador de alta tensão, que eleva uma tensão eficaz de entrada de 110V a uma tensão de saída de, aproximadamente, 40 kV pico-a-pico. Para limitar a corrente no circuito e proteger o transformador no caso de um curto-circuito, é usada uma resistência de aproximadamente 1k Ω .

A figura 5.1 mostra o transformador Variac e o transformador de alta tensão usado nos nossos experimentos.



Figura 5.1 – Auto transformador Variac e transformador de alta tensão.

As medidas elétricas do reator DBD foram feitas usando um osciloscópio de quatro canais (Tektronix TDS 320). Para medir a tensão aplicada ao reator foi usada uma sonda de alta tensão (Tektronix P6015A), que atenua o sinal enviado ao osciloscópio em 1000 vezes. A corrente na descarga foi obtida medindo-se a queda de potencial sobre um resistor de $1200\ \Omega$, ligado em série ao circuito.

A Figura 5.2 mostra o circuito e o osciloscópio usados para obter as medidas elétricas de nossos experimentos. E a Figura 5.3 mostra um esquema do circuito de medidas.

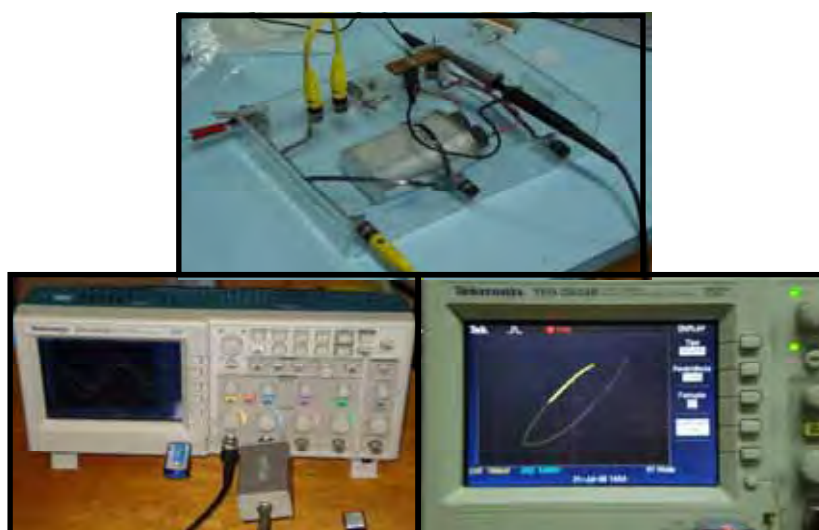


Figura 5.2 – Circuito de obtenção de medidas elétricas.

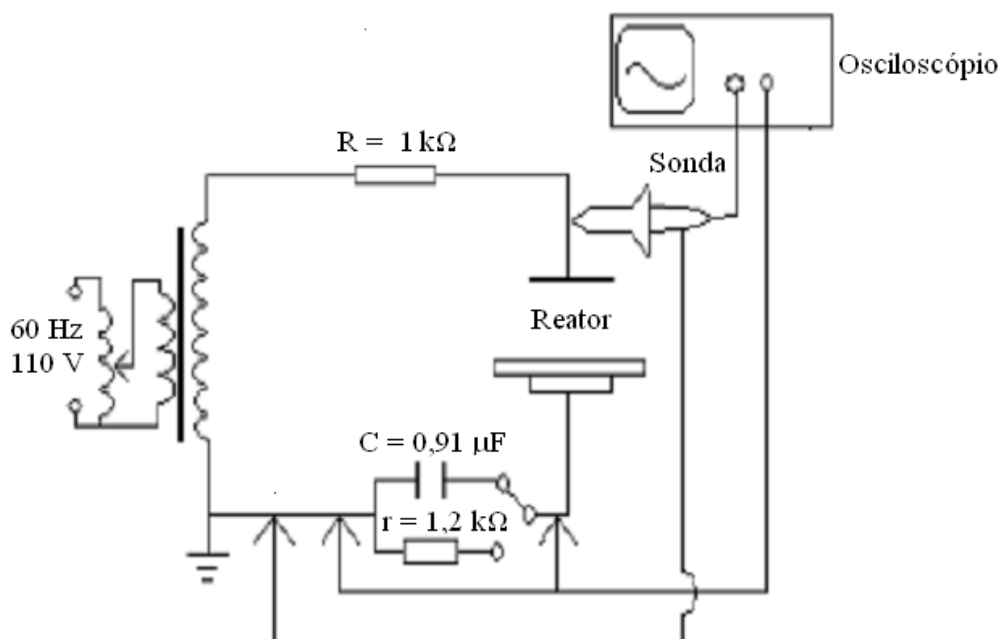


Figura 5.3 – Esquema do circuito de obtenção de medidas elétricas.

A determinação experimental da potência consumida em cada ciclo da descarga foi realizada pelo método da figura de Lissajous, obtida plotando a carga transportada nas microdescargas em função da tensão periódica aplicada. A área interna da figura formada em um ciclo corresponde à energia elétrica distribuída ao plasma num período (potência). A carga foi calculada experimentalmente medindo-se a tensão sobre um capacitor de $0,91 \mu\text{F}$ ligado em série ao circuito. Assim a potência consumida em um ciclo foi obtida pelo produto entre a frequência da tensão ac (60 Hz) e a área interna da figura de Lissajous.

Após a padronização dos experimentos, fizemos uma curva de calibração conforme os dados da Tabela 5.1 e gráfico da Figura 5.4. Assim pudemos monitorar a voltagem utilizada nos experimentos através de um multímetro ligado na saída do Variac, cuja tensão mantivemos abaixo de 120V.

Tabela 5.1 – Curva de Calibração de Tensão

Osciloscópio (kV pp)	Multímetro (V)	Escala do Variac (unidade relativa)
1,4	3	5
3,4	10	10
5,4	16	15
7,2	21	20
9,12	26	25
11,2	33	30
13,2	38	35
15	44	40
17,2	50	45
19	55	50
21	61	55
23	67	60
24,8	73	65
27	79	70
28,8	85	75
30,8	91	80
32,8	96	85
35	103	90
36,8	108	95
38,5	114	100
40	118	103

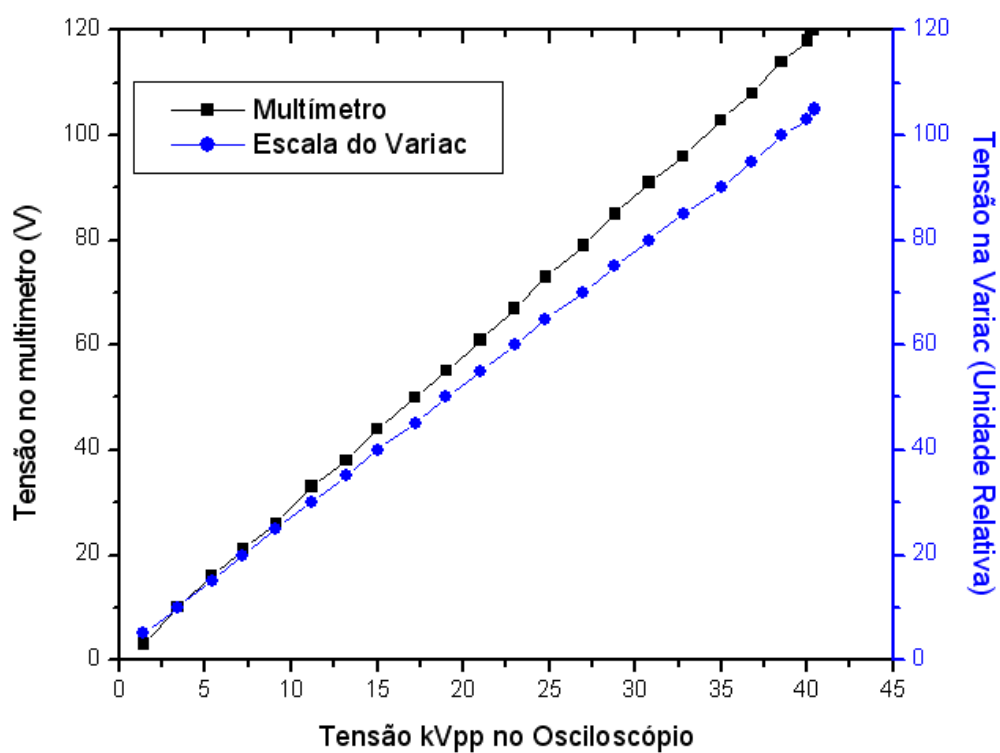


Figura 5.4 – Gráfico da curva de calibração de tensão do experimento.

5.3 PREPARAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA E DAS SUSPENSÕES

Esterilizamos o erlenmeyer e as alças de Drigalski, em estufa 170° C/1h.

Os tubos de ensaio com tampão de algodão e gaze, as ponteiros da micropipeta, e os tubos de ensaio com solução fisiológica foram esterilizados em autoclave (121°C por 15 min.).

No erlenmeyer estéril, diluímos o meio de cultura apropriado (medido com balança de precisão), em água destilada, depois esterilizamos esse erlenmeyer em autoclave.

Colocamos o meio de cultura estéril em placas de Petri estéril, após solidificar, colocamos em geladeira com a tampa voltada para baixo.

Semeamos as amostras dos microrganismos a serem utilizados no meio de cultura frio usando alça de platina, e armazenamos em estufa 37 °C por 24 horas.

Após 24 horas, fizemos suspensão celular, fixando a concentração através de espectrofotometria ou, em alguns casos, pela escala de turvação de McFarland.

5.4 EXPERIMENTO COM SUSPENSÕES EM PLACA DE MICROTITULAÇÃO

Inicialmente, montamos um sistema reator de plasma por descarga DBD, que consiste num dispositivo dielétrico posicionado entre dois eletrodos, alimentados por alta tensão alternada, com frequência de 60 Hz, tensão de 40 kV pico-a-pico.

Usamos uma placa de microtitulação contendo os microrganismos, como dielétrico do nosso sistema, e os eletrodos foram adaptados na placa para que não houvesse nenhum risco de contaminação durante os experimentos.

A figura 5.5 mostra a configuração do experimento com placa de microtitulação, com o eletrodo de alta tensão fixado na parte superior e o eletrodo aterrado na parte inferior.

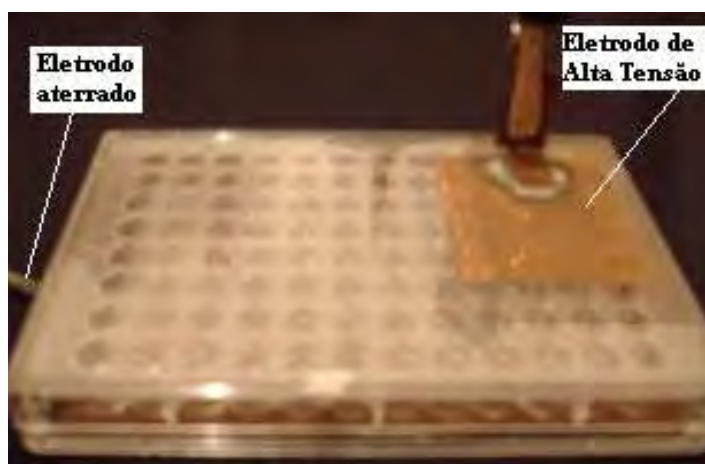


Figura 5.5 – Configuração do reator formado pela placa de microtitulação.

5.4.1 Placa de microtitulação com suspensões em solução salina

Para diminuir a distância entre os eletrodos, visto que a placa possui grandes dimensões, as suspensões celulares foram feitas em solução salina.

Os poços da placa de microtitulação foram apenas parcialmente preenchidos (150µl) para que houvesse quantidade de ar suficiente para formação de ozônio, visto que o ozônio pode ser um dos agentes ativos na esterilização.

Para realizar nossos experimentos de esterilização por plasma, usamos primeiramente o fungo *C. albicans*. Fizemos suspensão celular de 20 amostras (19 fenótipos e 1 padrão), em solução fisiológica. Na amostra padrão (ATCC18804), fixamos a concentração de aproximadamente 10^6 /ml através de espectrofotometria (comprimento de onda de 530 nm e densidade ótica de 0,286), e igualamos as demais amostras por turvação. Depois, colocamos 150 µl de cada suspensão em 20 poços de uma placa de microtitulação, adaptada para servir com dielétrico do nosso sistema.

Realizamos a descarga DBD sobre a placa, com dois diferentes tempos de exposição (1 minuto e 3 minutos). Logo em seguida, semeamos 100 µl da suspensão, de cada poço, em Agar Sabouraud, em placas de Petri.

Após 24 horas de incubação, tentamos realizar a contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC), para traçar a curva de sobrevivência de cada amostra. Através da curva de sobrevivência dos microrganismos analisados e comparação com

diferentes tempos de exposição ao plasma, queríamos analisar a eficácia da inativação de microrganismos por exposição ao plasma gerado através de descarga com barreira dielétrica.

5.4.2 Placa de microtitulação com suspensões em água destilada

Conforme observado em Tanino et al. 2007, uma concentração de sal maior que 4g/L pode diminuir o efeito da esterilização. Por isso resolvemos realizar experimentos em placa de microtitulação usando suspensões em água destilada. Além disso, através dos resultados obtidos, achamos necessário aumentar o tempo de exposição.

Novamente usamos o fungo *C. albicans*. Fizemos suspensão celular de quatro amostras (três fenótipos e um padrão – ATCC18804), em água destilada. Fixamos a concentração de aproximadamente 10^6 /ml através da escala de turvação de McFarland. Depois, colocamos 100 μ l de cada suspensão em 4 poços de uma placa de microtitulação, adaptada para servir com dielétrico do nosso sistema.

Realizamos a descarga DBD sobre a placa, com quatro diferentes tempos de exposição (2, 5, 10 e 15 minutos). Logo em seguida, semeamos os 100 μ l da suspensão, de cada poço, em Agar Sabouraud, em placas de Petri.

Após 24 horas de incubação, analisamos os resultados.

5.5 – EXPERIMENTO COM O ELETRODO DE ALTA TENSÃO DENTRO DA PLACA DE PETRI

Fizemos algumas modificações no sistema de geração de descarga DBD, montando os eletrodos de alta tensão na tampa da placa de Petri, com o eletrodo superior no interior da placa. Antes de utilizar esse sistema nos experimentos, desinfetamos a tampa com o eletrodo através de uma descarga com água oxigenada.

A Figura 5.6 mostra a configuração do sistema com o eletrodo superior no interior da placa de Petri.

5.5.1 Teste do Agar

Aplicamos 10 minutos de descarga DBD numa placa de Petri contendo apenas Agar Sabouraud. Após o tratamento, semeamos 100 μ l de suspensão de *C. albicans* ATCC18804 na concentração de 10^5 /ml na escala de turvação de McFarland, para observar a funcionalidade do agar após aplicação da descarga. Após 24h de incubação à 37°C, observamos os resultados.

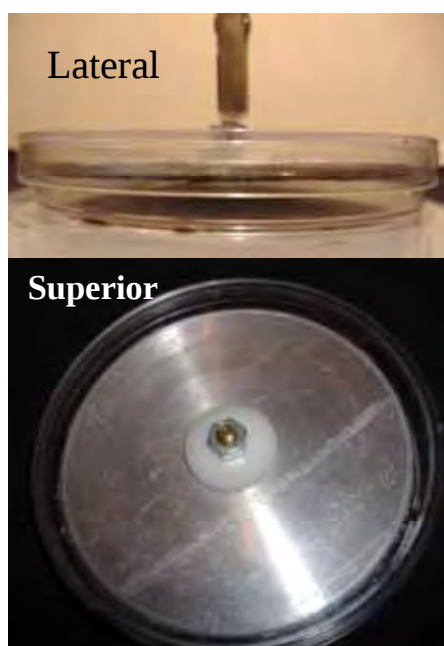


Figura 5.6 – Configuração do reator formado interno a placa de Petri

5.5.2 Tratamento de Suspensões semeadas no Agar

Usamos suspensão de *C. albicans* ATCC18804 na concentração de 10^5 /ml na escala de turvação de McFarland. Colocamos 100 μ l dessa suspensão num meio de cultura apropriado, dentro da placa de Petri adaptada com os eletrodos. Aguardamos

15 minutos para a suspensão se distribuir uniformemente no meio de cultura. Aplicamos 10 minutos de descarga DBD. Após 24h de incubação à 37°C, observamos os resultados.

5.5.3 Tratamento de suspensões em lamínula

Usamos suspensão de *C. albicans* ATCC18804 na concentração de 10^5 /ml na escala de turvação de McFarland. Colocamos 10µl dessa suspensão sobre uma lamínula. Colocamos a lamínula dentro da placa de Petri adaptada com os eletrodos. Aplicamos 10 minutos de descarga DBD. Logo após as descargas, lavamos a lamínula com 1 ml de solução PBS. Da suspensão resultante, semeamos 100µl em meio de cultura e após 24h de incubação à 37°C, observamos os resultados.

5.5.4 Tratamento em microrganismos crescidos

Aplicamos descarga DBD por 10 minutos, diretamente sobre uma placa de Petri com meio de cultura com *C. albicans* ATCC18804 semeado 24 horas antes do experimento. Logo após a descarga, semeamos meia alça de platina por técnica de esgotamento em outra placa de Petri. Após 24h de incubação a 37°C, analisamos os resultados.

5.6 – EXPERIMENTO COM ELETRODO DE ALTA TENSÃO SOBRE TAMPA DE VIDRO

Primeiramente, diminuámos o diâmetro do eletrodo para evitar a formação de arcos. Visto que o Agar é condutor, foi necessário colocar um dielétrico encostado ao eletrodo superior. Por isso, colocamos uma tampa de vidro sobre a placa de Petri, e

colocamos o eletrodo, sobre esse sistema. Desta forma observamos a formação de descarga DBD mais estável sem a formação de arcos. A figura 5.7 mostra como posicionamos a placa de Petri semeada, sobre os eletrodos e o dielétrico de vidro.



Figura 5.7 – Aparato experimental com eletrodo sobre tampa de vidro.

Podemos observar a formação de plasma no nosso experimento na figura 5.8.

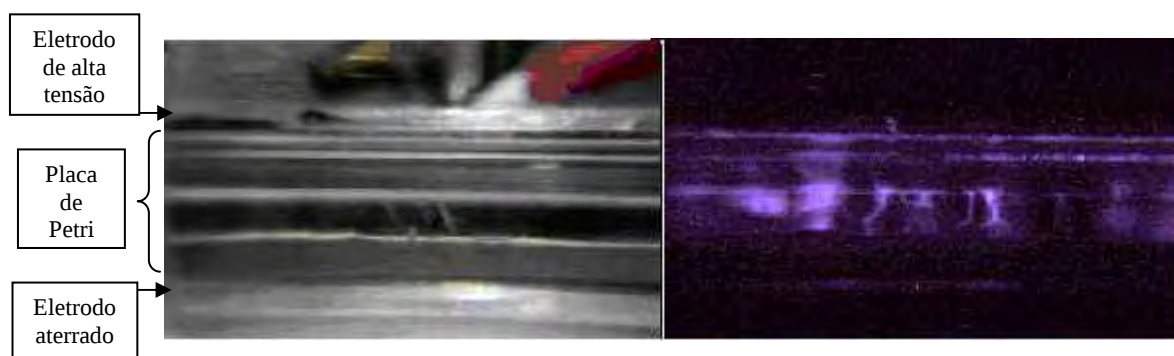


Figura 5.8 – Reator de plasma e formação de descarga DBD.

5.6.1 Tratamento de Suspensões semeadas no Agar

Usamos suspensão de *C. albicans* ATCC18804 na concentração de 10^5 /ml na escala de turvação de McFarland. Colocamos 100µl dessa suspensão em agar Sabouraud, dentro da placa de Petri. Colocamos a tampa de vidro e o eletrodo por

cima. Aguardamos 15 minutos para a suspensão aderir ao meio de cultura. Aplicamos 2, 5, 10 e 15 minutos de descarga DBD. Após 24h de incubação à 37°C, observamos os resultados.

5.7 – EXPERIMENTO COM ELETRODO DE ALTA TENSÃO SOBRE A PLACA DE PETRI

Visto que, para a configuração com a tampa de vidro sobre o eletrodo superior, era necessário abrir a placa de Petri, existia o risco de contaminação do meio de cultura. Por isso modificamos novamente a configuração do experimento, para que a tampa da própria placa de Petri de plástico servisse como dielétrico do sistema. Também, colocamos o cabo de alta tensão ligado ao eletrodo inferior, apoiado sobre um suporte e o eletrodo superior foi aterrado, garantindo maior segurança na realização dos experimentos. Assim, a distância entre o eletrodo e o meio de cultura foi de aproximadamente um centímetro. A figura 5.9 mostra a nova configuração.



Figura 5.9 – Aparato experimental com eletrodo sobre tampa de plástico.

Garantimos a formação de uma descarga sem arcos por manter o meio de cultura mais seco, por colocá-lo em fluxo laminar com a chama acesa por aproximadamente uma hora, antes de semear os microrganismos. Assim pudemos realizar experimentos

com diferentes microrganismos, como bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, esporos e fungos.

5.7.1 – Tratamento de *Candida albicans*

Preparamos uma suspensão com o fungo *C. albicans* ATCC18804 em água destilada na concentração de 10^4 células/ml, padronizada por espectrofotômetro (comprimento de onda de 530 nm e densidade ótica de 0,269), e diluímos em 10^{-1} , colocando 1ml dessa suspensão em 9ml de água destilada.

Semeamos 100µl dessa suspensão em Agar Sabouraud, dentro da placa de Petri. Aguardamos 15 minutos para a suspensão aderir ao meio de cultura. Aplicamos 2, 5, 10, 15 minutos de descarga DBD. Após 24h de incubação à 37°C, observamos os resultados.

Repetimos o experimento com o Agar mais seco (deixamos uma hora em fluxo laminar com a chama do bico de Bunsen acesa). Aplicamos 2, 5, 10, 15 e 20 minutos de descarga DBD. Após 24h de incubação à 37°C, observamos os resultados.

5.7.2 – Tratamento de *Escherichia coli*

Preparamos uma suspensão de *E. coli* ATCC23922 em água destilada na concentração de 10^4 células/ml, padronizada por espectrofotômetro (comprimento de onda de 590 nm e densidade ótica de 0,306). Diluímos em 10^{-4} , colocando 0,1ml dessa suspensão em 9,9ml de água destilada, e da suspensão resultante colocamos 0,1ml em 9,9ml de água destilada.

Semeamos 100µl dessa suspensão em Agar TSA, dentro da placa de Petri. Aguardamos 15 minutos para a suspensão aderir ao meio de cultura. Aplicamos 2, 5, 10, 15 e 20 minutos de descarga DBD. Após 24h de incubação à 37°C, observamos os resultados.

Repetimos o experimento com o Agar mais seco (deixamos uma hora em fluxo laminar com a chama do bico de Bunsen acesa). Aplicamos 2, 5, 10, 15 e 20 minutos de descarga DBD. Após 24h de incubação à 37°C, observamos os resultados.

5.7.3– Tratamento de *Staphylococcus aureus*

Preparamos uma suspensão de *S. aureus* ATCC 6538 em água destilada na concentração de 10^4 células/ml, padronizada por espectrofotômetro (comprimento de onda de 490 nm e densidade ótica de 0,363), e diluímos em 10^{-4} , colocando 0,1ml dessa suspensão em 9,9ml de água destilada, e da suspensão resultante, colocamos 0,1ml em 9,9ml de água destilada.

Semeamos 100µl dessa suspensão em agar TSA, dentro da placa de Petri. Aguardamos 15 minutos para a suspensão aderir ao meio de cultura. Aplicamos 2, 5, 10, 15 e 20 minutos de descarga DBD. Após 24h de incubação à 37°C, observamos os resultados.

Novamente, repetimos o experimento com o Agar mais seco (deixamos uma hora em fluxo laminar com a chama do bico de Bunsen acesa). Aplicamos 2, 5, 10, 15 e 20 minutos de descarga DBD. Após 24h de incubação à 37°C, observamos os resultados.

5.7.4 – Tratamento de *Bacillus Subtilis*

Preparamos uma suspensão de *B. subtilis* ATCC19659 em água destilada na concentração de 10^5 células/ml, padronizada por espectrofotômetro (comprimento de onda de 307 nm e densidade ótica de 0,166). Diluímos em 10^{-4} , colocando 0,1ml dessa suspensão em 9,9ml de água destilada, e novamente, colocando 0,1ml da suspensão resultante em 9,9ml de água destilada.

Deixamos a placa de Petri com Agar por uma hora em fluxo laminar com a chama do bico de Bunsen acesa, para secar a placa, antes de semear.

