

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
Programa de Pós-graduação em Fármaco e Medicamentos  
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Micobactérias de Crescimento Rápido de Importância Médica  
no Brasil: Eficácia Antimicrobiana de Desinfetantes e  
Sistema de Esterilização por Plasma

Juliano de Moraes Ferreira Silva

Tese para obtenção do Grau de  
DOUTOR

Orientadora:  
Profa. Dra. Terezinha de J. A. Pinto

São Paulo  
2010

Juliano de Moraes Ferreira Silva

Micobactérias de Crescimento Rápido de Importância Médica no Brasil:  
Eficácia Antimicrobiana de Desinfetantes e  
Sistema de Esterilização por Plasma

Comissão Julgadora  
da  
Tese para obtenção do grau de Doutor

---

Profa. Dra. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto  
Orientador/Presidente

---

Profa. Dra. Maria Silvana Alves

---

Profa. Dra. Sylvia Cardoso Leão

---

Profa. Dra. Patrícia Santos Lopes

---

Profa. Dra. Telma Mary Kaneko

São Paulo, 26 de novembro de 2010.

***A Deus pelo dom e sentido da Vida.***

***Aos meus pais Geraldo (in memorian) e Sueli,  
Irmã Juliana e sobrinha Amanda, avós Abel (in memorian) e Célia  
e Tia Neli pela formação, exemplos de Vida e Amor sempre dedicados.***

***À Profa. Dra. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto  
pelos ensinamentos, orientação e exemplo de competência a ser seguido.***

## AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de realização do curso de Doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão da bolsa de Doutorado.

À Escola de Engenharia Politécnica da Universidade de São Paulo pela disponibilização do equipamento de Plasma e Microscópio Eletrônico de Varredura, Espectroscopia de Energia Dispersiva e Perfilometria.

À Comunidade da Igreja Presbiteriana do Butantã que me recebeu por meio de seu projeto Casa do Estudante e pelo constante apoio durante o desenvolvimento deste trabalho. Aos Amigos moradores da Casa do Estudante pelo convívio e apoio constantes.

À Profa. Dra. Célia Hitomi Yamamoto, Profa. Dra. Maria Silvana Alves e Prof. Dr. José de Jesus Ribeiro Gomes de Pinho da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora e ao Amigo Zelimar Lima pelo incentivo nos primeiros passos na pesquisa científica e constante apoio ao longo do desenvolvimento deste projeto.

À Profa. Dra. Telma Mary Kaneko, Profa. Dra. Mitsuko Taba Ohara e Profa. Dra. Irene Satiko Kikuchi do Laboratório de Controle Biológico de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo pelo convívio e sugestões para concretização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Ronaldo Domingues Mansano e demais amigos, Adir José Moreira, Nelson Ordonez, Alexandre Marques Campanucci e Elíseo José de Lima do Laboratório de Sistemas Integráveis da Escola de Engenharia Politécnica da Universidade de São Paulo pelo profissionalismo, sugestões e apoio nos experimentos com Plasma e na aquisição das imagens microscópicas.

À Profa. Dra. Sylvia Cardoso Leão, Dra. Cristina Viana-Niero, Janaína Seriwaka, Camila Fujikawa, Dra. Michele Rabello, Profa. Dra. Célia Regina Witacker Carneiro, do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de São Paulo, pela concessão do uso das cepas de *Mycobacterium* spp. e por todo o apoio para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Maria Cecília Barbosa da Silveira Salvadori, responsável pelo Laboratório de Filmes Finos do Instituto de Física da Universidade de São Paulo, pela concessão do uso do Microscópio Eletrônico de Varredura e à técnica Fernanda Teixeira de Sá pela aquisição das imagens.

À Dra. Áurea Silveira Cruz, da Seção de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz, pela pronta disponibilidade e por toda a ajuda relacionada aos ensaios biológicos de citotoxicidade.

Ao Prof. Dr. Yoshio Kawano, do Laboratório de Espectroscopia Molecular do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, pela valiosa contribuição na geração e interpretação dos dados relacionados à Espectroscopia Fotoacústica no Infravermelho.

À Profa. Dra. Kazuko Graziano Ushikawa, da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo e Profa. Dra. Mônica Valero da Silva, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Brasília, pelas valiosas sugestões e considerações no Exame de Qualificação.

À empresa Peróxidos do Brasil Ltda. (Grupo Solvay), pela doação dos agentes químicos Ácido Peracético e Peróxido de Hidrogênio.