Semeamos 100µl dessa suspensão em agar TSA, dentro da placa de Petri. Aguardamos 15 minutos para a suspensão aderir ao meio de cultura. Aplicamos 2, 5,

10, 15 e 20 minutos de descarga DBD. Após 24h de incubação à 37°C, observamos os resultados.

5.8 – PREPARO DAS AMOSTRAS PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Para analisar o efeito do tratamento a plasma, gerado por descarga com barreira dielétrica, sobre a estrutura morfológica dos microrganismos, realizamos microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Usamos suspensão em água destilada dos microrganismos *C. albicans*, *E. coli*, *B. subtilis* e *S. aureus*, na concentração de 10^5 /ml na escala de turvação de McFarland. E, para garantir a fixação dos microrganismos, também usamos esses mesmos microrganismos semeados em meio de cultura líquido TSB e Sabouraud (para *C. albicans*).

Colocamos 10µl dessas suspensões sobre lamínulas de silício esterilizadas para análise de MEV dos microrganismo sem tratamento e com tratamento. Para o tratamento, as lamínulas foram colocadas dentro de placas de Petri adaptadas com os eletrodos. Aplicamos 15 minutos de descarga DBD, para cada microrganismo.

Para fixar os microrganismos sobre as lamínulas, colocamos sobre elas Glutaraldeído 2,5%, e aguardamos uma hora. Depois, realizamos a desidratação, mergulhando as lamínulas em tubos Falcon com frações crescentes de álcool (25%, 50% e 75% durante 20 minutos cada, e 100% durante uma hora). Depois, colocamos as lamínulas sobre gaze estéril dentro de uma placa de microtitulação com 12 poços, e deixamos *over night* na estufa a 37 °C.

Nas lamínulas já fixadas e desidratadas, foi efetuada a deposição de filme de ouro com espessura de 10 nm. E, em seguida, análise de microscopia eletrônica de varredura, com tensão de trabalho de 15 kV e distância de trabalho de 10 mm.

Analizamos e comparamos as imagens de MEV para observar se houve algum dano morfológico nos microrganismos tratados por descarga DBD.

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesse capítulo abordaremos os resultados obtidos através dos experimentos descritos no capítulo 5.

6.1 – EXPERIMENTO COM SUSPENSÕES EM PLACA DE MICROTITULAÇÃO

Através de nosso experimento com aplicação de plasma sobre placas de microtitulação contendo suspensão de microrganismos em suspensão salina e em água destilada, obtivemos os seguintes resultados.

6.1.1 Placa de microtitulação com suspensões em solução salina

Através de nosso experimento com aplicação de plasma sobre placas de microtitulação contendo suspensão de microrganismos em solução salina, obtivemos gráfico da Figura 6.1, o qual mostra a figura de Lissajous (carga transportada nas microdescargas em função da tensão periódica aplicada).

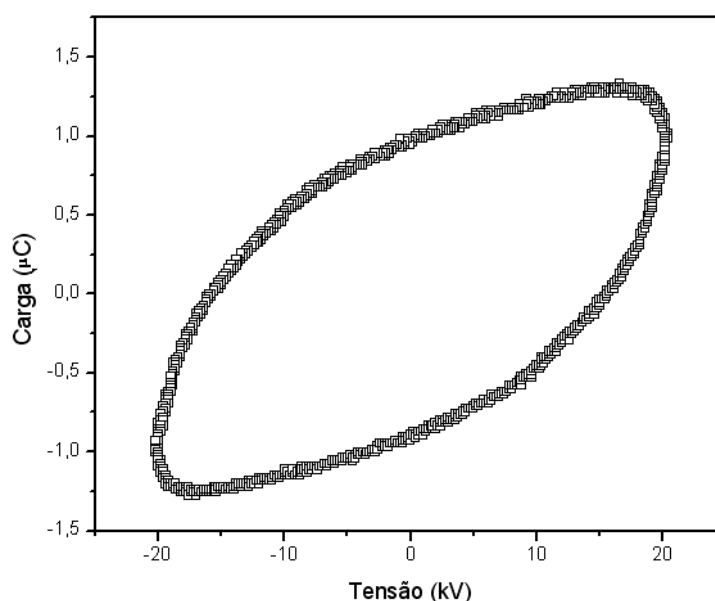


Figura 6.1 – Figura de Lissajous para o experimento com placa de microtitulação contendo suspensão em solução salina, com área compreendida de 92,51mJ.

A determinação experimental da potência consumida em cada ciclo da descarga foi realizada pelo método da figura de Lissajous. A área interna da figura formada em um ciclo corresponde à energia elétrica distribuída ao plasma num período. Assim a potência consumida em um ciclo foi obtida pelo produto entre a frequência da tensão ac (60 Hz) e a área interna da figura de Lissajous dividida por 1,5 períodos, resultando em 3,7W.

Porém com esse método de tratamento, não observamos nenhum efeito do plasma nas culturas celulares. Elas cresceram iguais ao controle (sem aplicação de plasma).

Uma possível explicação para esse resultado é que o soro utilizado nos tratamentos é condutor, portando a descarga acontece somente no espaço de ar. Nesse espaço há formação de ozônio que é muito ativo quimicamente. Porém, o efeito dele é localizado somente numa camada fina de microrganismos que estão na superfície. No volume dos poços da placa não acontece nada porque o ozônio não difunde para dentro do soro.

Na descarga, também são formados fótons UV que penetram no soro, mas aparentemente não teve nenhum efeito no nosso experimento com *C. albicans*.

6.1.2 Placa de microtitulação com suspensões em água destilada

Através de nosso experimento com aplicação de plasma sobre placas de microtitulação contendo suspensão de microrganismos em água destilada, obtivemos a figura de Lissajous (Figura 6.2), cuja potência foi calculada em 0,23W.

Novamente observamos que as culturas cresceram iguais ao controle. O plasma não teve nenhum efeito observável no crescimento das culturas celulares.

Novamente acreditamos que o motivo desse resultado seja a dificuldade do ozônio penetrar no volume de microrganismos, e formação insignificativa de UV na gama germicida.

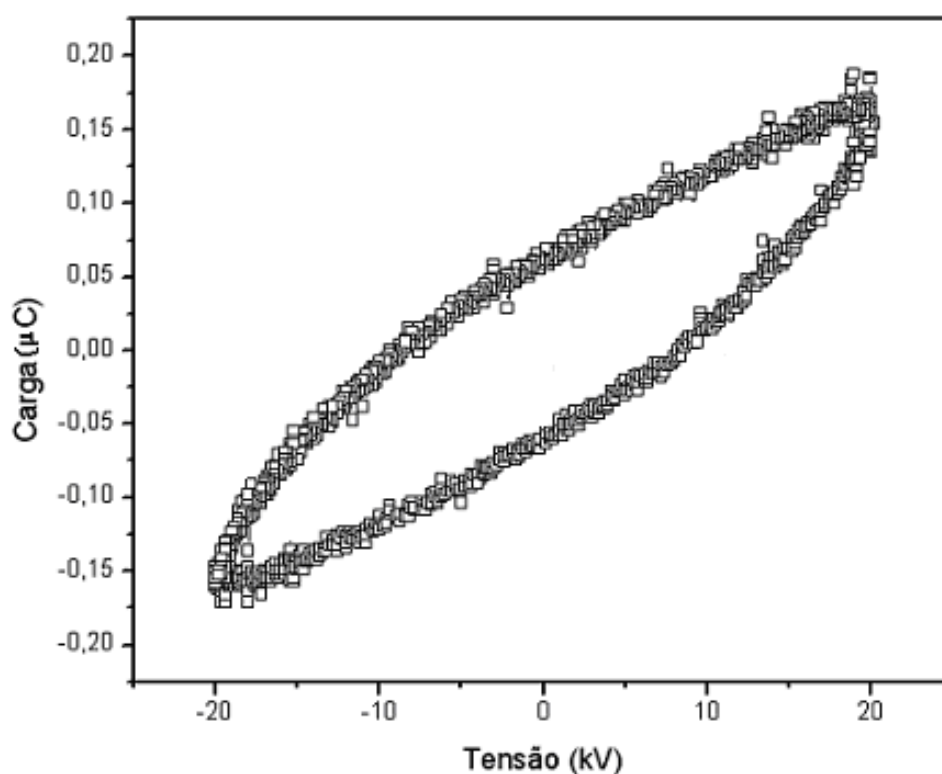


Figura 6.2 – Figura de Lissajous para o experimento com placa de microtitulação contendo suspensão em água, com área compreendida de 5,83mJ.

6.2 – EXPERIMENTO COM ELETRODO DE ALTA TENSÃO DENTRO DA PLACA DE PETRI

Através de nosso experimento com aplicação de plasma sobre placas de Petri com eletrodo superior adaptado internamente à placa e eletrodo inferior aterrado, obtivemos os seguintes resultados.

6.2.1 Teste do Agar

No experimento de aplicação de descarga DBD no Agar, obtivemos a figura de Lissajous, e calculamos a potência de aproximadamente 1,4W. Porém, devido a

condutividade do agar, houve muita formação de arcos, sendo que a figura de Lissajous apresentou uma forma bem irregular.

Conforme podemos observar na figura 6.3, após 24 horas de incubação, os microrganismos cresceram normalmente. O que comprova que não houve danos no agar.

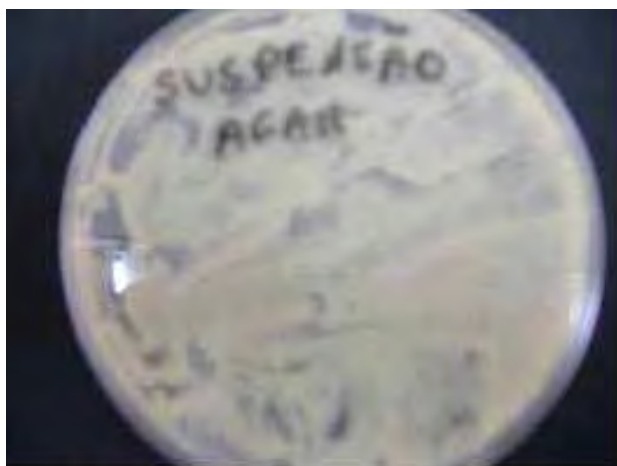


Figura 6.3 – Crescimento de *C. albicans* no Agar tratado.

6.2.2 Tratamento de Suspensões semeadas no Agar

Para os experimentos de tratamento de suspensões semeadas no Agar, obtivemos a figura de Lissajous (Figura 6.4) e calculamos a potência de aproximadamente 2,5W. Também observamos nessa figura a presença de bastante ruído, devido aos arcos formados entre o eletrodo superior e o Agar condutor.

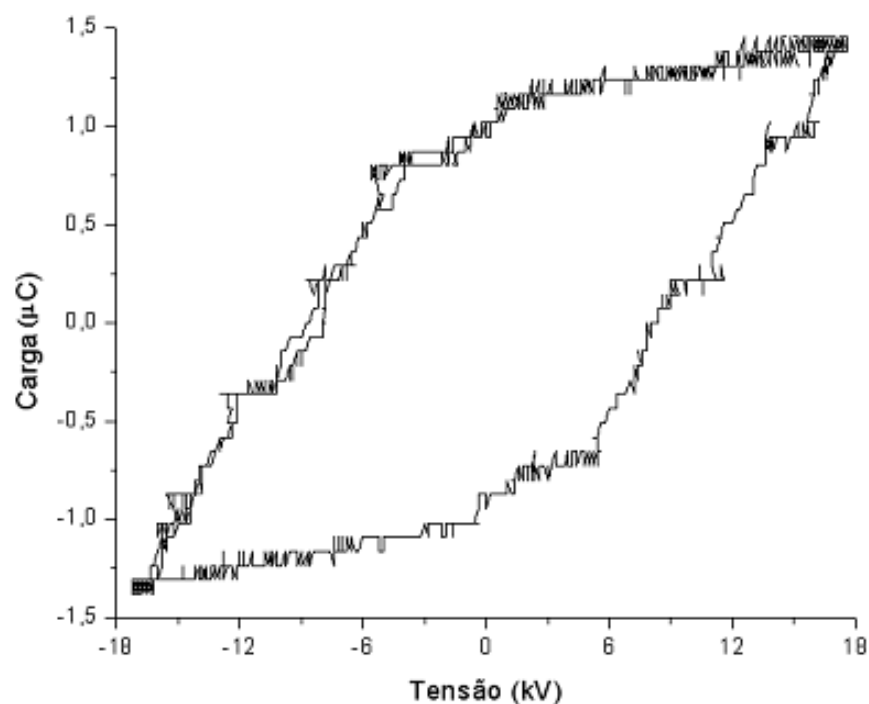


Figura 6.4 – Figura de Lissajous para o tratamento em suspensões semeadas, com área compreendida de 62,90mJ.

Na Figura 6.5 podemos observar que houve redução no número de UFC (unidade formadora de colônias). Porém, ainda foi necessário aprimorar a técnica de tratamento a fim de obtermos melhores resultados (aumentar tempo e potência, e diminuir concentração inicial para conseguir realizar a contagem de microrganismos). Como as colônias ficaram acumuladas em algumas regiões da placa de Petri, não foi possível fazer a contagem das UFC. E também a descarga foi bem instável devido à formação de arcos.

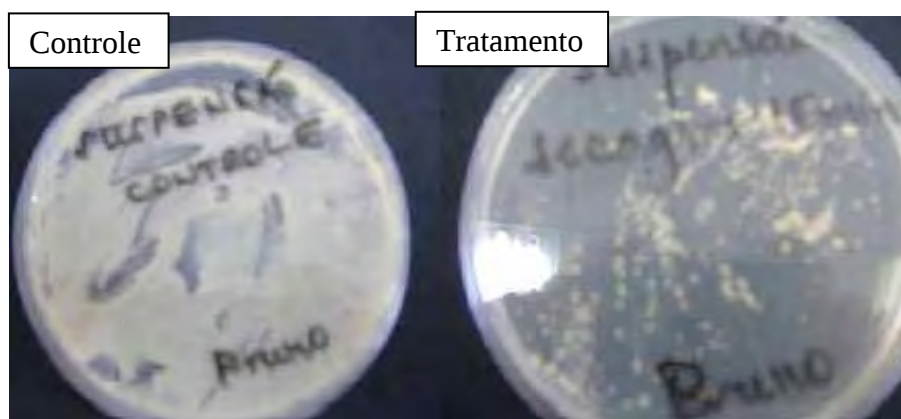


Figura 6.5 – Crescimento de *C. albicans* em suspensões semeadas tratadas com plasma, comparado com suspensões semeadas sem tratamento.

6.2.3 Tratamento de suspensões em lamínula

Para os experimentos de tratamento de suspensões sobre lamínulas de vidro, obtivemos a figura de Lissajous (Figura 6.6) e calculamos a potência de aproximadamente 1,4W. Existem interferências causadas por arcos devido à presença de solução salina.

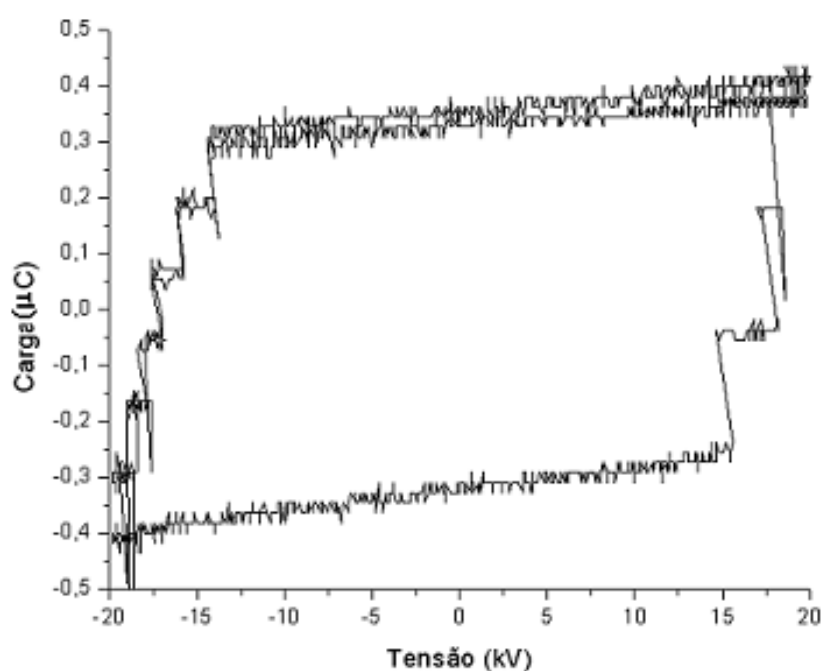


Figura 6.6 – Figura de Lissajous para o tratamento em suspensões sobre lamínulas, com área compreendida de 34,87mJ.

A figura 6.7 mostra o resultado comparado ao controle, onde a lamínula não foi submetida à aplicação de descarga.

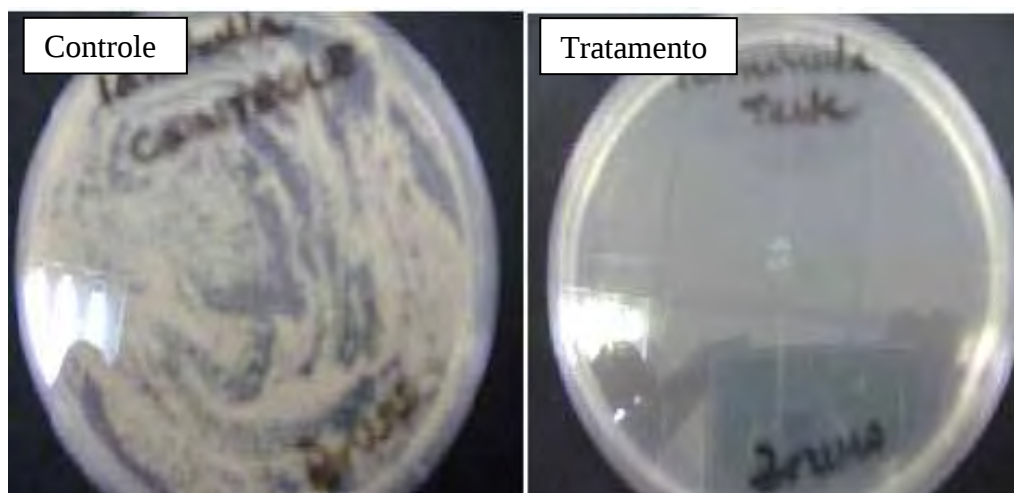


Figura 6.7 – Crescimento de *C. albicans* em suspensões sobre lamínulas tratadas com plasma, comparada com suspensões sobre lamínulas sem tratamento.

O resultado obtido foi o crescimento de nenhum microrganismo. Porém, visto que estamos estudando formas vegetativas (e não esporos), não podemos afirmar com certeza, que o método de esterilização teve total eficiência. Também esse resultado não se aproxima da realidade das contaminações de instrumentos.

6.2.4 Tratamento em microrganismos crescidos

Através do experimento de tratamento de microrganismos crescido, foi obtida a figura de Lissajous e foi calculada a potência de aproximadamente 1,1W. Porém, essa potência não pode ser considerada bem distribuída no volume, devido a grande número de arcos. A descarga se tornou bem instável e a figura de Lissajous bem irregular.

Observamos que nesse caso, a aplicação da descarga não teve nenhum resultado, visto que os microrganismos cresceram normalmente (Veja figura 6.8).



Figura 6.8 – Crescimento de *C. albicans* tratadas com plasma, comparado culturas sem tratamento.

Uma possível explicação para esse fato é que estamos aplicando a descarga num volume de microrganismos, não havendo penetração dos agentes esterilizantes, como ozônio e UV, que têm um efeito apenas localizado numa fina camada da superfície da cultura de microrganismo, não resultando em esterilização.

6.3 EXPERIMENTO COM ELETRODO DE ALTA TENSÃO SOBRE TAMPA DE VIDRO

Através de nosso experimento com aplicação de plasma sobre placas de Petri com eletrodo de alta tensão sobre uma tampa de vidro e eletrodo inferior aterrado, e contendo suspensão de microrganismos em solução salina, obtivemos os seguintes resultados.

6.3.1 Tratamento de Suspensões semeadas no Agar

A figura 6.9 Apresenta a figura de Lissajous medida neste experimento. Através dessa figura, calculamos a potência de aproximadamente 2,7W.

Na Figura 6.10 podemos observar que, conforme aumentamos o tempo do tratamento por plasma, houve redução no número de unidades formadoras de colônias (UFC). E no tempo de 15 minutos houve esterilização completa da placa.

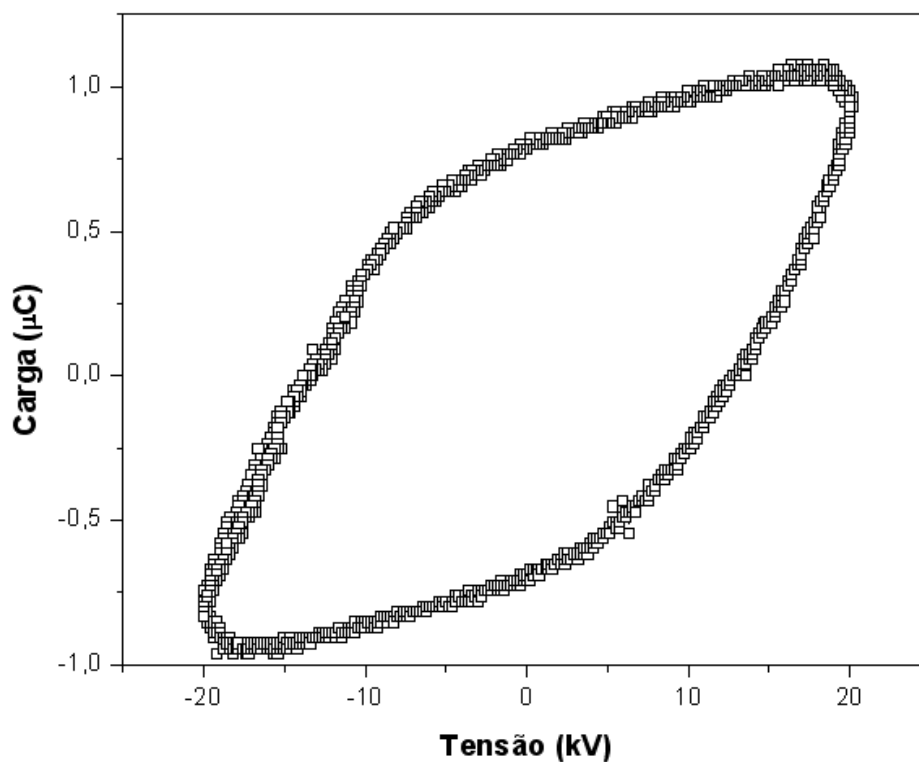


Figura 6.9 – Figura de Lissajous para o tratamento em suspensões semeadas com eletrodo sobre tampa de vidro, com área compreendida de 66,42mJ.

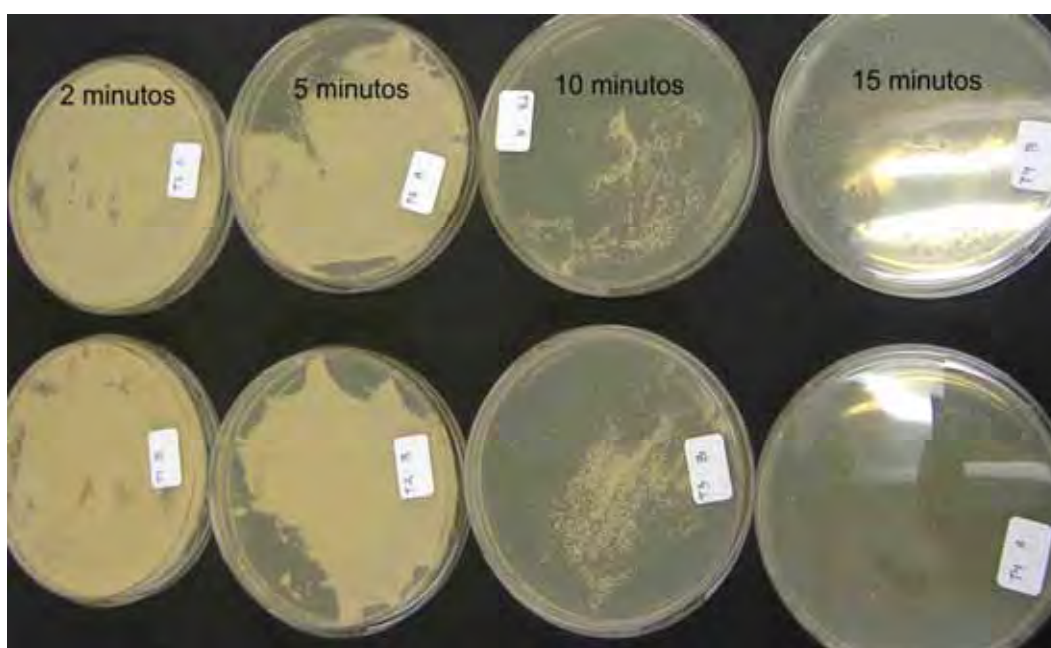


Figura 6.10 – Crescimento de *C. albicans* em suspensões semeadas tratadas com plasma em 2, 5, 10 e 15 minutos (em duplicata).