Aos companheiros do Laboratório de Controle Biológico de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos: Wesley Oliveira, Gabriele Ruas, Délia Luna Pinto, Rafael Takamoto, Siliane Souza, Beatriz Freitas, Elissa Ostrosky, Marcos Enoque Lima, Miriam Cristina Matuo, Aline Moraes, Fernando Vitalli, Débora Oliveira, Renata Soriani e Michele Boscariol pelo convívio e amizade.

Aos amigos Anderson Stevaux, Cláudio Bonato, José de Souza Sobrinho, Marcelo Duque e Rogério Kreidel pela amizade, incentivos e constante apoio.

Aos amigos do Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos, Cosméticos, Domissanitários, Produtos Afins e as Respectivas Matérias-Primas (CONFAR), Marli, Rosa, Felipe, Elizabeth, Daniela, Thiago, Cleide, Sueli, Gláucia, Diana e Tia Rita.

À Dra. Eliane Arouca, Dr. Rogério Morihisa, Dr. Décio Moreira, Dra. Débora Spaine, Dra. Raquel Iamaguchi, Dra. Karina Campos, Dr. José Adélio, Dr. Alexandre Barbosa e Dr. Stênio Zequi pelos cuidados com minha saúde e incentivos na área acadêmica.

À Elizabeth Claro de Souza Paiva, Secretária da Pós-graduação do Departamento de Farmácia e Elaine Midori, Jorge Lima, Suzi e Majô, Secretários da Pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas pela atenção, apoio e incentivos durante a realização deste trabalho.

Aos membros da Comissão Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Fármaco e Medicamentos, Profa. Elizabeth Igne Ferreira, Profa. Dominique Corinne Fischer, Profa. Valentina Porta, Profa. Carlota Rangel Yague, Profa. Cristina Helena Reis, e companheiros de Representação Discentes, Giancarlo Botteselle e Max Strasser.

Aos companheiros de Representação Discente junto à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pró-Reitoria de Cultura e Extensão e da Associação de Pós-graduação (APG-USP).

À Profa. Silvia Regina Cavani Santos e companheiros da Comissão de Qualidade da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Felipe Lourenço, Claudinéia Oliveira e Edgar Machado Jr. pela amizade, companheirismo e exemplo de trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Informática da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Auriluce Oliveira, Renato Flamini e Luiz Alberto.

Às bibliotecárias, Adriana Barreiro, Leila Bonadio e Maria Luiza pelo auxílio nas pesquisas e adequação das referências bibliográficas.

À Cláudia Rocha da Costa pelo apoio, carinho e companheirismo e aos seus pais Prof. Dr. Liovando Costa e esposa Marisa Costa pelo carinho e incentivos na carreira acadêmica.

Aos amigos de caminhada Ana Cristina Sathler, Damares Plácido, Davi Gonçalves e Juliana Seves, Doralice, Élcio Santiago e Amanda, Felipe Figueiredo, Jaques Franco, Josseara Beraldo, Leandro Joras e Liège Rinaldi, Marina de Moura, Paulo Roberto Muniz, Robson Panizzi, Vivian Zague, Washington Mukarzel, Willian Matos e Valeska Gonzalez.

Aos companheiros de pós-graduação: Claudimar, Milessa, Michele Issa, Andréia, Jesus Pena, Karen Lopes, Graziela Perez, Patrícia Granizo, Fernanda Perez, Fábio Gomes, Vanessa Almeida, Jeanine Giarola, Fagner e Charles Brito.

Aos amigos Sônia Faria, Cairo Toledano, Luher Gawa, Helene Ruedlinger e Rahel Regli, do *Young Pharmacists Group* da *International Pharmacists Federation* (FIP – Holanda) pelo carinho e incentivos.

## RESUMO

**SILVA, J.M.F.** Micobactérias de Crescimento Rápido de Importância Médica no Brasil: Eficácia Antimicrobiana de Desinfetantes e Sistema de Esterilização por Plasma, 2010. 269f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2010.

Práticas inadequadas de descontaminação, desinfecção e esterilização de materiais médico-hospitalares têm propiciado o surgimento de inúmeros surtos de infecções por “Micobactérias de Crescimento Rápido” (MCR), em todo o Brasil. Entre os anos de 2000 a 2008 foram relatados mais de 2000 casos confirmados de infecções por MCR, sendo que os procedimentos por vídeo se constituíram como os maiores veiculadores destes microrganismos. O aumento do emprego de dispositivos de natureza polimérica em procedimentos médico-cirúrgicos e ausência/não cumprimento de protocolos de processamento destes materiais podem estar envolvidos na disseminação, principalmente, pela capacidade de MCR produzirem e sobreviverem em sistemas de biofilmes. Desta forma, este trabalho teve como objetivo a avaliação da susceptibilidade de cepas de *Mycobacterium abscessus* subsp. *boletii* (suspensão e biofilmes), causadoras ou não de surto, frente a desinfetantes químicos constituídos de: Glutaraldeído 2%, Ácido Peracético 0,2%, Peróxido de Hidrogênio 35%, Solução Alcoólica de Digluconato de Clorexidina 0,5%, Solução Aquosa de Clorexidina 0,2%, Compostos de Amônio Quaternário 1,2%, Iodo 1% e Fenol 5% e Sistemas de Esterilização por Plasma (RIE e ICP) empregando mistura gasosa  $O_2-H_2O_2$ . Paralelamente, suportes poliméricos (PVC, PEAD, PP, PUR e PC) empregados como carreadores de MCR foram analisados por Espectroscopia Fotoacústica no Infravermelho (PAS-FTIR), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), microanálise em Sistema *Energy Dispersive Spectroscopy* (EDS) e Perfilometria. Resultados destas investigações demonstraram a resistência das cepas de *M. abscessus* subsp. *boletii*, isolada do surto ocorrido em Belém, frente a Glutaraldeído 2%, Solução Alcoólica de Digluconato de Clorexidina 0,5%, Solução Aquosa de Clorexidina 0,2%, Compostos de Amônio Quaternário 1,2% e Iodo 1%. Entretanto, estas cepas foram altamente sensíveis à Ácido Peracético 0,2%, Peróxido de Hidrogênio 35% e Fenol 5% e Sistema de Esterilização por Plasma (RIE). Em sistemas de biofilmes, as cepas padrão e *M. abscessus* subsp. *boletii* se apresentaram resistentes a todos os desinfetantes estudados. Nos estudos envolvendo a integridade de polímeros frente a processos por plasma foram demonstradas modificações em nível superficial (oxidação e aumento da rugosidade) em todos os materiais processados, sendo que o sistema ICP apresentou-se mais agressivo em relação àquele empregando RIE.

Palavras-chave: Micobactérias de Crescimento Rápido, *Mycobacterium abscessus* subsp. *boletii*, Surto, Desinfetantes Químicos, Esterilização por Plasma.



## ABSTRACT

Numerous outbreaks of *Rapid Growth of Mycobacteria* (RGM) have been associated with decontamination, disinfection and sterilization malpractices, in Brazil. Between 2000-2008 were reported more than 2,000 confirmed cases due to RGM infections, and the video procedures were considered to carry these microorganisms. The increased use of medical devices in surgical procedures may be involved in the RGM spreading by its ability to grow and survive in biofilm systems. The aim of this study was evaluate the susceptibility of *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* (outbreak and nonoutbreak strains) to chemical disinfectants: Glutaraldehyde 2%, Peracetic Acid 0.2%, Hydrogen Peroxide 35%, Chlorhexidine Digluconate 0.5%, Chlorhexidine 0.2%, Iodine 1%, Quaternary Ammonium Compounds 1.2%, and Phenol 5%. Plasma Sterilization Technologies (*Reactive Ion Etching* and *Inductively Coupled Plasma*) were also evaluated. Polymers employed in medical devices (Polyvinyl chloride, High-Density Polyethylene, Polycarbonate, Polypropylene, and Polyurethane) were analyzed by Photoacoustic Infrared Spectroscopy (PAS-FTIR), Scanning Electron Microscopy (SEM), System Energy Dispersive Spectroscopy (EDS) and Profilometry. The results have demonstrated the resistance of *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* isolated from the Belém (PA) outbreak considering chemical exposition to Glutaraldehyde 2%, Chlorhexidine Digluconate 0.5%, Chlorhexidine 0.2%, Quaternary Ammonium Compounds 1.2%, and Iodine 2%. However, these strains were highly sensitive to Peracetic Acid 0.2%, Hydrogen Peroxide 35%, and Phenol 5%. The *M. abscessus* subsp. *bolletii* strains have been presented resistant to all disinfectants studied, in biofilm systems. Studies involving polymer integrity demonstrated changes in surface (oxidation and roughness) on all processed materials, and the ICP system was more aggressive in contrast to *Reactive Ion Etching*.