Porém, as colônias ficaram acumuladas em regiões da placa de Petri, não sendo possível fazer a contagem das Unidades formadoras de colônias (UFC). Por isso é necessário fazer a semeadura inicial com uma menor concentração de microrganismos, para podermos quantificar nosso método. Além disso, modificamos o reator para não precisar abrir a tampa da placa de Petri durante o tratamento, garantindo assim a ausência de contaminação.

6.4 – EXPERIMENTO COM ELETRODO DE ALTA TENSÃO SOBRE A PLACA DE PETRI

Através de nosso experimento com aplicação de plasma sobre placas de Petri com eletrodo de alta tensão sobre a tampa da placa e eletrodo inferior aterrado, contendo suspensão de microrganismos em solução de água destilada, obtivemos a figura de Lissajous (Figura 6.11), e calculamos a potência de aproximadamente 1,1W.

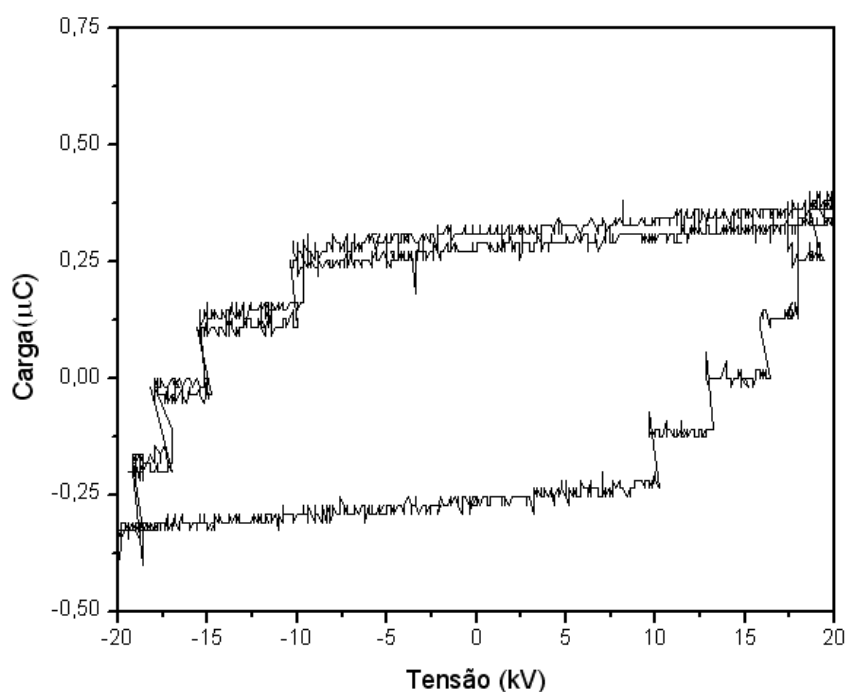


Figura 6.11 – Figura de Lissajous para o tratamento em suspensões semeadas com eletrodo sobre tampa da placa de Petri, com área compreendida de 26,81mJ.

6.4.1 Tratamento de *Candida albicans*

Pudemos comparar os resultados de dois experimentos com *C. albicans*, um com Agar úmido e outro com Agar seco em fluxo laminar.

6.4.1.1 Tratamento com Agar úmido

No tratamento de *C. albicans* semeada em meio de cultura sem secagem em fluxo laminar, pudemos observar que houve redução no número de UFC (veja a Figura 6.12), mas como houve a formação de arcos devido à presença de umidade na placa, a descarga não foi efetiva para esterilização do meio, visto que em presença de arcos a energia da descarga é localizada preferencialmente o interior do arco.

A tabela 6.1 mostra os resultados obtidos nas contagens de UFC de *C. albicans*, tratada com 2, 5, 10 e 15 minutos. Também apresentamos os resultados do logaritmo de morte (KL) e porcentagem de morte (IF). As experiências foram feitas com duas repetições, assim pudemos analisar a média das repetições. Como a descarga DBD em meio úmido não era estável, não observamos boa reprodutibilidade nos valores. Por isso refizemos o experimento deixando o Agar secar em fluxo laminar com a chama do bico de bunsen acesa.

Tabela 6.1 – Tratamento de *C. albicans* em agar úmido

Tratamento 1	UFC	IF(%)	KL
Controle	2292	Ideal = 100	Ideal = 3,36
2 minutos	2104	8,2	0,037
5 minutos	1888	17,6	0,084
10 minutos	1516	33,8	0,179
15 minutos	134	94,1	1,233

Tratamento 2	UFC	IF(%)	KL
Controle	3016	Ideal = 100	Ideal = 3,48
2 minutos	2964	1,7	0,007
5 minutos	2745	8,9	0,041
10 minutos	2412	20,0	0,097
15 minutos	1980	34,3	0,183

Média	UFC	IF(%)	KL
Controle	2654	Ideal = 100	Ideal = 3,42
2 minutos	2534	4,5	0,020
5 minutos	2316,5	12,7	0,059
10 minutos	1964	25,9	0,131
15 minutos	1057	60,1	0,340

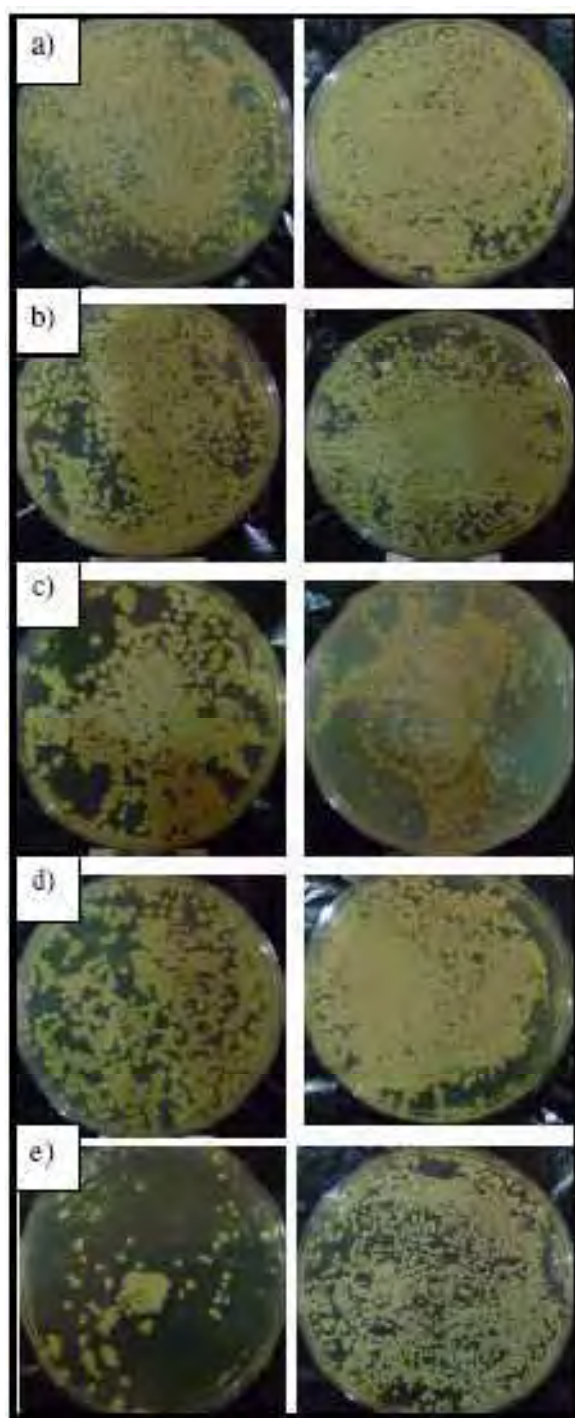


Figura 6.12 – Crescimento de *C. albicans* com duplicata do a) controle, e com tratamentos de b) 2 minutos, c) 5 minutos, d) 10 minutos, e) 15 minutos.

O gráfico da Figura 6.13 mostra a curva de sobrevivência por aplicação do plasma de descarga com barreira dielétrica desse experimento. Conforme explicado na Tabela 6.1, os resultados não tiveram boa reprodutibilidade, e não foi alcançada esterilização das amostras.

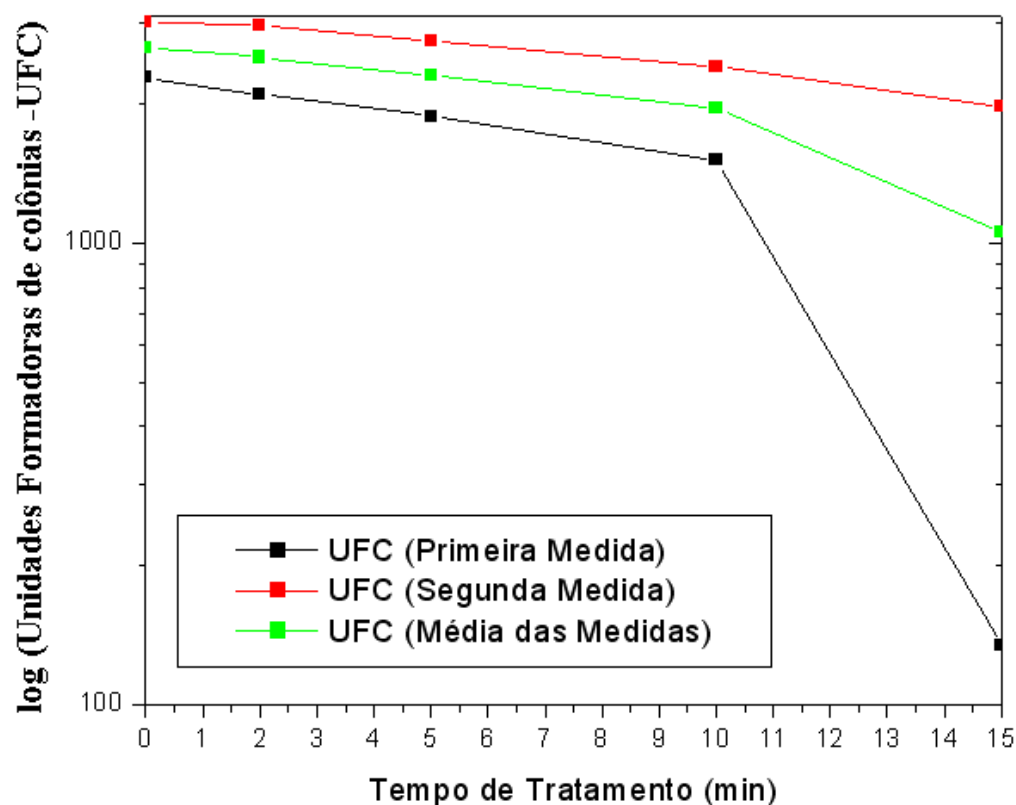


Figura 6.13 – Curva de sobrevivência de *C. albicans* ATCC18804.

Pudemos observar que esse processo não foi eficiente em esterilizar as amostras de *C. albicans* em até 15 minutos de tratamento. Porém observamos boa reprodutibilidade no comportamento da curva do processo de desinfecção.

6.4.1.2 Tratamento com Agar seco

Com o tratamento de amostras semeadas em Agar seco em fluxo laminar com a chama do bico de bunsen acesa, houve rápida redução no número de UFC de *C. albicans*. Isso porque com a ausência de umidade no meio, não teve formação de arcos, garantindo uma descarga bem distribuída no volume. Assim, com 10 minutos de tratamento, já observamos a esterilização completa da placa (conforme observamos na Figura 6.14).

A tabela 6.2 mostra os resultados obtidos nas contagens de UFC de *C. albicans*, tratada com 2, 5, 10, 15 e 20 minutos, com repetição. Analisamos os resultados do

logaritmo de morte (KL) e porcentagem de morte (IF) dos experimentos e da média, observamos que o tratamento alcançou os parâmetros ideais de esterilização, num tempo relativamente curto. E os resultados apresentaram boa reprodutibilidade. Também pudemos calcular o tempo de redução decimal (D-valor) de 4,2 minutos.

Tabela 6.2 – Tratamento de *C. albicans* em Agar seco

Tratamento 1	UFC	IF(%)	KL
Controle	3576	Ideal = 100	Ideal = 3,553
2 minutos	1620	54,6	0,344
5 minutos	8	99,7	2,650
10 minutos	0	100	3,553
15 minutos	0	100	3,553
20 minutos	0	100	3,553

Tratamento 2	UFC	IF(%)	KL
Controle	3340	Ideal = 100	Ideal = 3,524
2 minutos	735	77,9	0,657
5 minutos	3	99,9	3,047
10 minutos	0	100	3,524
15 minutos	0	100	3,524
20 minutos	0	100	3,524

Média	UFC	IF(%)	KL
Controle	3458	Ideal = 100	Ideal = 3,539
2 minutos	1177,5	65,9	0,468
5 minutos	5,5	99,8	2,798
10 minutos	0	100	3,539
15 minutos	0	100	3,539
20 minutos	0	100	3,539

O gráfico da Figura 6.15 mostra a curva de sobrevivência por aplicação do plasma de descarga com barreira dielétrica, segundo os dados da tabela 6.2.

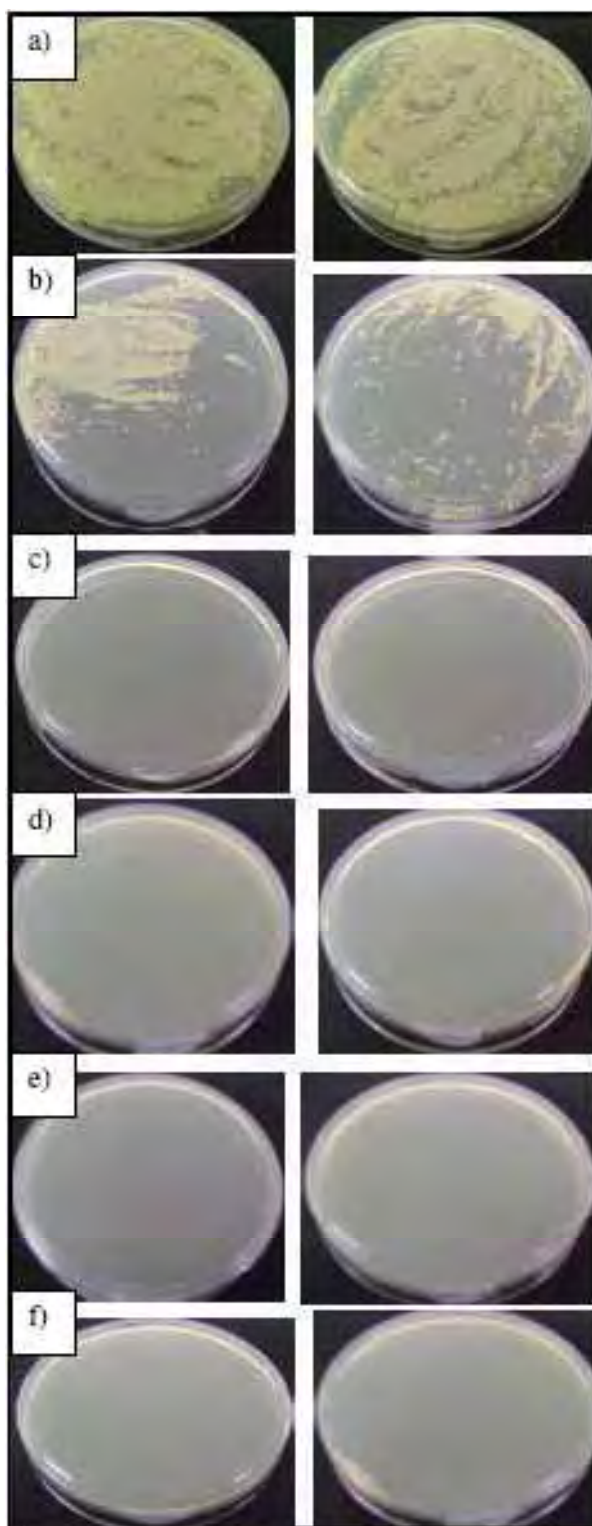


Figura 6.14 – Crescimento de *C. albicans* com duplicata do a) controle, e com tratamentos de b) 2 minutos, c) 5 minutos, d) 10 minutos, e) 15 minutos, f) 20 minutos.

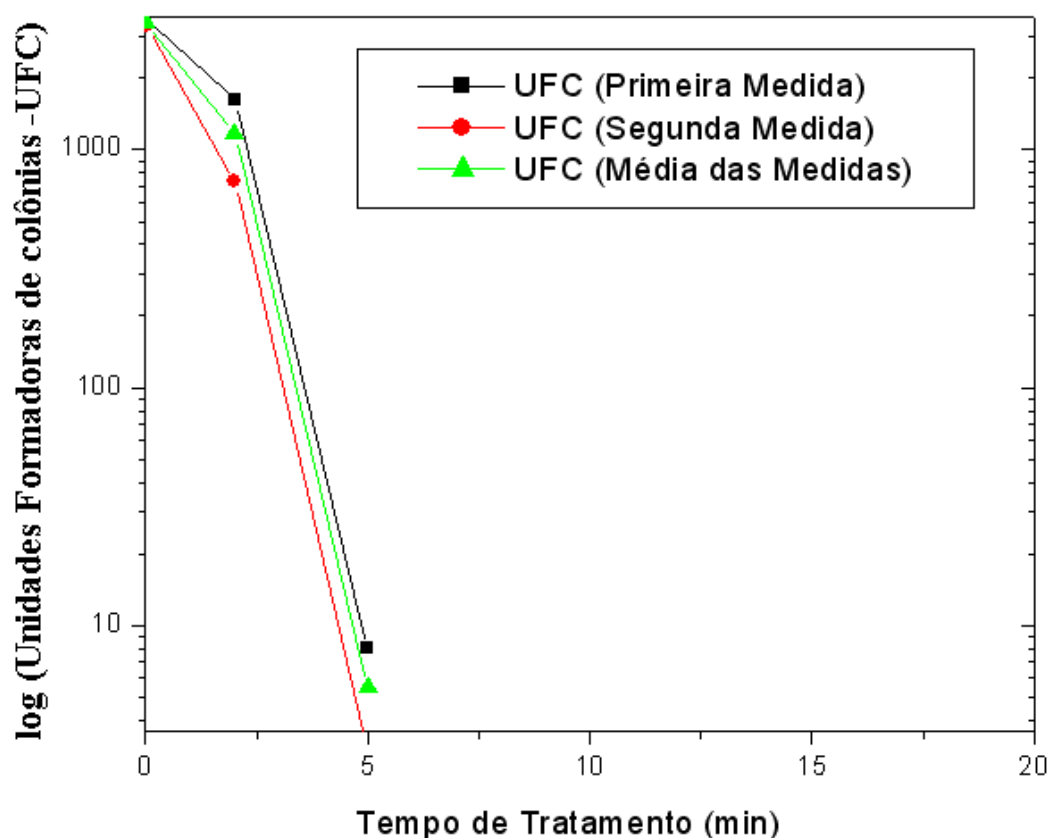


Figura 6.15 – Curva de sobrevivência de *C. albicans* ATCC18804.

Assim, pudemos concluir que o tratamento com Agar seco foi eficiente para esterilizar as culturas de *C. albicans*.

6.4.1.3 Análise da estrutura e morfologia de *Candida albicans*

C. albicans é uma espécie de fungo diplóide. Em determinadas condições ele se desenvolve como uma pseudo-hifa, que se caracteriza por uma célula alongada que se propaga por uma gemulação unipolar, apresentando um aspecto de um cordão de contas (ver Figura 6.16).

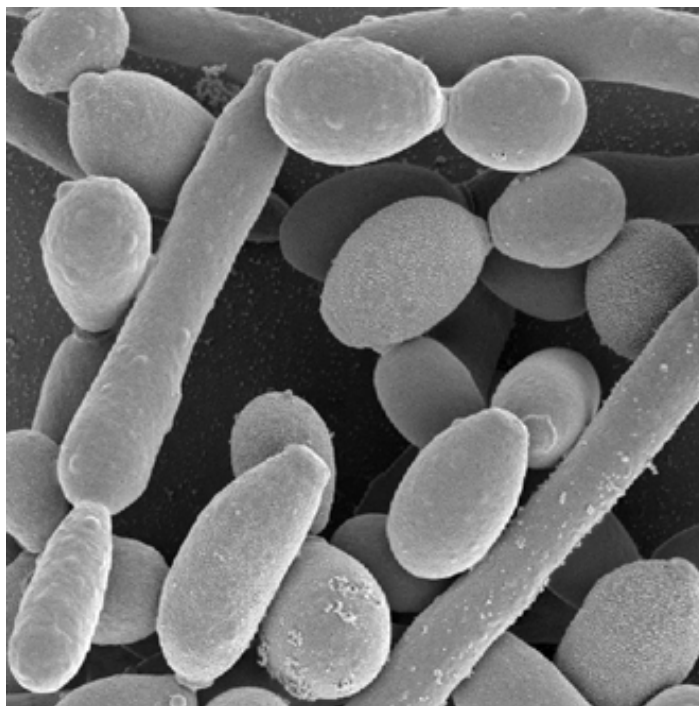


Figura 6.16 – Exemplo de MEV de microrganismo *C. albicans* semeados em meio de cultura com aumento de 7500 vezes. (1cm equivale a 1 μ m)

Realizamos análise de MEV das amostras de *C. albicans* para observar se o tratamento causou alguma alteração na morfologia dos microrganismos.

Pudemos observar pelas Figuras Figura 6.17, 6.18 e 6.19 a comparação entre as amostras tratadas com 15 minutos de descarga DBD e as amostras sem tratamento.

Na Figura 6.17 observamos as amostras com um aumento de 2000 vezes. Através de menores aumentos, observamos que os microrganismos estavam homogeneamente distribuídos na lamínula, porém formando ilhas, principalmente nos microrganismos em suspensão de água destilada. Podemos observar que as amostras tratadas, tanto as semeadas em TSB (a) quanto em solução de água destilada (c), apresentaram as células mais murchas e quebradas (indicado pela seta vermelha), quando comparado com as amostras sem tratamento (b e d).

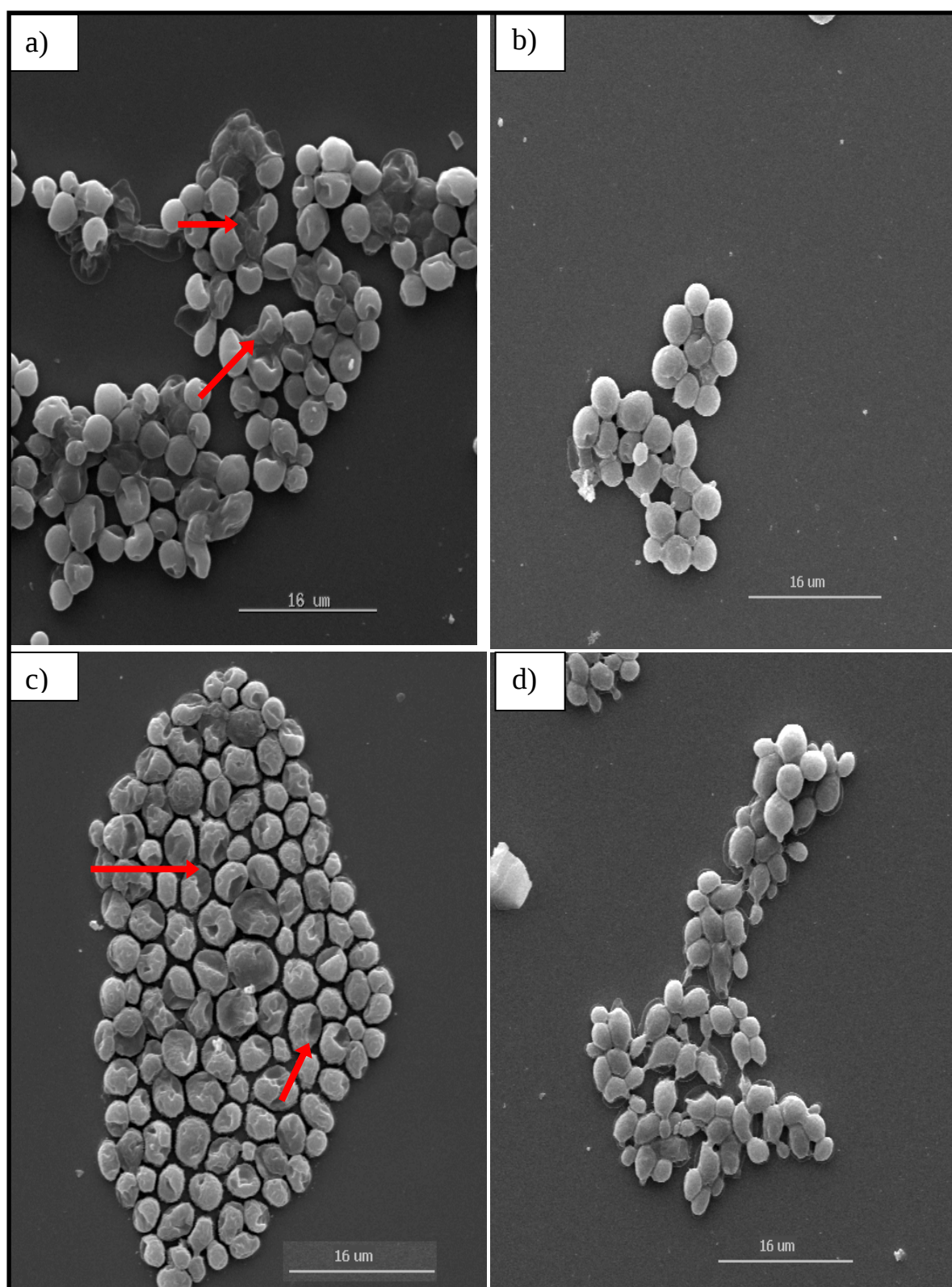


Figura 6.17 – MEV com aumento de 2000x (1cm equivale a 3,2 μm) de *C. albicans*:
(a) tratada em TSB, b) controle em TSB, c) tratada em água, d) controle em água.