Keywords: Rapidly Growing Mycobacteria, *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii*, Outbreak, Chemical Disinfectants, Plasma Sterilization Technology.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Glicopeptideolípide não específico do Complexo <i>M. avium</i> (MCL) e <i>M. smegmatis</i> (MCR) (SCHOREY; SWEET, 2008).....	35
Figura 2	– Infiltrado esbranquiçado da interface córnea na presença de borda intacta, duas semanas após a cirurgia de endoqueratoplastia (a). Paciente modelo, após duas semanas de cirurgia de endoqueratoplastia (b) (BUSIN et al., 2003).....	36
Figura 3	– Casos confirmados de infecção por NTM, no período entre 2000 e 2008 (ANVISA, 2009).....	39
Figura 4	– Árvore filogenética de sequência de genes combinados <i>rpoB_recA</i> de <i>M. massiliense</i> e 17 micobactérias de crescimento rápido usando o método <i>Neighbor-Joining</i> e modelo evolutivo <i>Kimura</i> (correlação com dois parâmetros de distância) (ADÉKAMBI et al., 2004).....	43
Figura 5	– Biofilme de <i>Candida albicans</i> na superfície de um cateter. A matriz do biofilme consiste de fungo, hifas e uma rede extensa de material polimérico extracelular (HAWSER; ISLAM, 2006).....	46
Figura 6	– Energia potencial ( <i>V</i> ) de interação partícula-partícula em função da distância ( <i>d</i> ) de separação entre a célula microbiana e a superfície.....	47
Figura 7	– Estrutura de biofilmes em diferentes fases de desenvolvimento. <i>Center for Biofilm Engineering at MSU-Bozeman</i> <sup>®</sup> , 2003.....	48
Figura 8	– Mecanismos de tolerância dos sistemas de biofilme. <i>Center for Biofilm Engineering at MSU-Bozeman</i> <sup>®</sup> , 2003.....	49
Figura 9	– Formas de dispersão de microrganismos em sistemas de biofilme. <i>Center for Biofilm Engineering at MSU-Bozeman</i> <sup>®</sup> , 2003.....	49
Figura 10	– Microscopia Confocal: estágios da formação de biofilme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . <i>Nature Reviews/Molecular Cell Biology</i> . 50	50

Figura 11	– Susceptibilidade microbiana relativa aos agentes antimicrobianos (RUSSELL, 1998).....	54
Figura 12	– Principais aldeídos empregados como desinfetantes/esterilizantes.	55
Figura 13	– Síntese para obtenção industrial de glutaraldeído (RUSSELL, 1982).....	56
Figura 14	– Estrutura linear e espacial do ácido peracético.....	57
Figura 15	– Rota de obtenção do ácido peracético.....	57
Figura 16	– Estrutura linear e espacial do peróxido de hidrogênio.....	58
Figura 17	– Estrutura linear da biguanida clorexidina.....	58
Figura 18	– Exemplos de compostos de amônio quaternário.....	59
Figura 19	– Estrutura linear de iodóforos.....	60
Figura 20	– Exemplos de compostos fenólicos.....	60
Figura 21	– Estados da matéria, temperatura e energia da partícula (GRILL, 1994).....	68
Figura 22	– Mecanismos de inativação de microrganismos por plasma (MOISAN et al., 2002).....	72
Figura 23	– Desenho esquemático do método de síntese para obtenção de poli(cloreto de vinila).....	83
Figura 24	– Desenho esquemático do método de síntese para obtenção de polietileno de alta densidade.....	84
Figura 25	– Desenho esquemático do método de síntese para obtenção do polipropileno.....	85

Figura 26	– Desenho esquemático do método de síntese para obtenção do poliuretano.....	86
Figura 27	– Desenho esquemático do policarbonato em uma de suas denominações comerciais, o Lexan® .....	87
Figura 28	– Suportes vítreos contendo esporos de <i>Bacillus atrophaeus</i> , em placa de Petri, destinados às validações dos sistemas de plasma...	107
Figura 29	– Curva de crescimento microbiano referente à cepa <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> (INCQS 594) isolada de surto ocorrido em Belém.....	113
Figura 30	– Sistema de plasma com acoplamento capacitivo modo <i>Reactive Ion Etching</i> (RIE).....	124
Figura 31	– Câmara do sistema de plasma com acoplamento capacitivo modo <i>Reactive Ion Etching</i> (RIE) .....	124
Figura 32	– Placa de Petri sobre o eletrodo (cátodo) no interior da câmara do sistema de plasma com acoplamento capacitivo modo <i>Reactive Ion Etching</i> (RIE).....	125
Figura 33	– Desenho esquemático representando as etapas do processo de esterilização por plasma empregando o sistema <i>Reactive Ion Etching</i> .....	126
Figura 34	– Desenho esquemático das variações de pressão aplicadas durante os processos de plasma .....	127
Figura 35	– Sistema de plasma de alta densidade com acoplamento indutivo modo <i>Inductively Coupled Plasma</i> (ICP).....	128
Figura 36	– Vista interna do dispositivo de acoplamento indutivo (posição da bobina).....	128
Figura 37	– Vista lateral do dispositivo, conexões de água de refrigeração e radiofrequência.....	129

Figura 38	–	Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) JEOL 6460LV.....	131
Figura 39	–	Polímeros fragmentados em cerca de 10mm x 10mm posicionados sobre o porta-amostra (vinte e cinco fragmentos).....	131
Figura 40	–	Equipamento de deposição de ouro marca Edwards, modelo “sputter coater 5150B”.....	132
Figura 41	–	Desenho esquemático da coluna de alto vácuo do Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) JEOL 6460LV.....	132
Figura 42	–	Relação entre a altura medida (h) e a distância entre o ponto mais baixo da ponta da agulha e o degrau da trincheira (y).....	134
Figura 43	–	Sistemas de Biofilmes: (a) <i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155; (b) <i>M. massiliense</i> CCUG 48898; (c) <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> (MG3-6); (d) <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> (B67); (e) <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> (B31) e (f) <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> (INCQS 594).....	186
Figura 44	–	Biofilme: a) Bactéria planctônica pode ser removida por anticorpos, fagócito e são susceptíveis a antimicrobianos; b) Células bacterianas aderidas formando biofilmes em superfícies inertes e comunidades sésseis são resistentes a anticorpos, fagócitos e antimicrobianos; c) Fagócitos são atraídos para o biofilme; d) Enzimas fagocíticas danificam tecidos em torno do biofilme e as bactérias planctônicas são liberadas. Esta liberação pode causar disseminação e infecção aguda na vizinhança do tecido.....	190
Figura 45	–	Espectros de Radiação Infravermelha obtidos em equipamento BOMEM PCDA para cinco amostras de PVC (uma não exposta e quatro expostas) sob quatro combinações de parâmetros (RIE-O <sub>2</sub> ; RIE-O <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ; ICP-O <sub>2</sub> ; ICP-O <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	197
Figura 46	–	Espectros de Radiação Infravermelha obtidos em equipamento BOMEM PCDA para cinco amostras de PEAD (uma não exposta e quatro expostas) sob quatro combinações de parâmetros (RIE-O <sub>2</sub> ; RIE-O <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ; ICP-O <sub>2</sub> ; ICP-O <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	200

Figura 47	– Espectros de Radiação Infravermelha obtidos em equipamento BOMEM PCDA para cinco amostras de PP (uma não exposta e quatro expostas) sob quatro combinações de parâmetros (RIE-O <sub>2</sub> ; RIE-O <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ; ICP-O <sub>2</sub> ; ICP-O <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	203
Figura 48	– Espectros de Radiação Infravermelha obtidos em equipamento BOMEM PCDA para cinco amostras de PUR (uma não exposta e quatro expostas) sob quatro combinações de parâmetros (RIE-O <sub>2</sub> ; RIE-O <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ; ICP-O <sub>2</sub> ; ICP-O <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	205
Figura 49	– Espectros de Radiação Infravermelha obtidos em equipamento BOMEM PCDA para cinco amostras de PC (uma não exposta e quatro expostas) sob quatro combinações de parâmetros (RIE-O <sub>2</sub> ; RIE-O <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ; ICP-O <sub>2</sub> ; ICP-O <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	207
Figura 50	– Fotomicrografias do PVC obtidas por MEV. (a) Aumento de 37000 vezes; (b, c, d, e) Aumento de 1000 vezes. a- PVC não exposto; b- PVC (RIE-O <sub>2</sub> ); c- PVC (RIE-O <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ); d- PVC (ICP-O <sub>2</sub> ); e- PVC (ICP-O <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	211
Figura 51	– Fotomicrografias do PEAD obtidas por MEV. (a) Aumento de 5000 vezes; (b, c, d, e) Aumento de 1000 vezes. a- PEAD não exposto; b- PEAD (RIE-O <sub>2</sub> ); c- PEAD (RIE-O <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ); d- PEAD (ICP-O <sub>2</sub> ); e- PEAD (ICP-O <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	212
Figura 52	– Fotomicrografias do PP obtidas por MEV. (a) Aumento de 37000 vezes; (b, c, d, e) Aumento de 1000 vezes. a- PP não exposto; b- PP (RIE-O <sub>2</sub> ); c- PP (RIE-O <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ); d- PP (ICP-O <sub>2</sub> ); e- PP (ICP-O <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	213
Figura 53	– Fotomicrografias do PUR obtidas por MEV. (a) Aumento de 37000 vezes; (b, c, d, e) Aumento de 1000 vezes. a- PUR não exposto; b- PUR (RIE-O <sub>2</sub> ); c- PUR (RIE-O <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ); d- PUR (ICP-O <sub>2</sub> ); e- PUR (ICP-O <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	214
Figura 54	– Fotomicrografias do PC obtidas por MEV. (a, b, c, d, e) Aumento de 1000 vezes. a- PC não exposto; b- PC (RIE-O <sub>2</sub> ); c- PC (RIE-O <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ); d- PC (ICP-O <sub>2</sub> ); e- PC (ICP-O <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	215
Figura 55	– Placas da linhagem celular NCTC clone 929 utilizada no Método de Difusão em Ágar – controle positivo (a) e controle negativo (b)..	230