Na Figura 6.18, observamos as amostras com um aumento de 7500 vezes. Novamente, podemos observar que as amostras tratadas apresentam as células mais murchas e quebradas, quando comparado com as amostras sem tratamento (embora algumas células da amostra sem tratamento apresentem deformidades, provavelmente, pelo método de fixação usado). Também observamos nas amostras em suspensão de água destilada a formação de uma certa cápsula e pseudo-hifas (indicado pela seta azul), tanto nas amostras tratadas quanto nas sem tratamento.

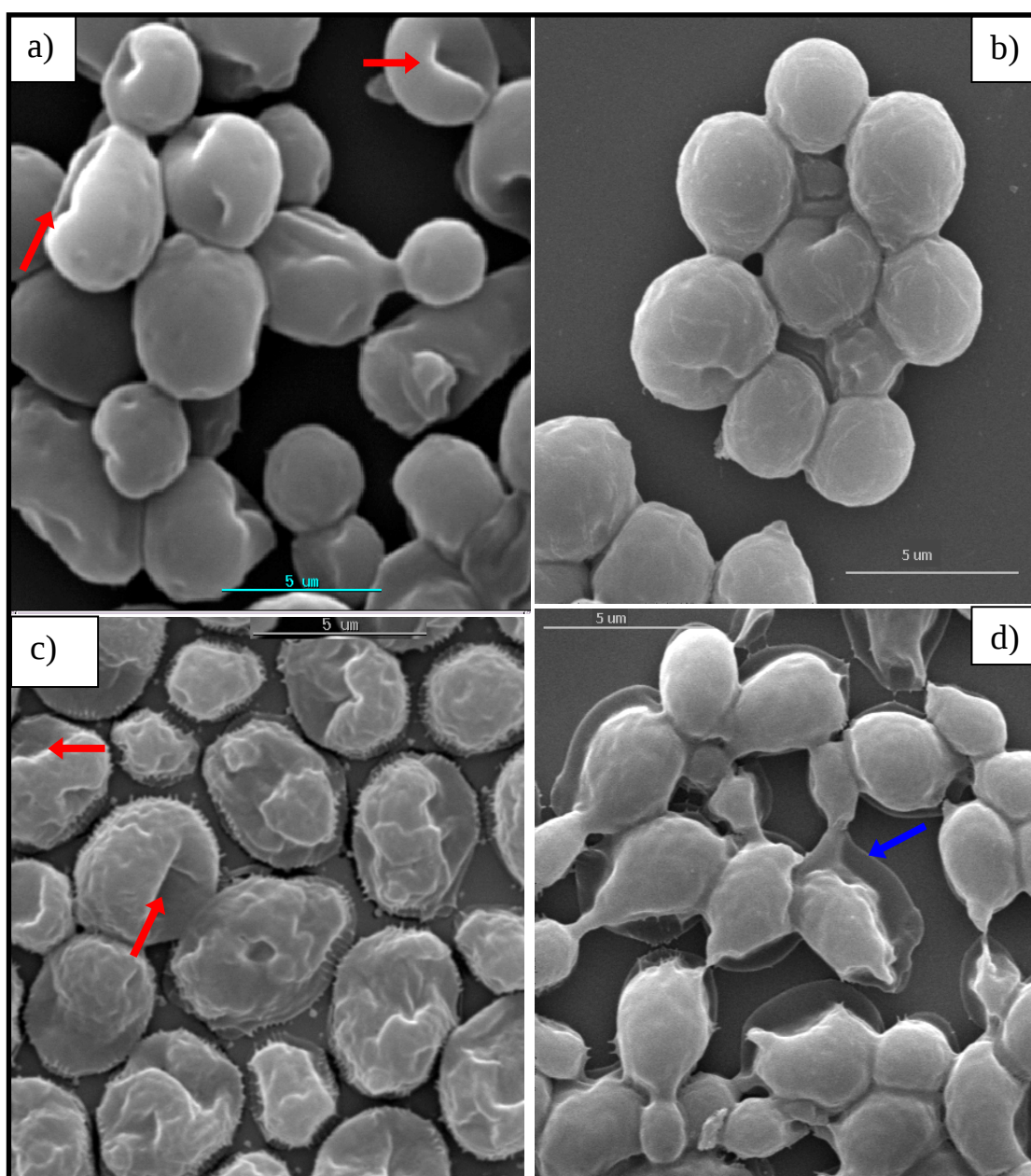


Figura 6.18 – MEV com aumento de 7500x (1cm equivale a 1 µm) de *C. albicans*:
(a) tratada em TSB, b) controle em TSB, c) tratada em água, d) controle em água.

Na Figura 6.19, observamos as amostras em suspensão de água destilada com um aumento de 15000 vezes. A formação das pseudo-hifas e a diferença entre as amostras tratadas e sem tratamento ficam mais evidentes.

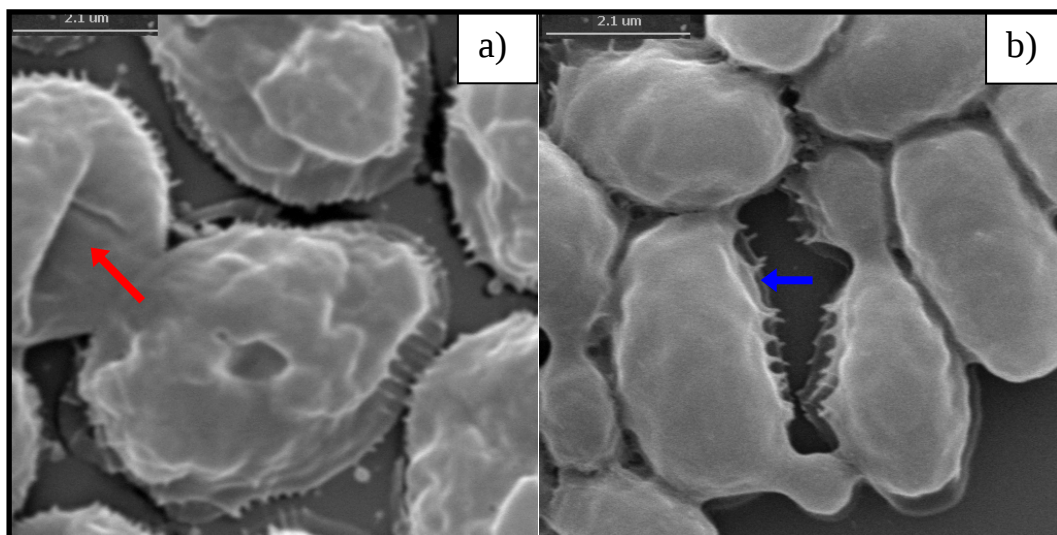


Figura 6.19 – MEV com aumento de 15000x (1cm equivale a 0,42 μm) de *C. albicans*: a) tratada em água, b) controle em água.

Pudemos notar que o fungo *C. albicans* apresentou sua estrutura danificada após o tratamento com descarga DBD. Comparando com os resultados obtidos pelas curvas de sobrevivência, observamos que com esse tempo de tratamento (quinze minutos) pudemos conseguir esterilização completa das placas. Assim, observamos que a descarga DBD causa alterações na morfologia desses microrganismos, e essas alterações podem ser as principais responsáveis pela inativação. Essas alterações se devem principalmente devido às reações das espécies químicas geradas na descarga com a membrana dos microrganismos.

6.4.2 Tratamento de *Escherichia coli*

Pudemos comparar os resultados de dois experimentos com *E. coli*, um com Agar úmido e outro com Agar seco em fluxo laminar.

6.4.2.1 Tratamento com Agar úmido

Através do tratamento de *E. coli* semeada em meio de cultura sem secagem em fluxo laminar, pudemos obter os dados da tabela 6.3, que mostra os resultados de duas repetições e da média nas contagens de UFC de *E. coli*, tratada com 2, 5, 10, e 15 minutos. Assim pudemos comparar os resultados do logaritmo de morte (KL) e porcentagem de morte (IF). Esses resultados obtidos no tratamento de *E. coli* são apresentados na Figura 6.20, onde pudemos observar que houve redução no número de UFC nas amostras de *E. coli*, conforme aumentamos o tempo de tratamento por plasma.

Tabela 6.3 – Tratamento de *E.coli* com Agar úmido.

Tratamento 1	UFC	IF(%)	KL
Controle	1092	Ideal = 100	Ideal = 3,038
2 minutos	332	69,6	0,517
5 minutos	305	72,1	0,554
10 minutos	267	75,5	0,612
15 minutos	155	85,8	0,848

Tratamento 2	UFC	IF(%)	KL
Controle	1003	Ideal = 100	Ideal = 3,001
2 minutos	436	56,5	0,362
5 minutos	341	66,0	0,468
10 minutos	336	66,5	0,475
15 minutos	290	71,1	0,539

Média	UFC	IF(%)	KL
Controle	1047,5	Ideal = 100	Ideal = 3,020
2 minutos	384	63,3	0,436
5 minutos	323	69,2	0,511
10 minutos	301,5	71,2	0,541
15 minutos	222,5	78,6	0,673

O gráfico da Figura 6.21 mostra a curva de sobrevivência da *E. coli* por aplicação do plasma de descarga com barreira dielétrica.

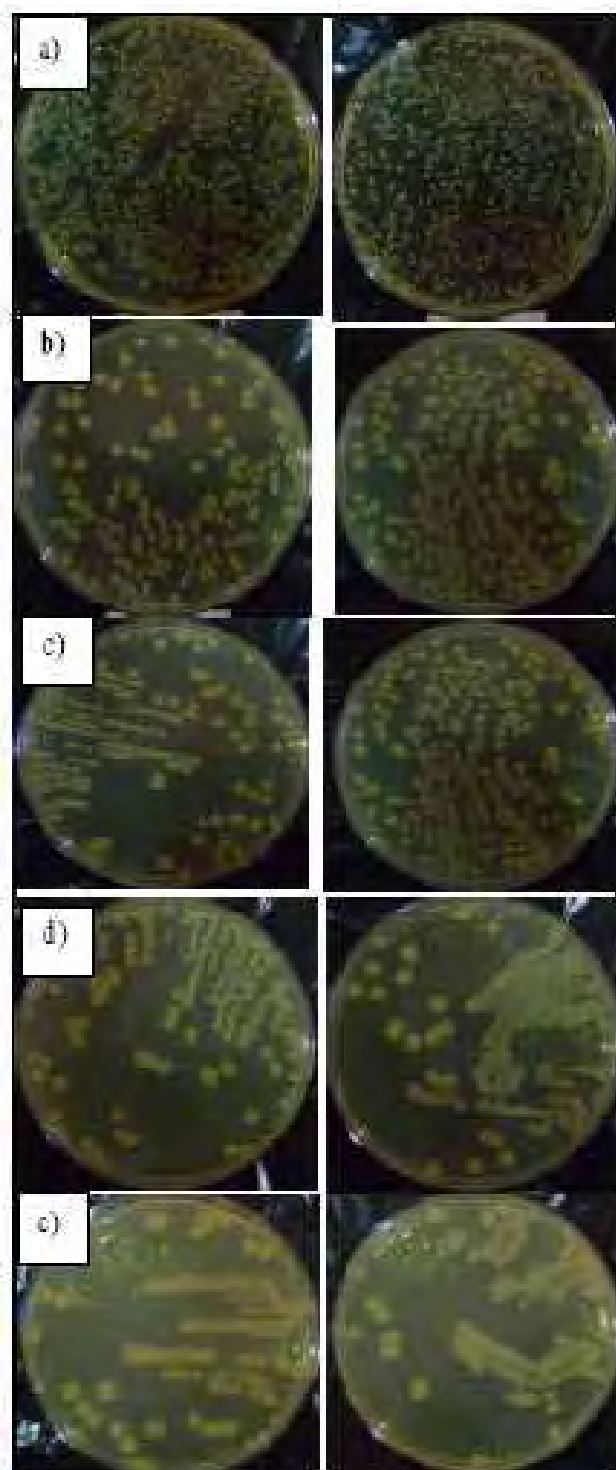


Figura 6.20 – Crescimento de *E. coli* com duplicata do a) controle, e com tratamentos de b) 2 minutos, c) 5 minutos, d) 10 minutos, e) 15 minutos.

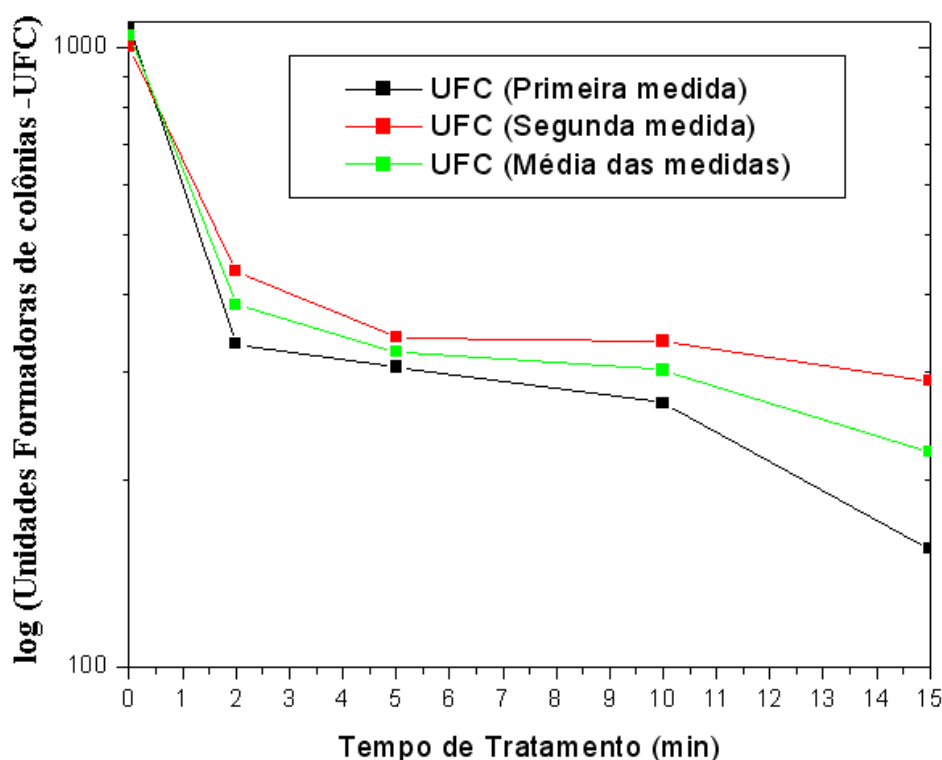


Figura 6.21 – Curva de sobrevivência de *E.coli* ATCC23922.

Apesar de o microrganismo *E. coli* ser uma bactéria Gram-negativa, cuja membrana é mais fina, e teoricamente, segundo a literatura, mais fácil de ser esterilizada, não conseguimos alcançar a esterilização completa com quinze minutos de tratamento. Isso pode ter ocorrido devido à presença de umidade nos meios de cultura que não foram colocados em fluxo laminar, resultando na formação de arcos durante a descarga.

Porém, observamos uma diminuição no número de microrganismos com o aumento do tempo de tratamento, e com dez minutos de tratamento já conseguimos alcançar cerca de 70% de inativação. Sendo, portanto, um método de desinfecção.

Conforme observado na Figura 6.21, no processo de inativação de *E. coli*, o número de UFC cai no início rapidamente, porém, acima de cinco minutos observa-se redução gradual de UFC. Esse comportamento se aproxima do modelo proposto por Moisan et al. 2001.

Porém, para confirmar ou descartar o efeito de esterilização por descarga DBD de bactérias Gram-negativas precisaríamos realizar mais testes com uso de agar seco em fluxo laminar.

6.4.2.2 Tratamento com Agar seco

A amostra de *E. coli*, semeadas em Agar seco durante aproximadamente uma hora em fluxo laminar com a chama do bico de Bunsen acesa, apresentou rápida redução no número de UFC após o tratamento com a descarga DBD, conforme observamos na Figura 6.22.

A tabela 6.4 mostra os resultados obtidos nas contagens de UFC de *E. coli*, tratada com 2, 5, 10, 15 e 20 minutos, com repetição. A tabela 6.4 também apresenta os resultados do logaritmo de morte (KL) e porcentagem de morte (IF) dos experimentos e da média.

Os resultados apresentaram boa reprodutibilidade. Também pudemos calcular o tempo de redução decimal (D-valor) de 3,25 minutos.

Tabela 6.4 – Tratamento de *E. coli* em Agar seco

Tratamento 1	UFC	IF(%)	KL
Controle	639	Ideal = 100	Ideal = 2,805
2 minutos	147	77,0	0,638
5 minutos	7	98,9	1,960
10 minutos	3	99,5	2,328
15 minutos	2	99,7	2,504
20 minutos	1	99,8	2,805

Tratamento 2	UFC	IF(%)	KL
Controle	596	Ideal = 100	Ideal = 2,775
2 minutos	74	87,6	0,906
5 minutos	5	99,2	2,076
10 minutos	2	99,7	2,474
15 minutos	2	99,7	2,474
20 minutos	0	100	2,775

Média	UFC	IF(%)	KL
Controle	617,5	Ideal = 100	Ideal = 2,791
2 minutos	110,5	82,1	0,747
5 minutos	6	99,0	2,012
10 minutos	2,5	99,6	2,392
15 minutos	2	99,7	2,490
20 minutos	0,5	99,9	3,092

O gráfico da Figura 6.23 mostra a curva de sobrevivência por aplicação do plasma de descarga com barreira dielétrica, segundo os dados da tabela 6.4.

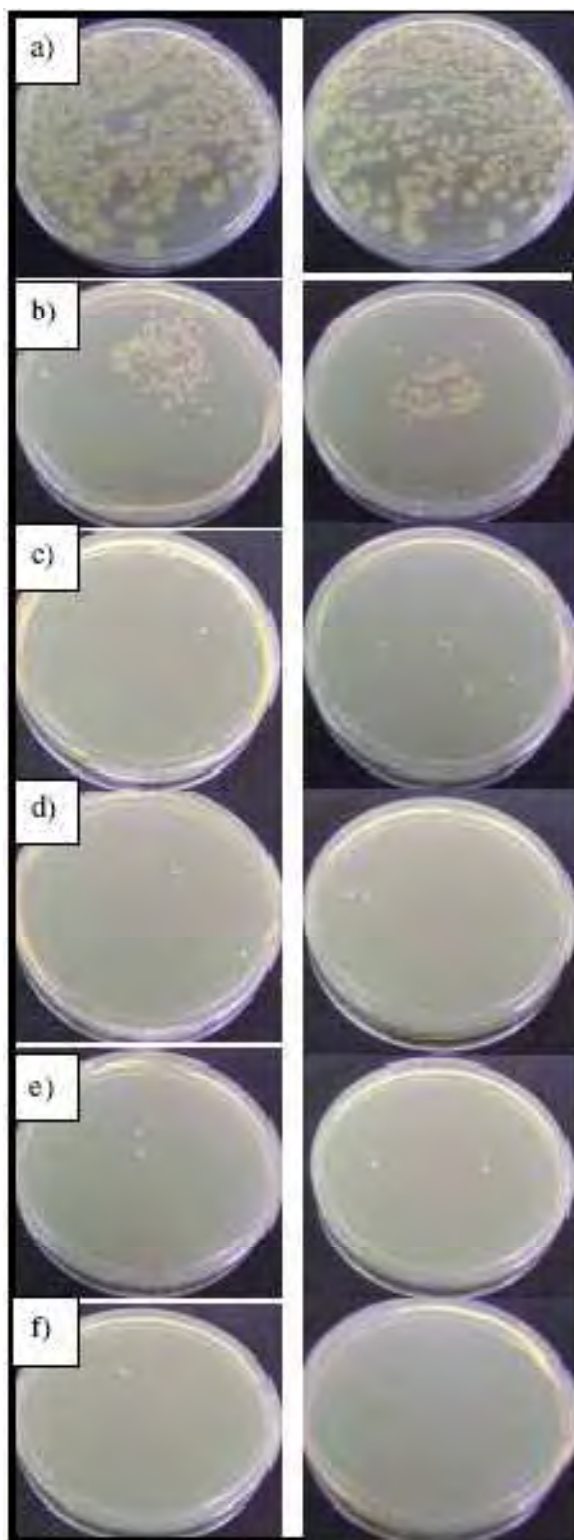


Figura 6.22 – Crescimento de *E.coli* com duplicata do a) controle, e com tratamentos de b) 2 minutos, c) 5 minutos, d)10 minutos, e) 15 minutos, f) 20 minutos.

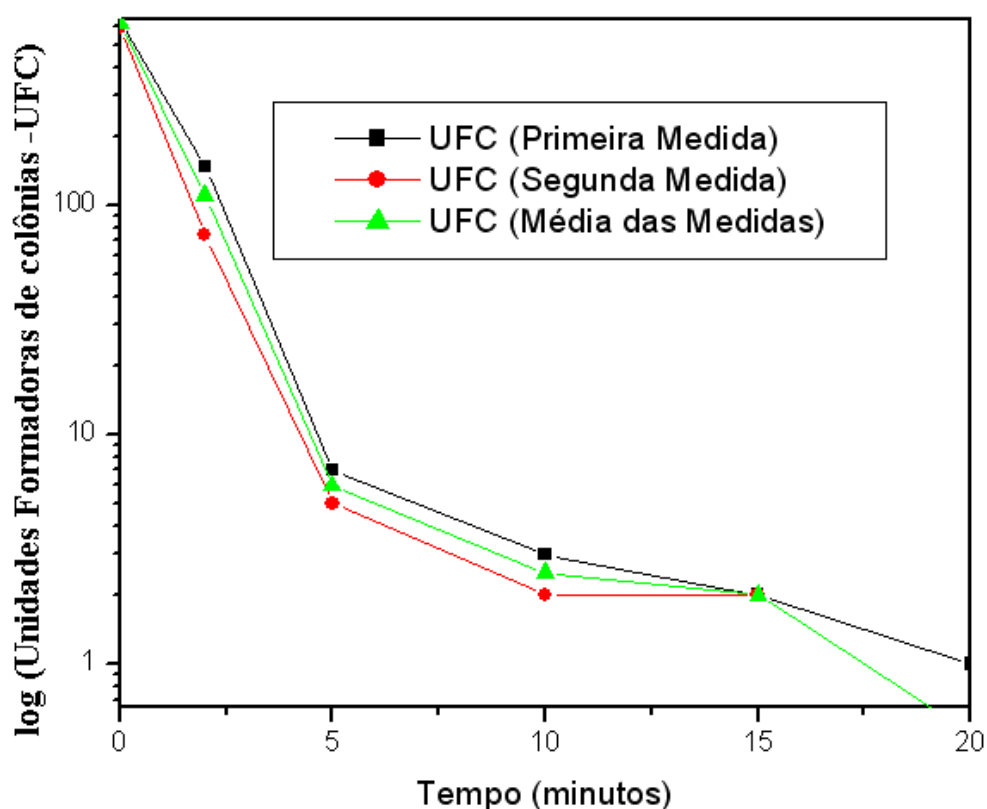


Figura 6.23 – Curva de sobrevivência de *E. coli* ATCC23922.

Assim, pudemos concluir que o tratamento com Agar seco foi eficiente para esterilizar as culturas de *E. coli*.

Novamente notamos um comportamento de rápida redução inicial no número de microrganismos, seguido de uma redução mais lenta.