Figura 56 – Fotomicrografia da zona limítrofe entre o controle positivo (esquerda) e controle negativo (direita) – Aumento de 100 vezes.... 230

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Distribuição dos casos notificados de infecção por Micobactérias não-tuberculosas, entre 2000 e 2008, no Brasil (ANVISA, 2009).....	38
Tabela 2	– Distribuição de NTM envolvidos no surto ocorrido no Brasil, em 2008 (ANVISA, 2009).....	40
Tabela 3	– Distribuição de casos notificados por grupo de procedimento e via de acesso, em 2008 (ANVISA, 2009).....	41
Tabela 4	– Mecanismos de ação de desinfetantes.....	62
Tabela 5	– Comercialização de materiais poliméricos sintéticos.....	80
Tabela 6	– Aplicações clínicas e tipos de polímeros empregados na medicina (RATNER et al., 2004).....	81
Tabela 7	– Padronização da nomenclatura utilizada no procedimento de produção da suspensão de esporos de <i>Bacillus atrophaeus</i> .....	104
Tabela 8	– Micobactérias de Crescimento Rápido isoladas de surto, não relacionadas ao surto, de ambiente natural e cepas-padrão.....	105
Tabela 9	– Contagem de <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> (INCQS 594) isolada de surto ocorrido em Belém, após 10 dias de incubação.....	112
Tabela 10	– Curva de calibração da vazão de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> em função da pressão e vazão de O <sub>2</sub> no interior da câmara.....	122
Tabela 11	– Parâmetros de processo estudados nos sistemas de plasma RIE e ICP.....	123
Tabela 12	– Contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias de cepas de <i>Mycobacterium</i> spp. antes e após a exposição ao Caldo Dey/Engley por 5, 10, 15 e 20 minutos. ....	141
Tabela 13	– Contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias de cepas de <i>Mycobacterium</i> spp. antes e após a exposição ao Sulfato de Sódio 0,1% por 5, 10, 15 e 20 minutos.....	143



Tabela 14 – Contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias de cepas de <i>Mycobacterium</i> spp. antes e após a exposição ao Polissorbato 80 0,5% – Lecitina 0,07% por 5, 10, 15 e 20 minutos..	145
Tabela 15 – Contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias de cepas de <i>Mycobacterium</i> spp. antes e após a exposição ao Polissorbato 80 0,5% por 5, 10, 15 e 20 minutos.....	146
Tabela 16 – Contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias de cepas de <i>Mycobacterium</i> spp. antes e após a exposição ao Soro de Cavallo por 5, 10, 15 e 20 minutos.....	148
Tabela 17 – Contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias de cepas de <i>Mycobacterium</i> spp. antes e após a exposição ao Caldo D/E e Glutaraldeído 2% por 5, 10, 15 e 20 minutos.....	150
Tabela 18 – Contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias de cepas de <i>Mycobacterium</i> spp. antes e após a exposição ao Caldo D/E e Ácido Peracético 0,2% por 5, 10, 15 e 20 minutos.....	151
Tabela 19 – Contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias de cepas de <i>Mycobacterium</i> spp. antes e após a exposição ao Caldo D/E e Peróxido de Hidrogênio 35% por 5, 10, 15 e 20 minutos.....	152
Tabela 20 – Contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias de cepas de <i>Mycobacterium</i> spp. antes e após a exposição ao Sulfito de Sódio 0,1% e Glutaraldeído 2% por 5, 10, 15 e 20 minutos.....	155
Tabela 21 – Contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias de cepas de <i>Mycobacterium</i> spp. antes e após a exposição ao Sulfito de Sódio 0,1% e Ácido Peracético 0,2% por 5, 10, 15 e 20 minutos.....	156
Tabela 22 – Contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias de cepas de <i>Mycobacterium</i> spp. antes e após a exposição ao Sulfito de Sódio 0,1% e Peróxido de Hidrogênio 35% por 5, 10, 15 e 20 minutos.....	157
Tabela 23 – Contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias de cepas de <i>Mycobacterium</i> spp. antes e após a exposição ao Polissorbato 80 0,5% – Lecitina 0,07% e solução alcoólica de Digluconato de Clorexidina 0,5% por 5, 10, 15 e 20 minutos.....	159