Apesar de não termos conseguido esterilização completa nas duas repetições, observamos, nas duas medidas, que com apenas 5 minutos de tratamento já tínhamos mais de 98% de morte dos microrganismos, sendo, portanto um processo rápido de esterilização.

6.4.2.3 Análise da estrutura e morfologia de *Escherichia coli*

O microrganismo *E. coli* é uma bactéria bacilar Gram-negativa simbiote do homem. Possui a forma de um bacilo (ver Figura 6.24) e pertence à família das *Enterobacteriaceae*. *E. coli* são aeróbias e anaeróbias facultativas. O seu habitat

natural é o lúmen intestinal dos seres humanos e de outros animais de sangue quente. Possui múltiplos flagelos dispostos em volta da célula.

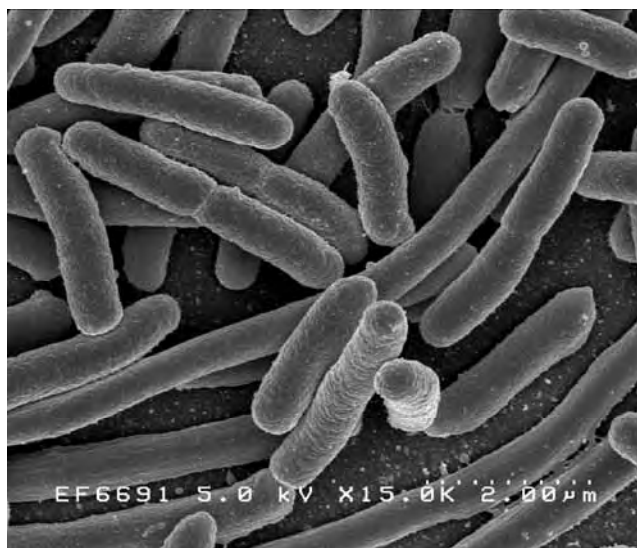


Figura 6.24 – Exemplo de MEV de microrganismo *E.coli*, com aumento de 15000 vezes (1cm equivale a 0,42 μm).

Para observar se o tratamento causou alguma alteração na morfologia dos microrganismos, realizamos análise de MEV das amostras de *E. coli*.

Pudemos observar pelas Figuras 6.25, 6.26 e 6.27 a comparação entre as amostras tratadas com 15 minutos de descarga DBD e as amostras sem tratamento.

Na Figura 6.25 observamos as amostras com um aumento de 2000 vezes. Nesse aumento, não conseguimos visualizar detalhes e diferenças entre as amostras sem e com tratamento. Apenas pudemos observar o comportamento e distribuição homogênea do microrganismo na lamínula.

Na Figura 6.26 (7500 vezes), principalmente nas amostras em água destilada, observamos que os microrganismos apresentam rugosidade e estão quebrados. Porém, a amostra sem tratamento também apresenta microrganismos deformados. Acreditamos que a técnica usada para fixação dos microrganismos nas lamínulas possa ter causado tais danos, bem visíveis na *E. coli* pelo fato de ser uma bactéria Gram-negativa e, portanto, com membrana mais fina.

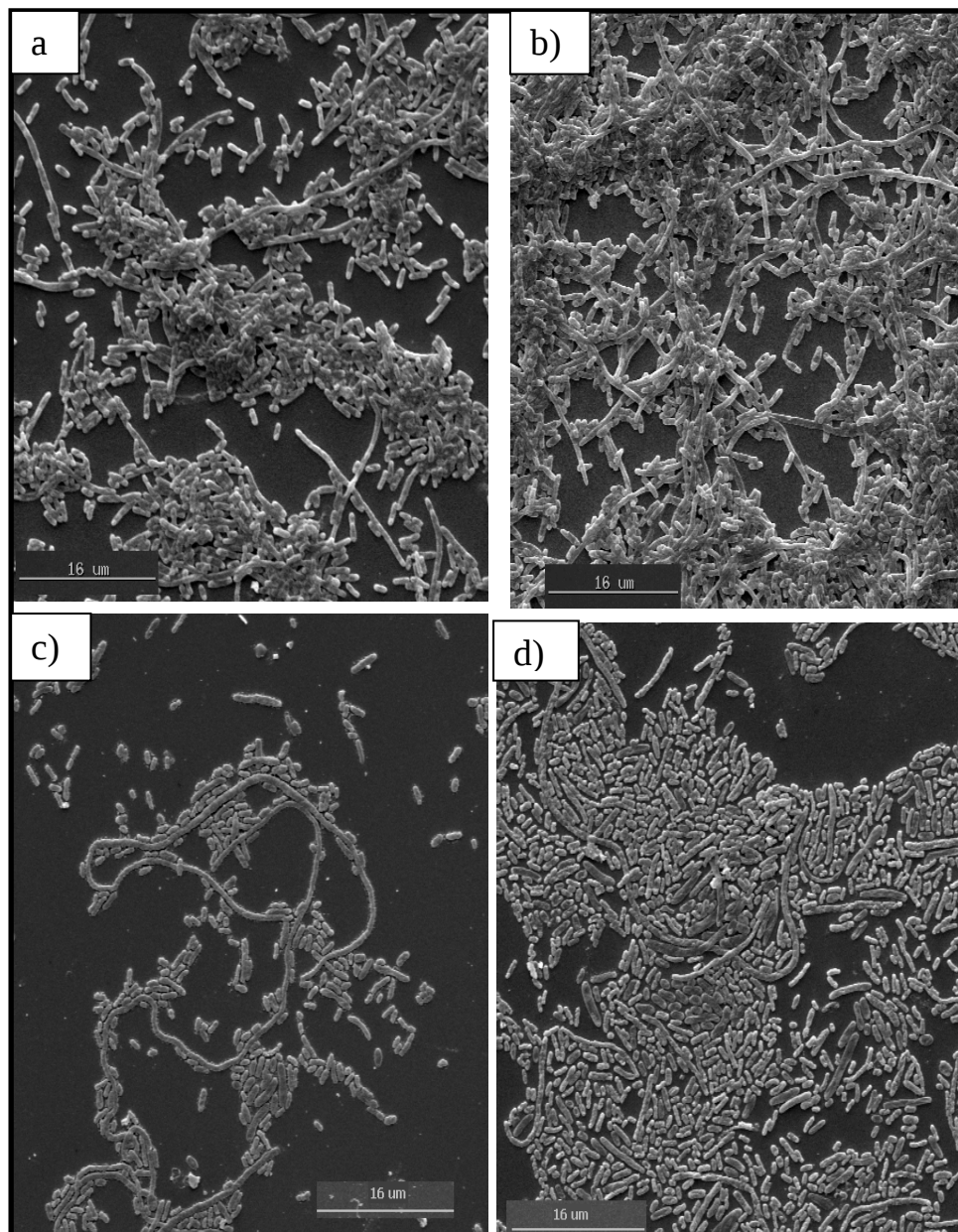


Figura 6.25 – MEV com aumento de 2000x (1cm equivale a 3,2 μm) de *E. coli* (a) tratado em TSB, b) controle em TSB, c) tratado em água, d) controle em água.

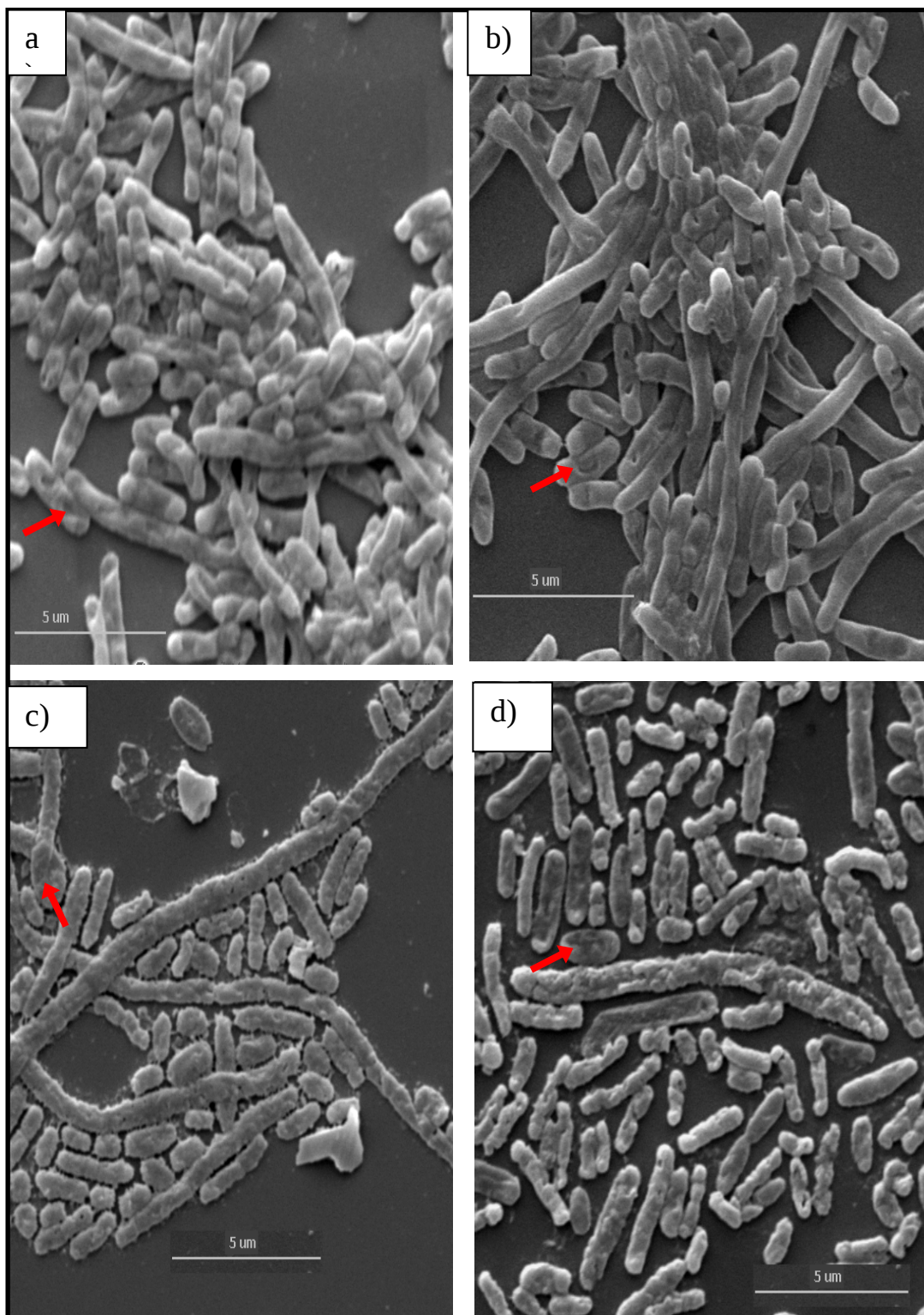


Figura 6.26 – MEV com aumento de 7500x (1cm equivale a 1 μm) de *E. coli* (a) tratado em TSB, b) controle em TSB, c) tratado em água, d) controle em água.

Na Figura 6.27 (aumento de 15000 vezes), observamos que os microrganismos apresentam-se agrupados e podemos observar que tanto nas amostras tratadas como nas sem tratamento existe um grande número de microrganismos rugosos e quebrados.

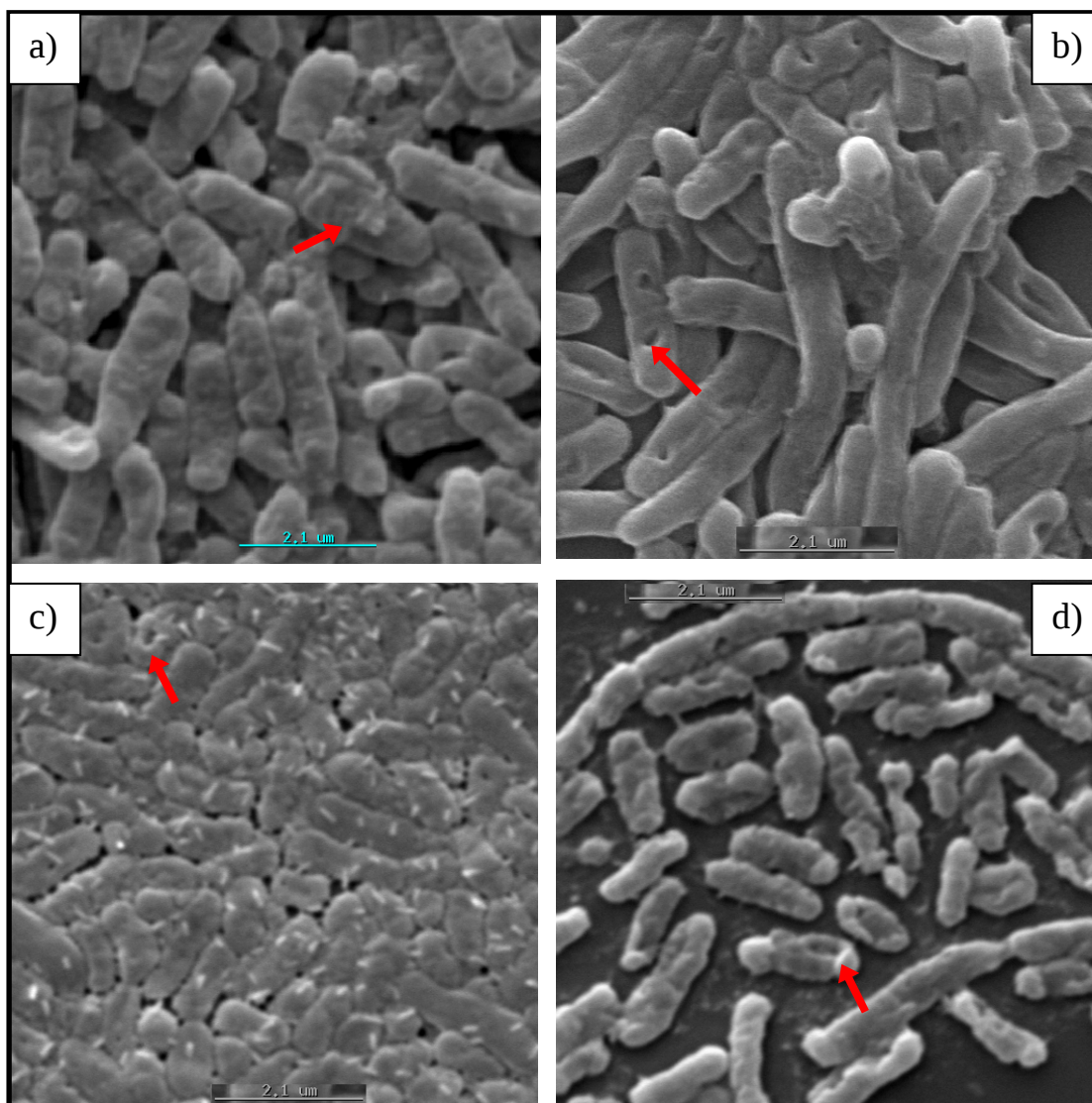


Figura 6.27 – MEV com aumento de 15000x (1cm equivale a 0,42 μm) de *E. coli* (a) tratado em TSB, b) controle em TSB, c) tratado em água, d) controle em água.

Visto que nas amostras sem tratamento já aparecem microrganismos murchos e rugosos, não podemos concluir se a descarga DBD tem ou não efeito sobre a morfologia de *E. coli*.

Os resultados apresentados na curva de sobrevivência de *E. coli*, com uso de Agar seco, mostram que esse microrganismo foi bastante sensível a descarga DBD, tendo rápida redução na concentração inicial de microrganismos.

Acreditamos que a descarga DBD tenha algum efeito sobre a estrutura morfológica de *E. coli*, porém, para confirmar esses resultados necessitaríamos realizar microscopia eletrônica de varredura com outro método de fixação, que não acarrete danos a morfologia do microrganismo.

6.4.3 Tratamento de *Staphylococcus aureus*

Comparamos os resultados de dois experimentos com *S. aureus*, um com Agar úmido e outro com Agar seco em fluxo laminar.

6.4.3.1 Tratamento com Agar úmido

Os resultados do tratamento de *S. aureus* semeado em meio de cultura sem secagem em fluxo laminar, são apresentados nas Figuras 6.28 e 6.29.

A tabela 6.5 mostra os resultados das repetições e da média dos dados obtidos nas contagens de UFC de *S. aureus*, tratado com 2, 5, 10, 15 e 20 minutos. Também comparamos os resultados do logaritmo de morte (KL) e porcentagem de morte (IF) das repetições e da média.

Pela Figura 6.28, pudemos observar que houve redução no número de UFC, conforme aumentamos o tempo de tratamento por plasma. Porém, visto que o meio de cultura apresentava umidade, não foi possível garantir uma descarga homogênea em todos os tratamentos, por isso observamos algumas discrepâncias. Assim, esse experimento não apresentou boa reprodutibilidade. E visto que o *S. aureus* é uma bactéria Gram-positiva, cuja membrana é mais espessa, a esterilização é mais difícil.

Tabela 6.5 – Tratamento de *S. aureus* com Agar úmido.

Tratamento 1	UFC	IF(%)	KL
Controle	2068	Ideal = 100	Ideal = 3,316
2 minutos	1444	30,1	0,156
5 minutos	675	67,3	0,486
10 minutos	465	77,5	0,648
15 minutos	27	98,6	1,887
20 minutos	1	99,9	3,315

Tratamento 2	UFC	IF(%)	KL
Controle	1564	Ideal = 100	Ideal = 3,194
2 minutos	172	89,0	0,959
5 minutos	439	71,9	0,552
10 minutos	4	99,7	2,592
15 minutos	9	99,4	2,240
20 minutos	741	52,6	0,324

Média	UFC	IF(%)	KL
Controle	1816	Ideal = 100	Ideal = 3,260
2 minutos	808	55,5	0,352
5 minutos	557	69,3	0,513
10 minutos	234,5	87,0	0,889
15 minutos	18	99,0	2,004
20 minutos	371	79,5	0,690

Podemos observar que a segunda medida para o tratamento de vinte minutos apresentou um resultado bem discrepante, isso pode ter sido causado pela presença de umidade no meio de cultura, já que o mesmo não foi seco em fluxo laminar antes de semear os microrganismos.

O valor de redução decimal para o tratamento de *S. aureus* da primeira medida, visto que a segunda teve resultados discrepantes, foi de aproximadamente 13 minutos. Porém, não podemos considerar como um valor confiável, já que não conseguimos repetir esse resultado numa segunda tentativa.

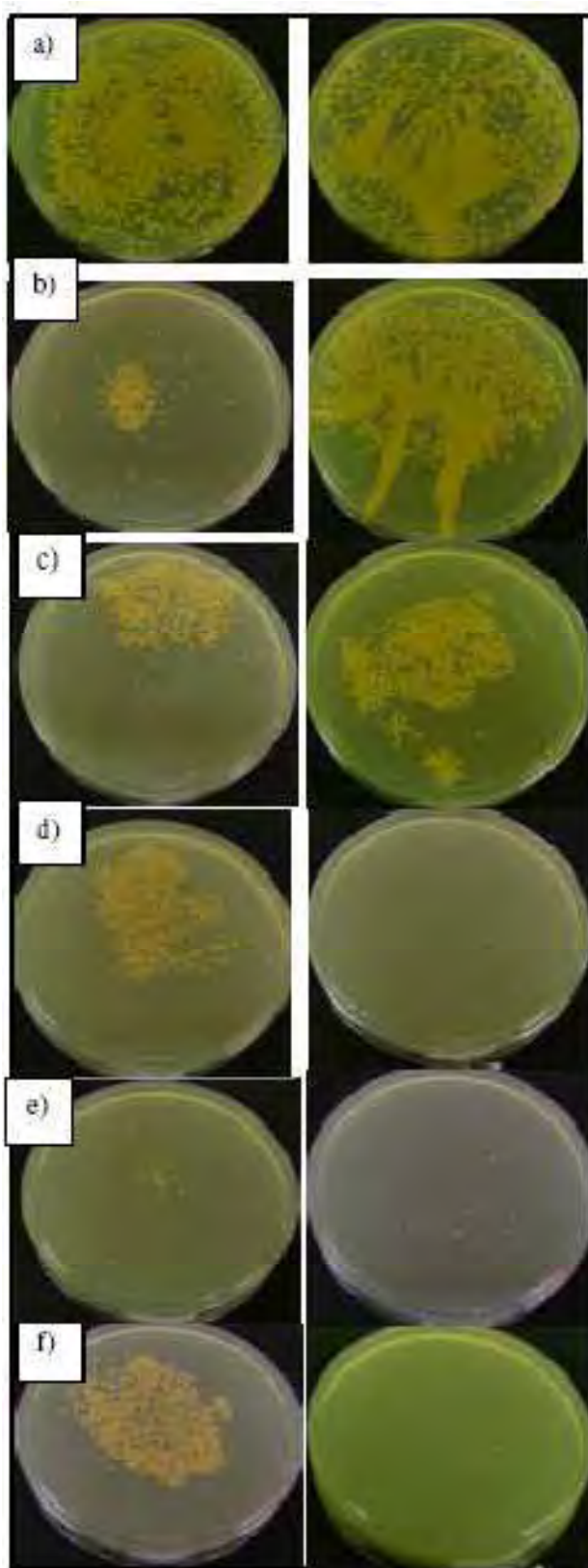


Figura 6.28 – Crescimento de *S.aureus* com duplicata de: a) controle e com tratamentos de: b) 2 minutos, c) 5 minutos, d)10 minutos, e) 15 minutos, f) 20 minutos.

O gráfico da Figura 6.29 mostra a curva de sobrevivência de *S. aureus* por aplicação do plasma de descarga com barreira dielétrica.

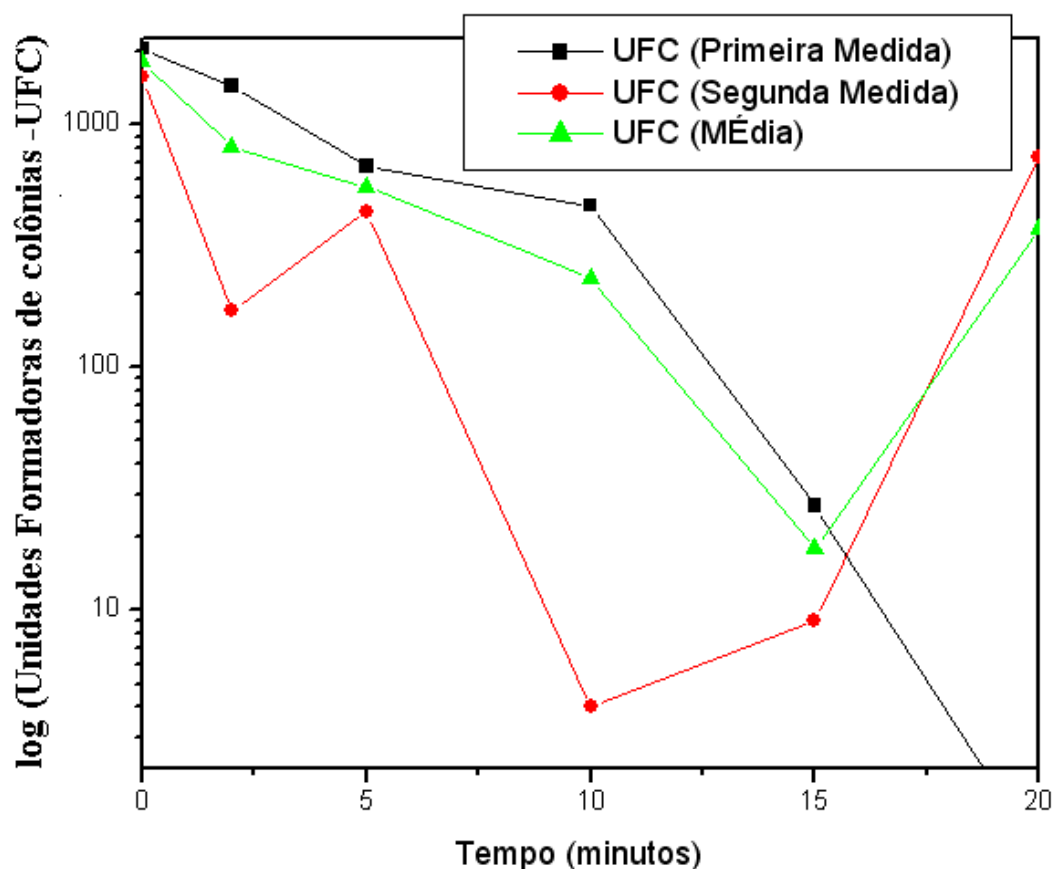


Figura 6.29 – Curva de sobrevivência de *S.aureus* ATCC 6538.