Tabela 24 – Contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias de cepas de <i>Mycobacterium</i> spp. antes e após a exposição ao Polissorbato 80 0,5% – Lecitina 0,07% e solução de Clorexidina 0,2% por 5, 10, 15 e 20 minutos.....	160
Tabela 25 – Contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias de cepas de <i>Mycobacterium</i> spp. antes e após a exposição ao Polissorbato 80 0,5% – Lecitina 0,07% e Compostos de Amônio Quaternário 1,2% por 5, 10, 15 e 20 minutos.....	162
Tabela 26 – Contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias de cepas de <i>Mycobacterium</i> spp. antes e após a exposição ao Polissorbato 80 0,5% e Fenol 5% por 5, 10, 15 e 20 minutos.....	164
Tabela 27 – Contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias de cepas de <i>Mycobacterium</i> spp. antes e após a exposição ao Polissorbato 80 0,5% e Iodo 1% por 5, 10, 15 e 20 minutos.....	165
Tabela 28 – Contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias de cepas de <i>Mycobacterium</i> spp. antes e após a exposição ao Soro de Cavalão e Glutaraldeído 2% por 5, 10, 15 e 20 minutos.....	167
Tabela 29 – Contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias de cepas de <i>Mycobacterium</i> spp. antes e após a exposição ao Soro de Cavalão e Ácido Peracético 0,2% por 5, 10, 15 e 20 minutos.....	168
Tabela 30 – Contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias de cepas de <i>Mycobacterium</i> spp. antes e após a exposição ao Soro de Cavalão e Peróxido de Hidrogênio 35% por 5, 10, 15 e 20 minutos.....	169
Tabela 31 – Contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias de cepas de <i>Mycobacterium</i> spp. antes e após a exposição ao Soro de Cavalão e solução alcoólica de Digluconato de Clorexidina 0,5% por 5, 10, 15 e 20 minutos.....	170
Tabela 32 – Contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias de cepas de <i>Mycobacterium</i> spp. antes e após a exposição ao Soro de Cavalão e solução aquosa de Clorexidina 0,2% por 5, 10, 15 e 20 minutos.....	171

Tabela 33 – Contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias de cepas de <i>Mycobacterium</i> spp. antes e após a exposição ao Soro de Cavalo e Compostos de Amônio Quaternário 1,2% por 5, 10, 15 e 20 minutos.....	172
Tabela 34 – Contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias de cepas de <i>Mycobacterium</i> spp. antes e após a exposição ao Soro de Cavalo e lodo 1% por 5, 10, 15 e 20 minutos.....	173
Tabela 35 – Contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias de cepas de <i>Mycobacterium</i> spp. antes e após a exposição ao Soro de Cavalo e Fenol 5% por 5, 10, 15 e 20 minutos.....	174
Tabela 36 – Tempo de Redução Decimal, em minutos, das espécies de micobactérias isoladas de surto e fonte ambiental frente a desinfetantes químicos distintos.....	176
Tabela 37 – Teste Presuntivo de Eficácia Micobactericida frente a espécies de micobactérias isoladas de surto e fonte ambiental.....	181
Tabela 38 – Teste Confirmatório de Eficácia Tuberculocida frente a espécies de micobactérias isoladas de surto e fonte ambiental.....	183
Tabela 39 – Teste de Eficácia Micobactericida frente a biofilmes de espécies de micobactérias isoladas de surto e fonte ambiental.....	188
Tabela 40 – Resultados relativos à Rugosidade média (Ra) em nanômetros (nm) e a Rugosidade pico a pico (Rt) em nm obtidos para as vinte e cinco amostras dos distintos polímeros (cinco não expostos e vinte expostos) para as combinações de parâmetros usadas.....	216
Tabela 41 – Resultados da avaliação semi-quantitativa dos elementos químicos, distribuição atômica em porcentagem (%) e razão entre o elemento oxigênio e o elemento carbono (O/C), para o PVC (SEM JEOL 6460L) exposto aos sistemas RIE e ICP.....	223
Tabela 42 – Resultados da avaliação semi-quantitativa dos elementos químicos, distribuição atômica em porcentagem (%) e razão entre o elemento oxigênio e o elemento carbono (O/C), para o PEAD (SEM JEOL 6460L) exposto aos sistemas RIE e ICP.....	224