O tratamento de *S. aureus* foi não conclusivo. Porém, houve esterilização total para um dos tratamentos. Precisaríamos de mais experimentos para descartar ou confirmar esse método de esterilização para microrganismos Gram-positivos. Por isso repetimos o experimento com Agar seco em fluxo laminar.

6.4.3.2 Tratamento com Agar seco

As amostras de *S. aureus* foram semeadas em Agar seco durante aproximadamente uma hora em fluxo laminar com a chama do bico de bunsen acesa.

Após o tratamento com descarga DBD, as amostras apresentaram rápida redução no número de UFC (conforme observamos na Figura 6.30).

A tabela 6.6 mostra os resultados obtidos nas contagens de UFC de *S. aureus* e os resultados do logaritmo de morte (KL) e porcentagem de morte (IF) dos experimentos e da média, das amostras tratada com 2, 5, 10, 15 e 20 minutos, com repetição. Observamos que os resultados apresentaram boa reprodutibilidade. Também pudemos calcular o tempo de redução decimal (D-valor) de 1,85 minutos.

Tabela 6.6 – Tratamento de *S. aureus* em Agar seco

Tratamento 1	UFC	IF(%)	KL
Controle	1056	Ideal = 100	Ideal = 3,024
2 minutos	14	98,7	1,877
5 minutos	3	99,7	2,546
10 minutos	3	99,7	2,546
15 minutos	1	99,9	3,024
20 minutos	1	99,9	3,024

Tratamento 2	UFC	IF(%)	KL
Controle	998	Ideal = 100	Ideal = 2,999
2 minutos	8	99,2	2,096
5 minutos	3	99,7	2,522
10 minutos	2	99,8	2,698
15 minutos	1	99,9	2,999
20 minutos	0	100	2,999

Média	UFC	IF(%)	KL
Controle	1027	Ideal = 100	Ideal = 3,012
2 minutos	11	98,9	1,970
5 minutos	3	99,7	2,534
10 minutos	2,5	99,8	2,614
15 minutos	1	99,9	3,012
20 minutos	0,5	99,9	3,313

O gráfico da Figura 6.31 mostra a curva de sobrevivência de *S. aureus* por aplicação do plasma de descarga com barreira dielétrica, segundo os dados da tabela 6.6.

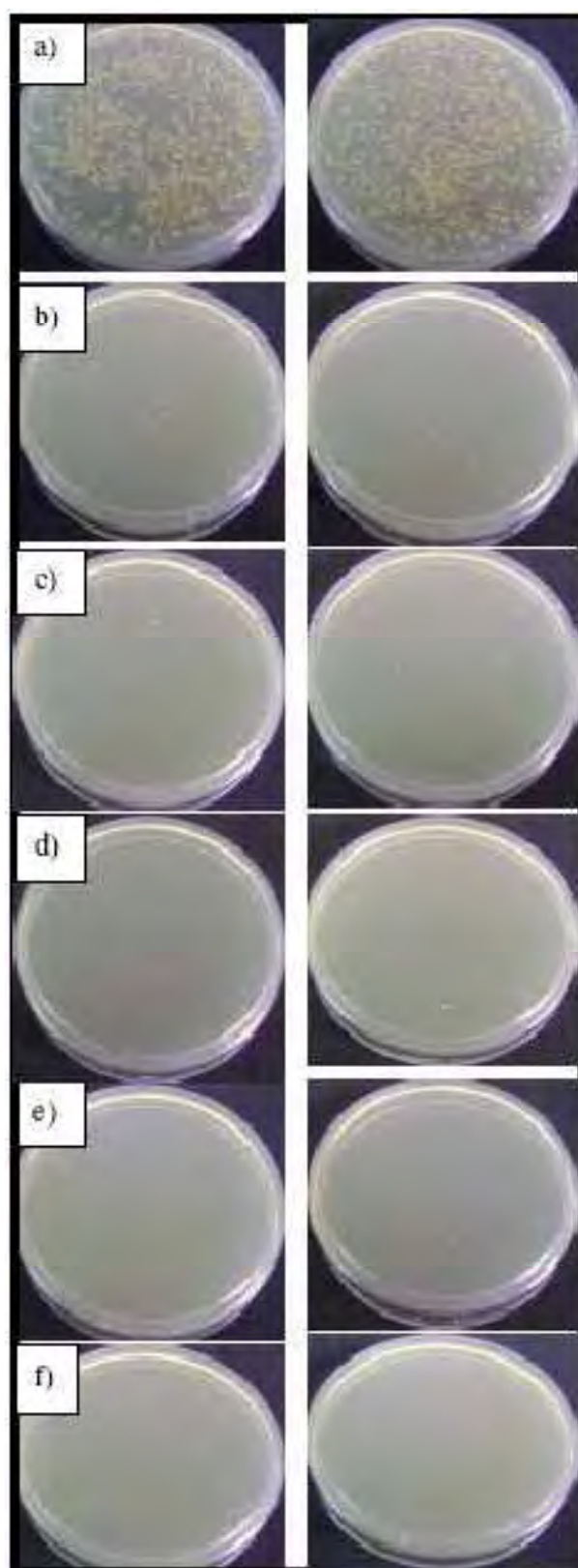


Figura 6.30 – Crescimento de *S.aureus* com duplicata do a) controle, e com tratamentos de b) 2 minutos, c) 5 minutos, d)10 minutos, e) 15 minutos, f) 20 minutos.

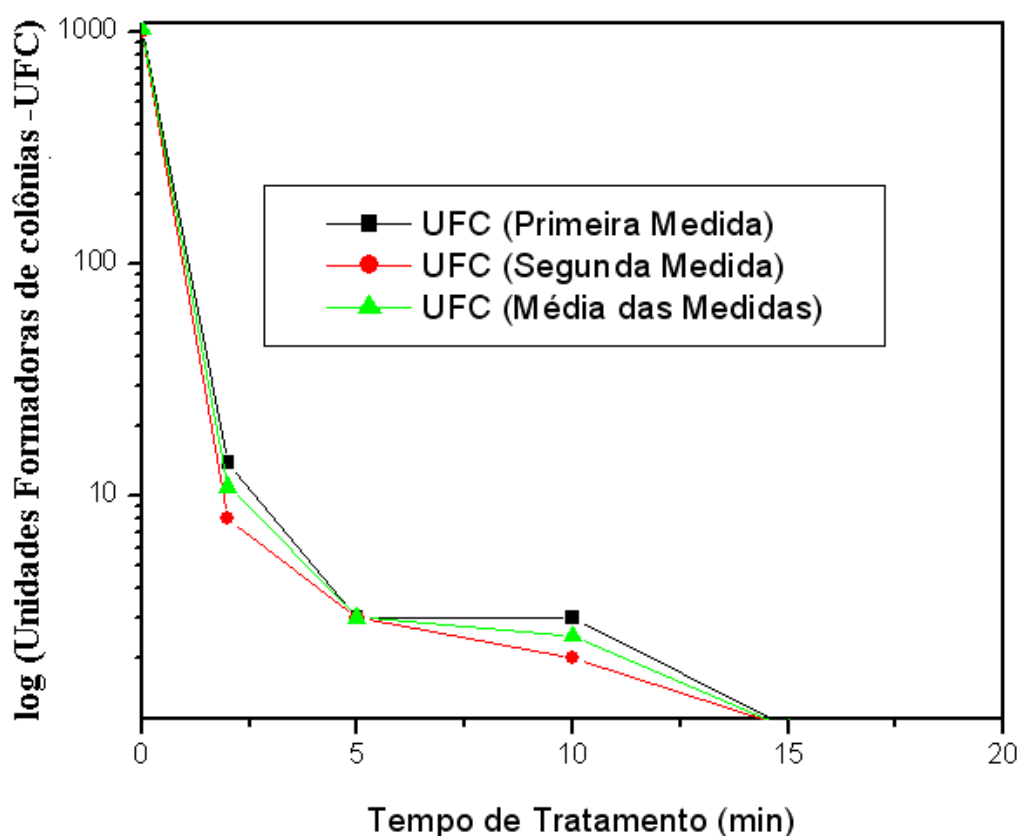


Figura 6.31 – Curva de sobrevivência de *S.aureus* ATCC 6538.

Assim, pudemos concluir que o tratamento com Agar seco foi eficiente para esterilizar as culturas de *S. aureus*.

Com a ausência de umidade, conseguimos manter uma descarga estável, assim, a esterilização foi eficiente e rápida. Com apenas 2 minutos de tratamento já alcançamos aproximadamente 99% de morte dos microrganismos.

6.4.3.3 Análise da estrutura e morfologia de *Staphylococcus aureus*

S. aureus, também conhecido como estafilococo dourado, é uma espécie de estafilococo coagulase-positivos. Têm forma esférica (cocos), cerca de um micrômetro de diâmetro, e formam grupos com aspecto de cachos de uvas (ver Figura 6.32) com cor amarelada, devido à produção de carotenóides.

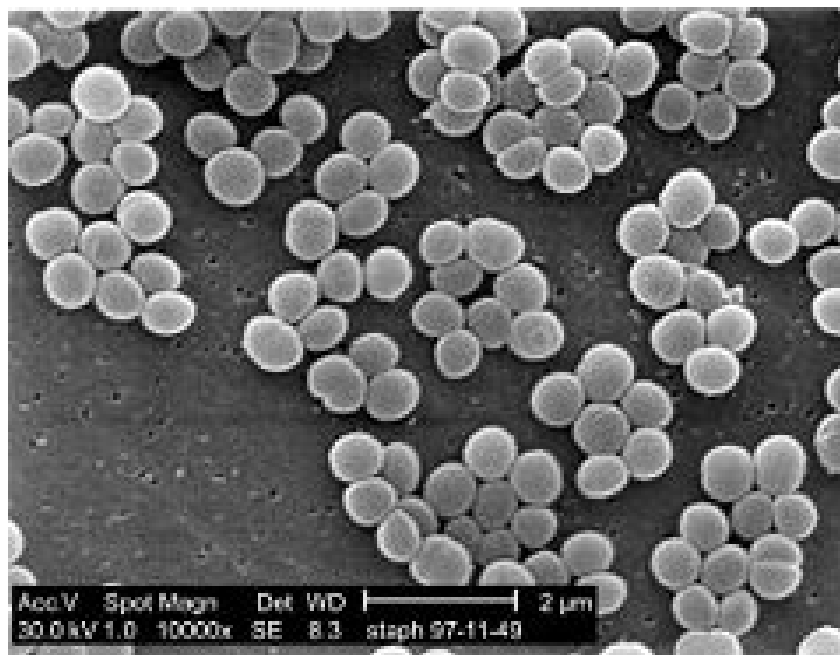


Figura 6.32 – Exemplo de MEV de microrganismo *S. aureus* com aumento de 10000 vezes (1cm equivale a 0,7 μm).

Realizamos análise de MEV das amostras de *S. aureus*, para observar a estrutura morfológica dos microrganismos e ver se o tratamento por plasma causou alguma alteração.

Pudemos observar pelas Figuras 6.33, 6.34, 6.35 e 6.36 a comparação entre as amostras tratadas com 15 minutos de descarga DBD e as amostras sem tratamento.

Na Figura 6.33 observamos as amostras com um aumento de 2000 vezes. Nesse aumento, não conseguimos visualizar detalhes e diferenças entre as amostras sem e com tratamento. Apenas pudemos observar o comportamento e distribuição do microrganismo na lâmina. Observamos que as amostras ficaram distribuídas homogeneamente nas lâminas, porém a amostra tratada em suspensão de água destilada apresentou formação de ilhas de microrganismos.

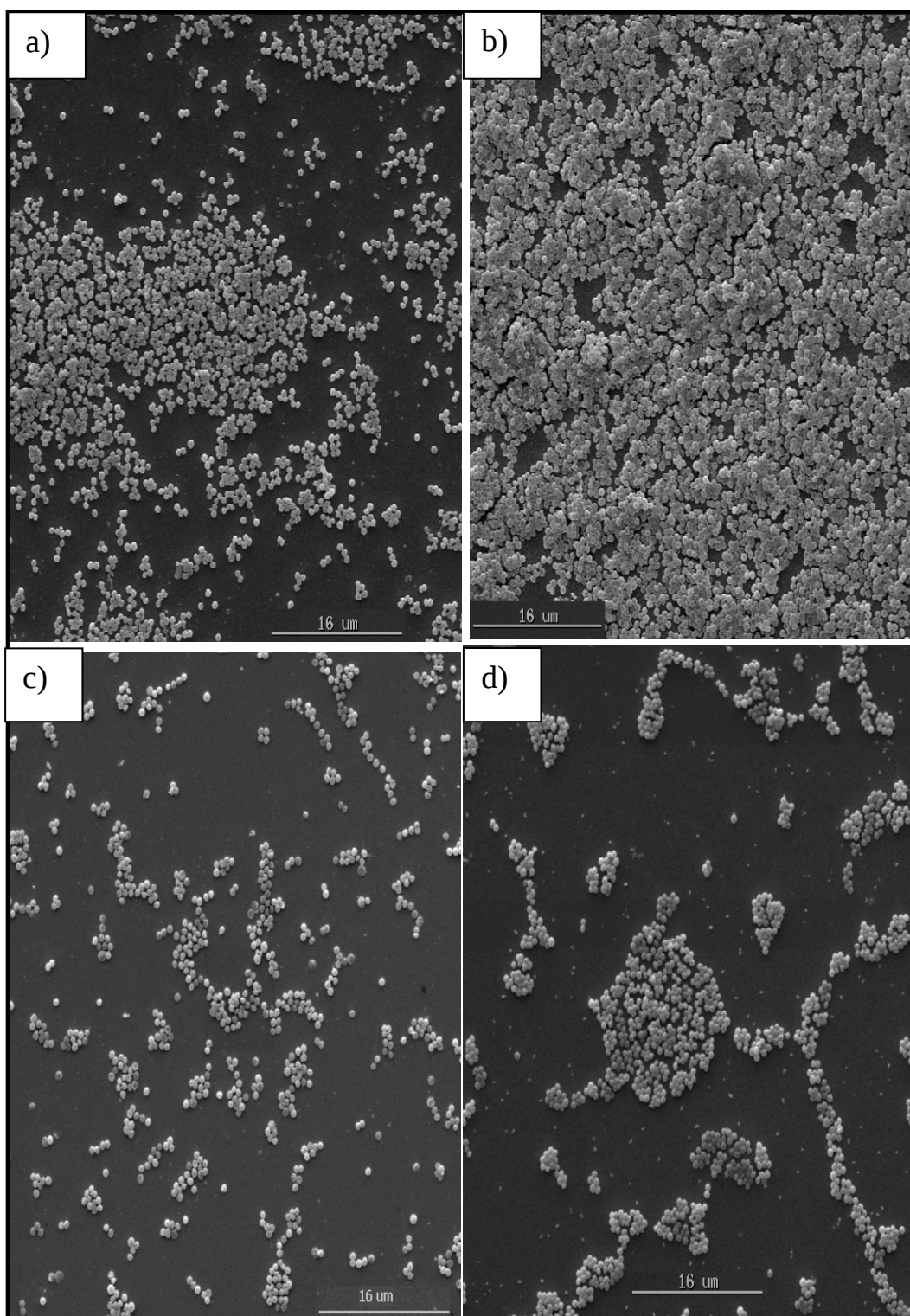


Figura 6.33 – MEV com aumento de 2000x (1cm equivale a 0,42 µm) de *S. aureus* (a) tratado em TSB, b) controle em TSB, c) tratado em água, d) controle em água.

No aumento de 7500 vezes, conforme a Figura 6.34, observamos que algumas células da amostra tratada semeada em meio de cultura líquido TSB, apresentaram-se

murchas e quebradas quando comparado às células da amostra no mesmo meio de cultura sem tratamento. Porém ainda não observamos grandes diferenças nesse aumento.

Na Figura 6.35, observamos o aumento de 15000 vezes, e pudemos ver, mais claramente, que as amostras tratadas, tanto em água destilada, quanto em meio de cultura líquido, apresentaram algumas células murchas e estouradas.

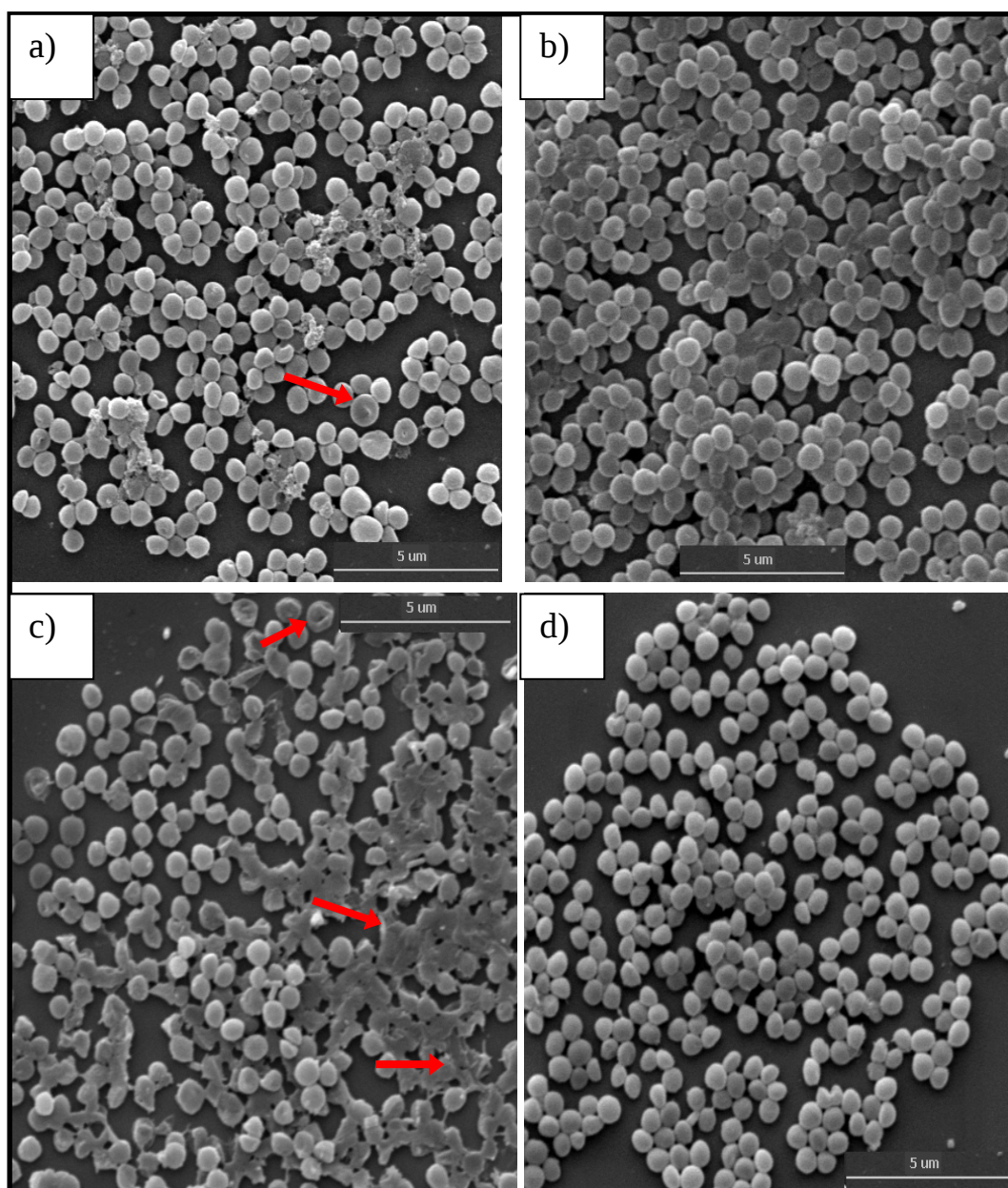


Figura 6.34 – MEV com aumento de 7500x (1cm equivale a 1 µm) de *S. aureus* (a) tratada em TSB, b) controle em TSB, c) tratada em água, d) controle em água.

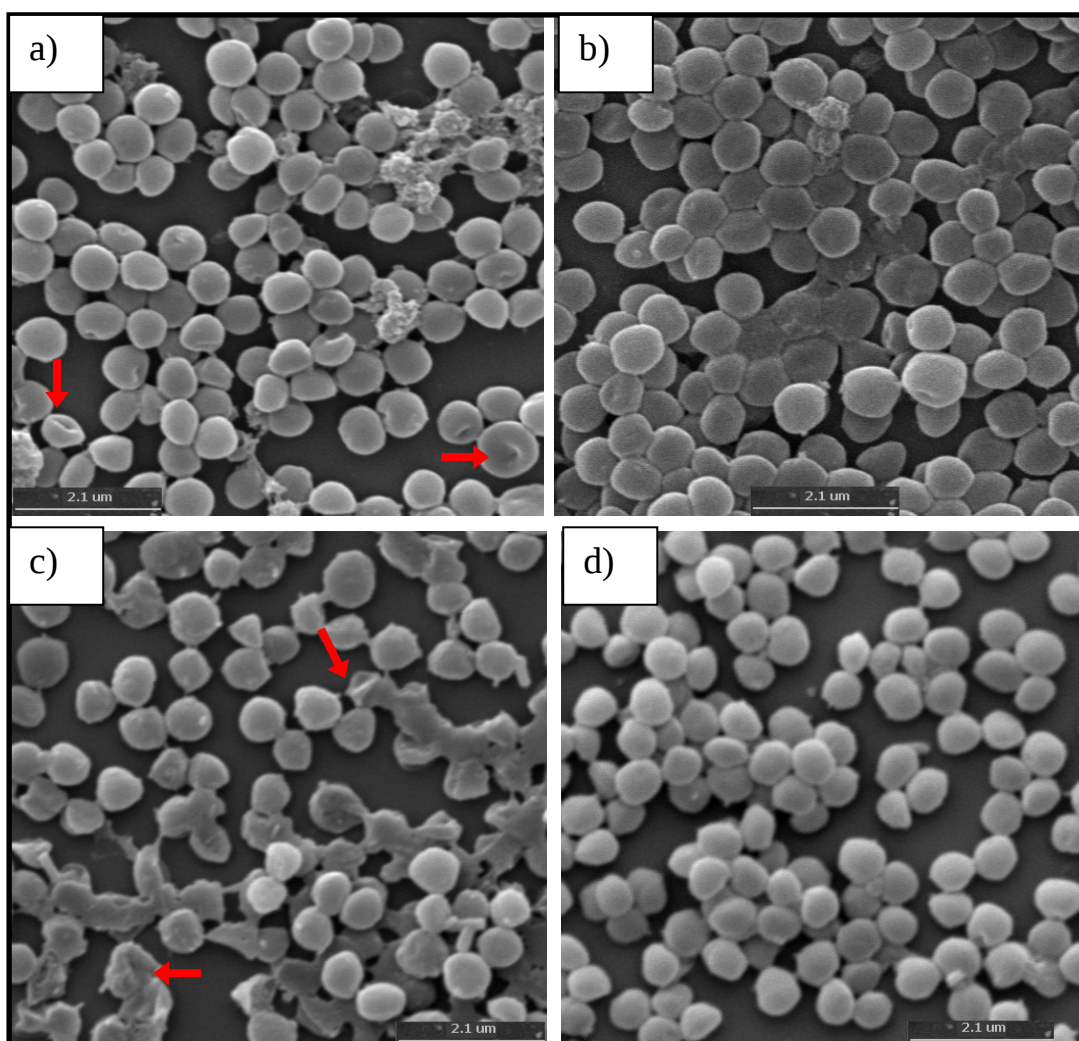


Figura 6.35 – MEV com aumento de 15000x (1cm equivale a 0,42 μm) de *S. aureus*
(a) tratada em TSB, b) controle em TSB, c) tratada em água, d) controle em água.

Pudemos observar que, apesar de algumas células apresentarem danos na sua estrutura, existem muitas células intactas nas amostras tratadas.

Porém, as amostras sem tratamento apresentaram as células completamente intactas quando comparadas com as amostras tratadas, por isso não podemos descartar o efeito da descarga DBD sobre a estrutura dos microrganismos Gram-positivos, causando conseqüente inativação.

Além disso, temos que lembrar que as células que não tiveram sua estrutura comprometida não necessariamente sobreviveram ao processo de esterilização, elas podem ter sido inativadas sem ocorrer o rompimento de sua membrana, o que condiz com os resultados apresentados na curva de sobrevivência dos microrganismos no tratamento com Agar seco, onde houve rápida esterilização.

6.4.4 Tratamento de *Bacillus Subtilis*

Visto que, nos tratamentos com *C. albicans*, *E. coli* e *S. aureus*, observamos que os resultados foram mais favoráveis quando utilizamos o Agar seco em fluxo laminar, realizamos o tratamento com o bacilo *B. subtilis* somente utilizando placas de Petri com meio de cultura seco. Os resultados são apresentados nas Figuras 6.36 e 6.37.

Conforme aumentamos o tempo de tratamento por plasma, pudemos observar que houve rápida redução no número de UFC das amostras de *B. subtilis* tratadas. Em torno de 10 minutos de tratamento já observamos esterilização completa das placas. Conforme podemos observar na Figura 6.36.

A tabela 6.7 mostra os resultados obtidos nas contagens de UFC de *B. subtilis*, tratado com 2, 5, 10, 15 e 20 minutos. Também comparamos os resultados do logaritmo de morte (KL) e porcentagem de morte (IF) das repetições e da média das repetições. Observamos que em torno de dois minutos conseguimos inativar em torno de 70% dos bacilos.

Tabela 6.7 – Tratamento de *B.subtilis* com Agar seco.

Tratamento 1	UFC	IF(%)	KL
Controle	566	Ideal = 100	Ideal = 2,753
2 minutos	156	72,4	0,560
5 minutos	30	94,7	1,276
10 minutos	4	99,2	2,151
15 minutos	1	99,8	2,752
20 minutos	0	100	2,753

Tratamento 2	UFC	IF(%)	KL
Controle	419	Ideal = 100	Ideal = 2,622
2 minutos	128	69,4	0,515
5 minutos	2	99,5	2,321
10 minutos	0	100	2,622
15 minutos	0	100	2,622
20 minutos	0	100	2,622

Média	UFC	IF(%)	KL
Controle	492,5	Ideal = 100	Ideal = 2,692
2 minutos	142	71,1	0,540
5 minutos	16	96,7	1,488
10 minutos	2	99,5	2,391
15 minutos	0,5	99,8	2,993
20 minutos	0	100	2,692

Observamos uma boa reprodutibilidade nos testes com *B. subtilis*, e pudemos calcular o valor de redução decimal em torno de 4,1 minutos.

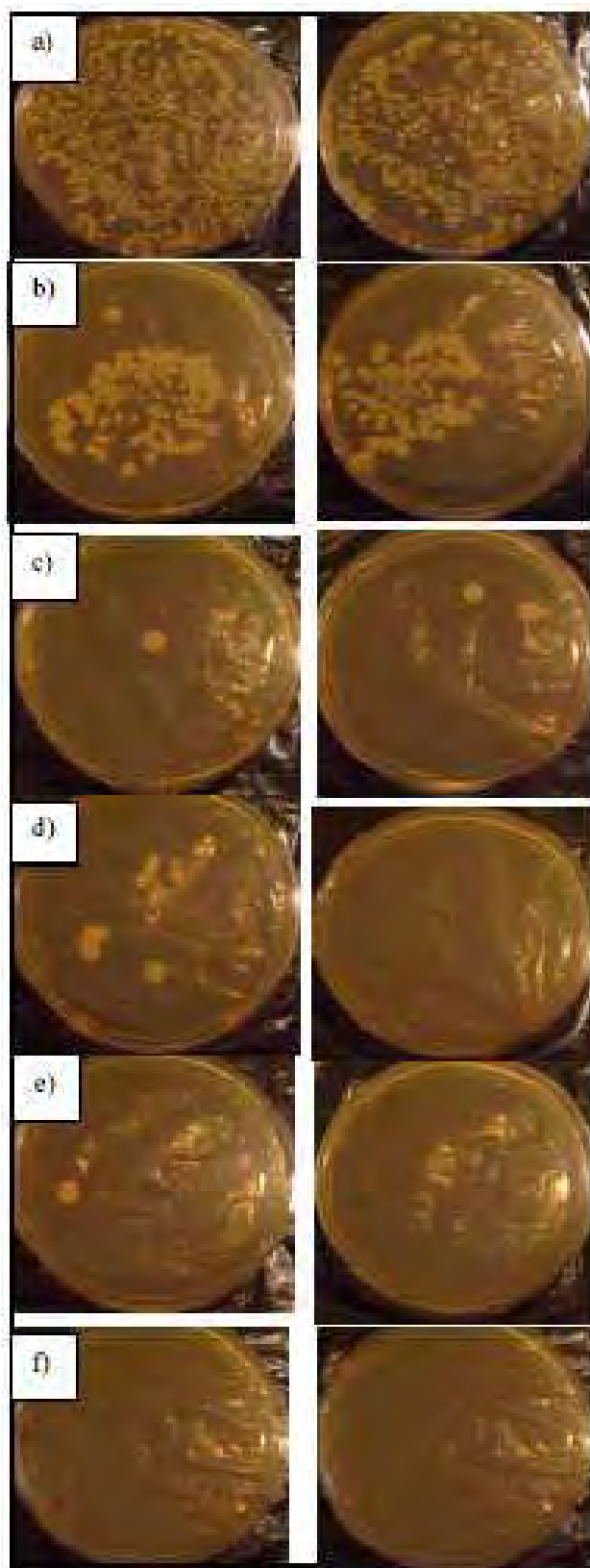


Figura 6.36 – Crescimento de *B. subtilis* com duplicata do a) controle, e com tratamentos de b) 2 minutos, c) 5 minutos, d) 10 minutos, e) 15 minutos, f) 20 minutos.

O gráfico da Figura 6.37 mostra a curva de sobrevivência de *B. subtilis* por aplicação do plasma de descarga com barreira dielétrica.

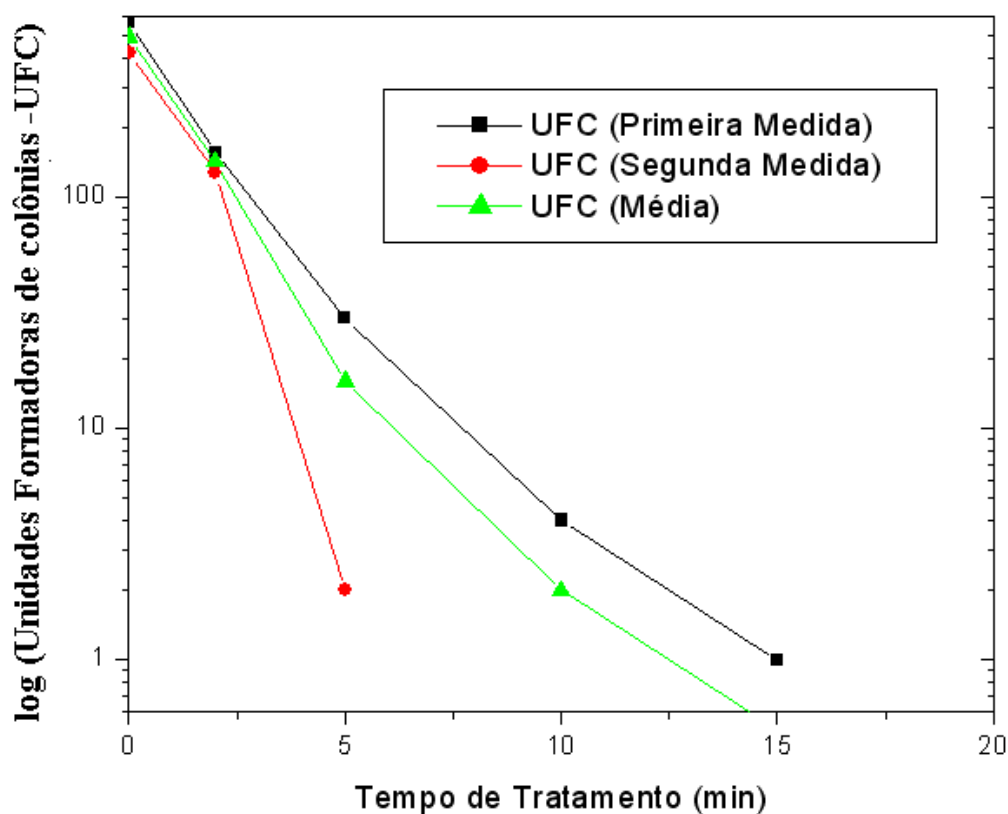


Figura 6.37 – Curva de sobrevivência de *B.subtilis* ATCC19659.

O tratamento do bacilo *B. subtilis* foi eficiente para esterilização, com um comportamento bem parecido com o de *C. albicans*, segundo nossos experimentos.

6.4.4.1 Análise da estrutura e morfologia de *Bacillus Subtilis*

O *Bacillus subtilis* é uma espécie de bactéria Gram-positiva (veja Figura 6.38) que é uma saprófita comum do solo e da água. Organismo esporulado, não patogênico, graças à sua termofilia é utilizado no monitoramento e validação de ciclos de esterilização por calor seco e óxido de etileno, realizados em estufas ou fornos de esterilização e autoclaves para gás óxido de etileno, respectivamente.

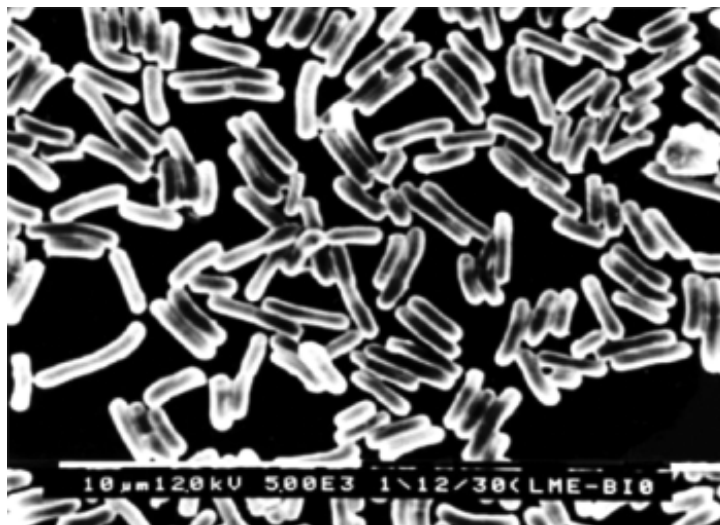


Figura 6.38 – Exemplo de MEV de microrganismo *B. subtilis* com aumento de 7500 vezes (1cm equivale a 1 μ m).

A fim de observar se houve alguma alteração na morfologia dos microrganismos *B. subtilis*, realizamos análise de MEV das amostras.

Pudemos observar pelas Figuras Figura 6.39, 6.40 e 6.41 a comparação entre as amostras tratadas com 15 minutos de descarga DBD e as amostras sem tratamento.

Na Figura 6.39 observamos as amostras com um aumento de 2000 vezes. Nesse aumento, não conseguimos visualizar detalhes e diferenças entre as amostras sem e com tratamento. Apenas pudemos observar o comportamento e distribuição do microrganismo na lamínula. Observamos que amostra sem tratamento semeada em meio de cultura líquido TSB não teve boa fixação.

Na Figura 6.40, com aumento de 7500 vezes, podemos observar que as amostras tratadas apresentaram fragmentos de células e células quebradas e deformadas. Mas as amostras de controle também ficaram um pouco deformadas, novamente atribuímos esse fato ao nosso método de fixação. Mas pudemos notar as diferenças entre as amostras tratadas e sem tratamento.

Essa diferença é acentuada quando observamos o aumento de 15000 vezes (Figura 6.41). Na amostra tratada semeada em TSB, observamos as células estouradas e na amostra tratada em suspensão de água destilada, observamos vários fragmentos de microrganismos.

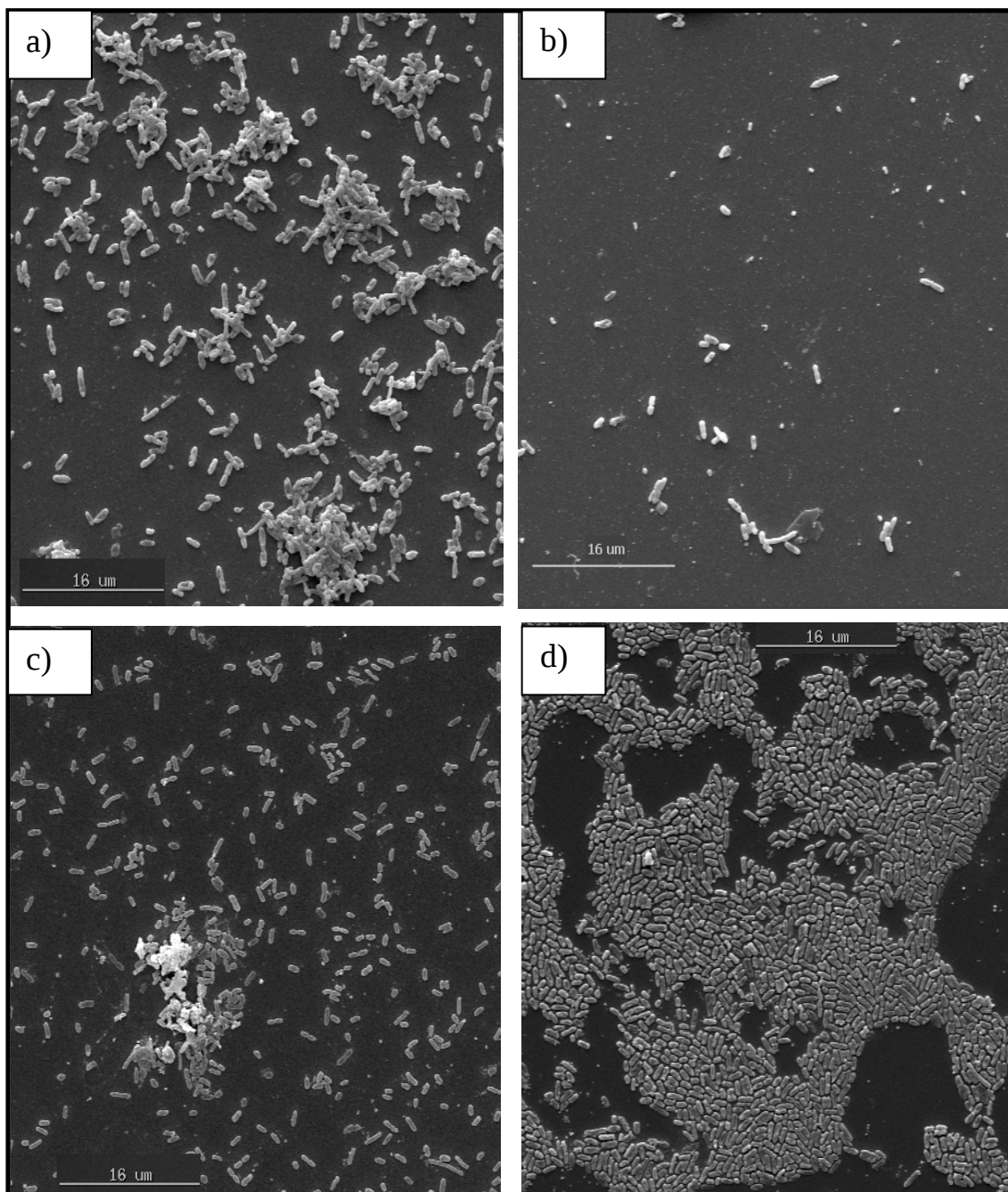


Figura 6.39 – MEV com aumento de 2000x (1cm equivale a 0,42 μm) de *B. subtilis* (a) tratado em TSB, b) controle em TSB, c) tratado em água, d) controle em água.

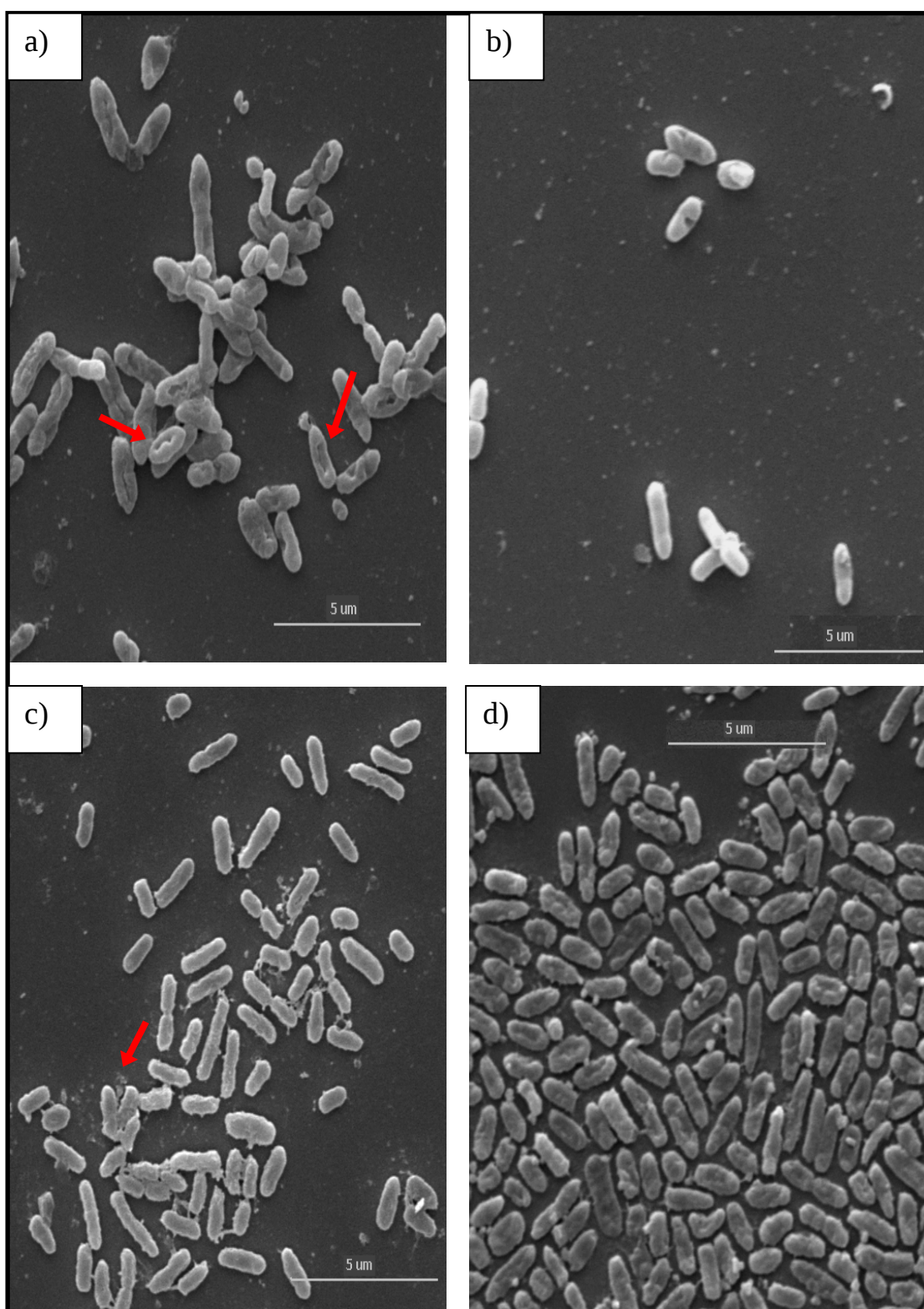


Figura 6.40 – MEV com aumento de 7500x (1cm equivale a 1 µm) de *B.subtilis* (a) tratada em TSB, b) controle em TSB, c) tratada em água, d) controle em água.

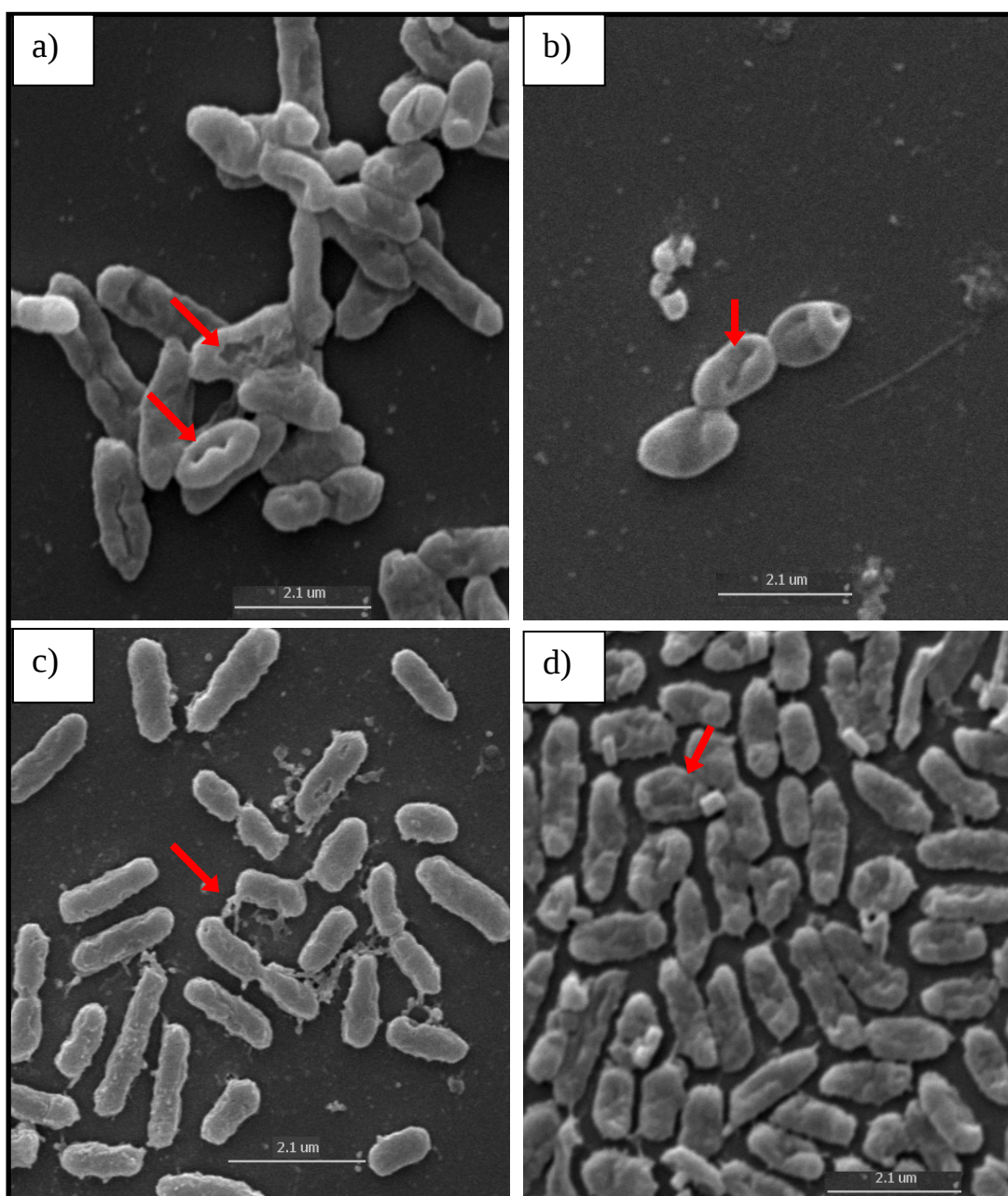


Figura 6.41 – MEV com aumento de 15000x (1cm equivale a 0,42 μm) de *B.subtilis*
(a) tratada em TSB, b) controle em TSB, c) tratada em água, d) controle em água.

Pudemos observar que o bacilo *B. subtilis* apresentou grande sensibilidade tanto ao tratamento quanto ao processo de fixação dos microrganismos nas lamínulas, assim, muitas células ficaram danificadas. Mas, podemos notar que com o tratamento, houve maior número de células fragmentadas, o que está de acordo com os resultados vistos

nas curvas de crescimento, onde conseguimos obter, com cerca de 10 minutos de tratamento, a esterilização completa. Assim, observamos que a descarga DBD causa alterações na morfologia dos esporos de bactérias Gram-positivas, e essas alterações podem ser as principais responsáveis pela morte da bactéria.

7 CONCLUSÕES

A esterilização por plasma em pressão atmosférica oferece várias vantagens sobre outras técnicas de esterilização, como, por exemplo: eficiência de esterilização extremamente alta; esterilização muito rápida; configuração flexível e altamente versátil que conforma vários contornos de superfície; possibilidade de controlar o processo devido à baixa inércia do sistema (comparado a técnicas de desinfecção térmicas); não tem desperdício de calor ou de materiais; pode ser integrado facilmente; e não geram resíduos tóxicos. Porém, a esterilização por geração de ozônio (plasma) não possui um indicador de eficácia definido.

Observamos que os protocolos propostos na literatura não funcionam em volumes de suspensões, isso porque, em nossos experimentos iniciais de tratamento de microrganismos em suspensão salina e suspensão de água destilada em placas de microtitulação, não ocorreram esterilização nem desinfecção. Uma possível explicação para esse resultado é que o efeito dos componentes ativos do plasma (ozônio, UV e partícula carregadas) é localizado somente numa fina camada de microrganismos que estão na superfície. No volume dos poços da placa não há penetração desses componentes, não ocorrendo, portanto, esterilização.

O mesmo ocorre no caso do tratamento de microrganismos crescidos em placa de Petri, em que não ocorre esterilização devido a não penetração dos componentes ativos no volume de microrganismos crescidos. Além disso, há ocorrência de arcos devido à condutividade do meio que reduz a eficiência do processo.

Porém para aplicação em superfície (lamínula ou suspensão semeada em Agar), obtivemos resultados de redução significativa no número de microrganismos.

Visto que a aplicação sobre lamínulas, apesar de apresentar uma rápida e total esterilização, não condiz com a realidade microbiológica, concluímos que a melhor configuração para nosso reator seria o tratamento de microrganismos semeados em placas de Petri com os eletrodos adaptados externamente (evitando a formação de arcos e também a contaminação do meio de cultura), e separação entre o meio e o eletrodo de aproximadamente um centímetro, resultando numa potência de 1,1 Watts.

Após os tratamentos de 2, 5, 10, 15 e 20 minutos, pudemos notar que o fungo *C. albicans* em meio de cultura seco em fluxo laminar apresentou esterilização com tempo de tratamento de aproximadamente 10 minutos e o tempo de redução decimal (D-valor) foi de 4,2 minutos.

Esses resultados foram compatíveis com as imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura, onde o fungo *C. albicans* apresentou sua estrutura danificada após o tratamento com descarga DBD por quinze minutos. Assim, observamos que a descarga DBD pode causar alterações na morfologia desses microrganismos, e essas alterações podem ser as principais responsáveis pela inativação.

O bacilo *B. subtilis* foi esterilizado em cerca de 10 minutos de tratamento, e o tempo de redução decimal em torno de 4,1 minutos.

Nas imagens feitas por microscopia eletrônica de varredura das amostras, tratadas por quinze minutos com descarga DBD, notamos que a estrutura do microrganismo ficou bastante danificada, com muitas células fragmentadas, o que está de acordo com os resultados vistos nas curvas de morte. Assim, observamos que a descarga DBD pode causar alterações na morfologia dos esporos de bactérias Gram-positivas, e essas alterações podem ser as principais responsáveis pela morte da bactéria.

A bactéria Gram-negativa *E. coli*, quando tratada em meio de cultura úmido, apresentou uma certa resistência ao tratamento, isso porque houve a formação de arcos, o que compromete nosso processo, já que não podemos garantir uma boa distribuição de descargas no volume. Porém, observamos uma diminuição no número de microrganismos com o aumento do tempo de tratamento, e com dez minutos de tratamento já conseguimos alcançar cerca de 70% de inativação. Sendo, portanto, nesse caso, um eficiente método de desinfecção.

No entanto, quando tratamos de *E. coli* semeada em Agar seco, observamos uma rápida esterilização. Com apenas cinco minutos de tratamento já conseguimos uma redução de aproximadamente 98%. O tempo de redução decimal (D-valor) foi em torno de 3,25 minutos.

Nas análises das imagens de microscopia eletrônica, não pudemos concluir se houve alterações estruturais em *E. coli* após o tratamento com descarga DBD, visto

que nas amostras sem tratamento já aparecem microrganismos murchos e rugosos, isso porque a membrana das bactérias Gram-negativas é mais fina, e nosso método de fixação sobre as lamínulas pode ter causado tal dano estrutural em *E. coli*.

A bactéria Gram-positiva *S. aureus* por ter a estrutura da membrana mais robusta é mais difícil de ser esterilizada. Em nossos experimentos com Agar úmido, houve redução no número de UFC, conforme aumentamos o tempo de tratamento por plasma. Em uma das amostras tratadas conseguimos observar uma redução de 99,95% do número de microrganismos em 20 minutos de tratamento, e o tempo de redução decimal de aproximadamente 13 minutos. Porém, não podemos considerar como um valor confiável, já que não conseguimos repetir esse resultado numa segunda tentativa, isso porque, como o meio de cultura apresentava umidade, não foi possível garantir uma descarga homogênea em todos os tratamentos.

Com o tratamento de *S. aureus*, semeada em meio de cultura previamente seco em fluxo laminar, conseguimos bons resultados no processo de esterilização. Com a ausência de umidade, conseguimos manter uma descarga estável, assim, a esterilização foi eficiente e rápida. Com apenas 2 minutos de tratamento já alcançamos aproximadamente 99% de morte dos microrganismos. O tempo de redução decimal (D valor), nesse caso, foi de aproximadamente 1,85 minutos.

Nas imagens feitas por microscopia eletrônica de varredura das amostras tratadas por quinze minutos, pudemos observar que algumas células apresentaram danos na sua estrutura, por isso não podemos descartar o efeito da descarga DBD sobre a estrutura dos microrganismos Gram-positivos, causando sua inativação.

Através desses experimentos pudemos concluir que o plasma em pressão atmosférica, gerado por descarga com barreira dielétrica pode ser eficiente para esterilização ou desinfecção de diferentes formas de microrganismos.

Observamos também, em nossos experimentos, que a configuração e os parâmetros elétricos do nosso reator de descarga DBD, não permite a presença de umidade nas placas de Petri. Somente em ambiente seco podemos garantir a formação de uma descarga DBD estável.

Na microscopia eletrônica de varredura pudemos observar que quase todos os microrganismos tratados com a descarga DBD durante 15 minutos, tiveram sua

integridade morfológica comprometida. Houve ruptura da parede celular e em alguns casos extravasamento do citoplasma. Podemos atribuir tais danos físicos às reações químicas causadas pelas espécies reativas formadas nas descargas, e também ao efeito das partículas carregadas. Com a exposição do citoplasma e do material genético, outros componentes ativos na descarga, como UV e ozônio podem agir diretamente, e assim, inativar os microrganismos.

Para viabilizar esse processo de esterilização por plasma com descarga com barreira dielétrica, precisamos obter uma eficácia maior, através do uso de uma fonte com frequência mais alta. Este dispositivo ajudará a diminuir o tempo de exposição ao plasma. Precisamos também realizar mais experimentos, a fim de fazer análise estatística.

REFERÊNCIAS

- ALEXEFF, I.; BALASUNDARAM, A.; PRADEEP, E.P.; KARNAM, N.; PULASANI, N. R.; Biological decontamination using an atmospheric pressure resistive barrier plasma discharge; Publicado em Güçeri, S.; Fridman, A.; Haas, K. G. C.; Plasma Assisted Decontamination of Biological and chemical agents, **Springer**, 2007.
- BAROCH, P.; SAITO, N.; TAKAI, O.; Special type of plasma dielectric barrier discharge reactor for direct ozonization of water and degradation of organic pollution, **J. Phys. D: Appl. Phys.** 41, 2008.
- BIRMINGHAM, J. G.; HAMMERSTROM, D. J.; Bacterial Decontamination Using Ambient Pressure Nonthermal Discharges, **IEEE Transactions on Plasma science**, 28, 51-55, 2000.
- BIRMINGHAM, J.G.; Mechanisms of Bacterial Spore Deactivation Using Ambient Pressure Nonthermal Discharges; **IEEE Transactions on Plasma science**, 32, 1526-1531, 2004.
- BRANDENBURG, R.; KROHMANN, U. K.; STIEBER, M.; WELTMANN, K. D.; WOEDTKE, T. V.; EHLBECK, J.; Antimicrobial treatment of heat sensitive products by atmospheric pressure plasma sources, Publicado em Güçeri, S.; Fridman, A.; Haas, K. G. C.; Plasma Assisted Decontamination of Biological and chemical agents, **Springer**, 2007.
- BURES, B. L.; DONOHUE, K. V.; ROE, R. M.; BOURHAM, M. A.; Nonchemical dielectric barrier discharge treatment as a method of insect control, **IEEE Transactions on Plasma science**, 34, 1257–1269, 2006.

CHEN, F. F.; Introduction to Plasma Physics and Controlled Fusion, 2nd Edition, Plenum. **Hardcover**, 2006.

CHOI, J. H.; HAN, I.; BAIK, H. K.; LEE, M. H.; HAN, D.H.; PARK, J. C.; LEE, I. S.; SONG, K. M.; LIM, Y. S.; Analysis of sterilization effect by pulsed dielectric barrier discharge, **Journal of Electrostatics**; 64; 17–22; 2006.

FRIDMAN, G.; SHERESHEVSKY, A.; JOST, M.M.; BROOKS, A. D.; FRIDMAN, A.; GUTSOL, A.; VASILETS, V.; FRIEDMAN, G.; Floating electrode dielectric barrier discharge plasma in air promoting apoptotic behavior in melanoma skin cancer cell lines, **Plasma Chem Plasma Process**, 27, 163-176, 2007.

FRIDMAN, G. et al.; Blood Coagulation and Living Tissue Sterilization by Floating-Electrode Dielectric Barrier Discharge in Air, **Plasma Chem Plasma Process**, 26, 425–442, 2006.

GALLAGHER, M. J.; GUTSOL, A.; FRIEDMAN, G.; FRIDMAN, A.; Non-Thermal Plasma Applications in Air-Sterilization; **IEEE Transactions on Plasma science**, 32, 2005.

GALLAGHER, M.; VAZE, N.; GANGOLI, S.; VASILETS, V. N.; GUTSOL, A. F.; MILOVANNOVA, T. N.; ANANDAN, S.; MURASKO, D. M.; FRIDMAN, A. A.; Rapid Inactivation of Airborne Bacteria Using Atmospheric Pressure Dielectric Barrier Grating Discharge; **IEEE Transactions on plasma science**, 35, 1501-1510, 2007.

GARATE, E.; EVANS, K.; GORNOSTAEVA, O.; ALEXEFF, I.; KANG, W.; RADER, M.; WOOD, T. K.; Atmospheric plasma induced sterilization and chemical neutralization, **Proc. IEEE Int. Conf. Plasma Science**, p. 183, June, 1998.

GAUNT, L. F.; BEGGS, C. B.; GEORGHIOU, G. E.; Bactericidal Action of the Reactive Species Produced by Gas-Discharge Nonthermal Plasma at Atmospheric Pressure: A Review; **IEEE Transactions on Plasma science**, 34, 1257-1269, 2006.

GOLDSTON, R. J.; RUTHERFORD, P. H.; Introduction to Plasma Physics, **Institute of Physics Publishing**, Bristol and Philadelphia, 1995.

GREENE, A.K., FEW, B.K., SERAFINI, J.C.; A comparison of ozonation and chlorination for the disinfection of stainless steel surfaces; **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 11, p. 3617-3620, 1993.

GUIDOLIN, R.; CORRÊA, A.; CICARELLI, R. M. B.; PREVIDE, E.; MORAIS, J. F.; HIGASHI, H. G.; Esterilização de soros e vacinas por radiação gama de cobalto, **Rev. Saúde Públ.**, S.P., 22(2),113-7, 1988.

GURLEY, B.; Ozone: pharmaceutical sterilant of the future; **J. Parenteral Sci. Technol.** v.39, p.256-61, 1985.

HASHIMOTO, M.; RAHMAN, M.; TANINO, M.; NAKANO, M.; YASUDA, H.; TAKASHIMA, K.; MIZUNO, A.; Cell Destruction by Dielectric Barrier Discharge for Real-time Monitoring of Bio-particles; **International Journal of Plasma Environmental Science & Technology**, vol.1, nº.2, 146-150, 2007.

HERMANN, H.W. ; HENINS, I.; PARK, J. ; SELWYN, G. S.; Decontamination of chemical and biological warfare (CBW) agents using an atmospheric pressure plasma jet, **Phys. Plasmas**, vol. 6, no. 5, pp. 2284–2289, 1999.

ICHIMARU, S.; Basic principles of plasma physics: a statistical approach, 2nd Edition, **Frontiers in physics**, 1980.

JACOBS P, KOWATSH R. Sterrad sterilisation system: a new technology for instrument sterilization. **End Surg.**; 1,57-58, 1993.

KALGHATGI, S.; FRIDMAN, G.; NAGARAJ, G.; COOPER, M.; PEDDINGHAUS M., BALASUBRAMANIAM, M.; VASILETS, V.; GUTSOL, A.; FRIDMAN, A.; FRIEDMAN, G.; Mechanism of blood coagulation by non-thermal atmospheric pressure dielectric barrier discharge, **IEEE Transactions on plasma science**, 35, 1559- 1566, 2007.

KANAZAWA, S.; KOGOMA, MORIVAKI ,T.; OKAZAKI, S.; Stable glow plasma at atmospheric pressure,” **J. Appl. Phys.**, vol. 21, 838–840, 1988.

KOROL, S. et al. Desinfección da agua: acción comparativa del ozono y cloro sobre un amplio espectro bacteriano. **Revista Argentina de Microbiología**, Buenos Aires, v. 27, n . 4, 175-83, 1995.

KRAMER A, PITTEN FAA, FREUNDT & ANDENMATTEN. Risk benefit evaluation of formaldehyde as disinfectant and antiseptic. **Hyg Med.**; 21, 536-557, 1996.

KUZMICHEV, A. I.; SOLOSHENKO, I. A.; TSIOLKO, V. V.; KRYHANOVSKY, V. I.; YU, V.; MIKHNO, I. L.; KHOMICH, V. A.; Feature of sterilization by different type of atmospheric pressure discharges, in **Proc. Int.Symp. High Pressure Low Temperature Plasma Chemistry**, Greifswald, Germany, pp. 402–406, 2001.

KYI, M. S.; HOLTON, J.; RIDGWAY, G. L.; Assessment of the efficacy of low temperature hydrogen peroxide gas plasma sterilization system. **J Hosp Infect.**; 31, 275- 84, 1995.

LAUROSSI, M., Sterilization of tools and infectious waste by plasmas, **Bull. Amer. Phys. Soc. Div. Plasma Phys.**, vol. 40, no. 11, pp. 1685–1686, 1996.

LAROUSSI, M.; Nonthermal Decontamination of Biological Media by Atmospheric-Pressure Plasmas: Review, Analysis, and Prospects; **IEEE Transaction on Plasma Science**, v. 30, n. 4, 1409-1415, 2001.

MANLEY, T. C.; **Tans. Electrochem. Soc.**, 84, p. 83, 1943.

MENDIS, A.; ROSENBERG, M.; AZAM, F. ; A note on the possible electrostatic disruption of bacteria, **IEEE Trans. Plasma Sci.**, vol. 28, pp. 1304–1306, Aug. 2000.

MOISAN, M.; BARBEAU, J.; PELLETIER, J.; PHILIP, N.; SACUDI, B. Plasma sterilization: mechanisms, potential and shortcomings. Le Vide: **Science, Technique et Applications**, n. Esp., p. 12-18, 2001. (Actes de 13 th international colloquium plasma process CIP 2001)

MONTIE, T. C.; KELLY-WINTENBERG, K.; ROTH, J. R.; An overview of research using the one atmosphere uniform glow discharge plasma (OAUGDP) for sterilization of surfaces and materials, **IEEE Trans.Plasma Sci.**, vol. 28, pp. 41–50, Feb. 2000.

RICHARDSON, J.P.; DYER, F. F.; DOBBS, F. C.; ALEXEFF, I.; LAROUSSI, M.; On the use of the resistive barrier discharge to kill bacteria: Recent results, **Proc. IEEE Int Conf. Plasma Science**, p. 109, 2000.

RUTALA, W.A.; Desinfection and sterilization of patient-care items. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.17, n.6, p.377-384, 1996.

SUN, Y.; Qiu, Y.; Experimental Research on Inactivation of Bacteria by Using Dielectric Barrier Discharge, **IEEE TRANSACTIONS ON PLASMA SCIENCE**, p. 3803-3813, 2007

TANINO, M.; XILU, W.; TAKASHIMA, K.; KATSURA, S.; MIZUNO, A.; Sterilization using Dielectric Barrier Discharge at Atmospheric Pressure, **International Journal of Plasma Environmental Science & Tecnology**; 1,102-107, 2007.

XINGMIN, S.; YUKANG, Y., YANZHOU, S.; WANG, Y.; FENGLING, P., YUCHANG, Q.; Experimental Research of Inactivation Effect of Low-Temperature Plasma on Bacteria, **Plasma Science & Technology**, v.8, N.5, Sept., 2006.

YAMAMOTO, M.; NISHIOKA, M.; SADAKATA, M.; Sterilization using a corona discharge with HO droplets and Examination of effective species, **Proc. 15th Int. Symp. Plasma Chemistry**, vol. II, Orleans, France, pp. 743–751, 2001.

YASUDA, H.; HASHIMOTO, M.; RAHMAN, M.; TAKASHIMA, K.; MIZUNO, A.; States of Biological Components in Bacteria and Bacteriophages during Inactivation by Atmospheric Dielectric Barrier Discharges; **Plasma Process. Polym.**, 5, 615–621, 2008.

YUE MA, GUAN-JUN ZHANG, XING-MIN SHI, GUI-MIN XU, YUN YANG, Chemical Mechanisms of Bacterial Inactivation Using Dielectric Barrier Discharge Plasma in Atmospheric Air, **IEEE Transactions on Plasma science**, 36, 1615 – 1620, 2008.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

D'AGOSTINO, R., Plasma deposition, treatment and etching of polymers: plasma etching for organic polymers. **Plasma - Materials Interactions**. Boston: Academic Press, p. 321, 1990.

BIRMINGHAM, J. G.; IRVING P.; Corona discharge plasma reactor for decontamination, **Proc. IEEE Int. Conf. Plasma Science**, p. 183, 1998.

BITTENCOURT, J.A.; Fundamentals of Plasma Physics, 3rd Edition, **Springer**, 1999.

HAYAKAWA, I.; FURUKAWA, S.; MIDZUNAGA, A.; HORIUSHI, H.; NAKASHIMA, T.; FUJIO, Y.; YANO, Y.; ISHIKURA, T.; SASAKI, K.; Mechanism

of inactivation of heat-tolerant spores of *Bacillus stearothermophilus* IFO 12550 by rapid decompression. **Journal of Food Science**, v.63, n.3, p.371-374, 1998.

HOLY, C.E.; CHENG, C.; DAVIES, J.E.; SHOICHET, M.S.; Optimizing the sterilization of PLGA scaffolds for use in tissue engineering. **Biomaterials**, n.22, n.1, p.25-31, 2001.

HUGO, W.B.; RUSSEL, A.D. **Pharmaceutical microbiology**, 3 ed., Oxford, Boston: Blackwell Scientific Publications; Saint Louis: Blackwell Mosby, p.470, 1983.

JACKONS, J. D.; BRADSEN, B. H.; JOACHAIN, C. J.; Physics of Atoms and Molecules - Classical Electrodynamics, British Library Cataloguing in **Publication Data**, Longman Group Limited, 1984.

KOGELSCHATZ, U. Dielectric Barrier Discharges: Their History, Discharge Physics, and Industrial Applications. **Plasma Chemistry and Plasma Processing**, vol.23, p.1, 2003.

MASSINES, F.; MAYROUX, C.; MESSAOUDI, R.; RABEHI, A., SEGUR, P. ; Experimental study of an atmospheric pressure glow discharge: Application to polymers surface treatment, **Proc. Int. Conf. Gas Discharges and Their Applications**, Swansea, U.K., pp. 730–733, 1992.

THIYAGARAJAN, M.; ALEXEFF, I.; PARAMESWARAN, S.; BEEBE, S.; Atmospheric pressure resistive barrier cold plasma for biological decontamination, **IEEE Transactions on plasma science**, 33, 2, 2005.

YANZHOU, S.; YUCHANG, Q.; AILING, N.; XUNDONG, W.; Experimental Research on Inactivation of Bacteria by Using Dielectric Barrier Discharge, **IEEE Transactions on plasma science**, January, 2000.

APÊNDICE A – Obtenção da Potência através da figura de Lissajous

A determinação experimental da potência consumida na descarga por barreira dielétrica mostra-se complicada porque a potência é consumida em um grande número de microdescargas com duração em um curto intervalo de tempo.

Podemos utilizar as figuras de Lissajous formadas por superposição entre a voltagem e a carga para determinar a potência média na descarga, segundo o trabalho original de Manley 1943.

A idéia é utilizar uma corrente integrada no tempo, referente à carga, ao invés de utilizar os picos de corrente das microdescargas individualmente. Isso pode ser feito utilizando um capacitor em série ao experimento de descarga. Pode-se ser rigorosamente mostrado que a área de um ciclo fechado de um gráfico de voltagem em função da carga corresponde à energia consumida durante um período deste ciclo.

A forma desta figura de Lissajous obtida contém informações importantes sobre a descarga. Para um circuito de capacitância pura, a figura de Lissajous resulta em uma linha reta; a adição de uma resistência resulta em uma elipse. Na maioria das aplicações de descargas por barreiras dielétricas, a figura assemelha-se a um paralelogramo ideal, como mostrado na Figura A1, de onde a voltagem da descarga, a capacitância efetiva do intervalo de descarga e o dielétrico podem ser obtidos.

Os declives das linhas na figura de Lissajous representam as capacitâncias do ar e do dielétrico do reator. Manley 1943 assumiu que o plasma da descarga DBD enchia a área entre os eletrodos de forma que a capacitância do dielétrico poderia ser obtida através do declive da figura de Lissajous durante o período da descarga.

Diagrama de Lissajous

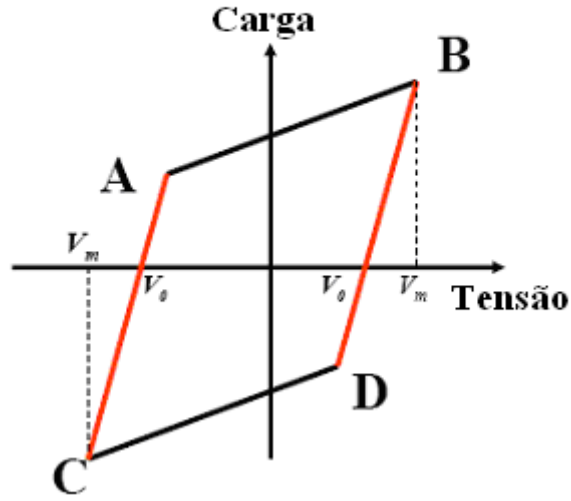


Figura A1 - Esquema do diagrama de Lissajous. Os declives AC e BD representam a capacitância do dielétrico, e os declives AB e CD a capacitância do reator. V_m e V_0 são a tensão máxima aplicada e a tensão de ruptura (tensão mínima para inicializar a descarga), respectivamente.

Durante o período sem a formação de descarga DBD (fase carregada), a abertura entre os eletrodos está cheia com ar, ou um gás, de forma que os declives AB e CD representam a capacitância total no reator, C_T , que consiste em dielétrico e ar.

Durante o período da descarga o plasma enche toda a abertura entre os eletrodos. Então, os declives de BD e CA representam a capacitância do material dielétrico no reator, C_d . Então, sendo C_a a capacitância do ar, temos que:

- Fase carregada: Declive AB / CD ($= C_T$): $\frac{1}{C_T} = \frac{1}{C_a} + \frac{1}{C_d}$.
- Fase de descarga: Declive BD / CA ($= C_d$).

Segundo Manley 1943, a energia (W) dissipada na descarga DBD pode ser obtida da área da figura de Lissajous e é determinada por:

$$W = 4C_d V_0 \left(V_m - \left(\frac{C_a + C_d}{C_d} \right) V_0 \right), \quad (A1)$$

onde V_0 é a tensão de ruptura, e V_m é a tensão máxima aplicada. C_d e C_a são as capacitâncias do dielétrico e do ar entre os eletrodos, respectivamente. Como vimos, essas capacitâncias são obtidas pelos declives da figura de Lissajous nos períodos com e sem a formação da descarga DBD, respectivamente.

A potência dissipada correspondente (P) é expressa por:

$$P = 4 f C_d V_0 \left(V_m - \left(\frac{C_a + C_d}{C_d} \right) V_0 \right), \quad (A2)$$

onde f é a frequência operacional. Como as cargas superficiais no dielétrico são consumidas para sustentar a descarga, a capacitância do dielétrico tem um papel importante na descarga DBD. O consumo das cargas superficiais é proporcional à frequência operacional, de forma que a potência máxima é dissipada na frequência operacional ótima.

As capacitâncias da descarga DBD dependem da distância de abertura entre os eletrodos, do tamanho e da forma dos eletrodos, e da constante dielétrica do material dielétrico. Então, a frequência ótima varia com a configuração do reator, e a potência máxima dissipada pode ser obtida da Equação A2 usando a frequência ótima:

$$P_{Max} = 4 f_0 C'_d V_0 \left(V_m - \left(\frac{C_a + C'_d}{C'_d} \right) V_0 \right). \quad (A3)$$

A densidade da potência dissipada (definida como a potência dissipada no volume da descarga) varia com a capacitância do reator que é proporcional à área A do eletrodo e inversamente proporcional à distância de abertura d de um reator planar. Assim, assume-se que a capacitância, C , no reator é simplesmente:

$$C = \varepsilon_T \frac{A}{d}, \quad (A4)$$

onde $\varepsilon_T = k\varepsilon_0$, com $\varepsilon = 8,854.10^{-12} C^2 / N^2 m^2$, e k é a constante dielétrica da barreira dielétrica.