Tabela 43 – Resultados da avaliação semi-quantitativa dos elementos químicos, distribuição atômica em porcentagem (%) e razão entre o elemento oxigênio e o elemento carbono (O/C), para o PP (SEM JEOL 6460L) exposto aos sistemas RIE e ICP.....	225
Tabela 44 – Resultados da avaliação semi-quantitativa dos elementos químicos, distribuição atômica em porcentagem (%) e razão entre o elemento oxigênio e o elemento carbono (O/C), para o PUR (SEM JEOL 6460L) exposto aos sistemas RIE e ICP.....	226
Tabela 45 – Resultados da avaliação semi-quantitativa dos elementos químicos, distribuição atômica em porcentagem (%) e razão entre o elemento oxigênio e o elemento carbono (O/C), para o PC (SEM JEOL 6460L) exposto aos sistemas RIE e ICP.....	227
Tabela 46 – Contagem do número de microrganismos sobreviventes (UFC/suporte) antes e após 1 minuto de exposição a plasma RIE (O <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	233

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AFM</b>	<i>Atomic Force Microscopy</i>
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>ATR–FTIR</b>	<i>Attenuated Total Reflectance - Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>
<b>ATV</b>	Associação de tripsina 0,20% e versene 0,02%
<b><i>Bulk</i></b>	Massa interna do polímero
<b>CCUG</b>	<i>Culture Collection, University of Göteborg</i>
<b>CFC</b>	Clorofluorcarbono
<b>CLAE</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<b>CSLM</b>	<i>Confocal Scanning Laser Microscope</i>
<b>NCTC clone 929</b>	Cultura de células de tecido conjuntivo de camundongo
<b>DBD</b>	Descarga de Barreira Dielétrica
<b><i>DC glow discharge</i></b>	Descarga Elétrica Direta
<b>DCA</b>	<i>Dynamic Contact Angle</i>
<b>DLVO</b>	Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek
<b>DOP</b>	<i>Diocil Ftalato</i>
<b>EDS</b>	<i>Energy Dispersive Spectroscopy</i>
<b>EPCs</b>	Equipamentos de Proteção Coletiva
<b>EPIs</b>	Equipamentos de Proteção Individual
<b>EPS</b>	<i>Extracellular Polymeric Substance</i>
<b>EtO, EO, E.O.</b>	óxido de etileno
<b>HCFC</b>	Hidroclorofluorcarbono
<b>PEAD</b>	Polietileno de Alta Densidade

<b>IAL</b>	Instituto Adolfo Lutz
<b>IBAMA</b>	Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
<b>ICP</b>	<i>Inductively Coupled Plasma</i>
<b>ICP-O<sub>2</sub></b>	<i>Inductively Coupled Plasma - O<sub>2</sub></i>
<b>ICP-O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<i>Inductively Coupled Plasma - O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></i>
<b>IR</b>	<i>Infrared</i>
<b>ISO</b>	<i>International Organization for Standardization</i>
<b>IUPAC</b>	<i>Union of Pure and Applied Chemistry</i>
<b>IV</b>	Infravermelho
<b>IZ</b>	Índice de Zona
<b>LDPE</b>	<i>Low Density Polyethylene</i>
<b>MCL</b>	Micobactérias de Crescimento Lento
<b>MCR</b>	Micobactérias de Crescimento Rápido
<b>MEM</b>	<i>Minimum Essential Medium Eagle</i>
<b>MEV</b>	Microscopia Eletrônica de Varredura
<b>MIR</b>	<i>Medium Infrared</i>
<b>NCTC</b>	<i>National Collection of Tissue Cultures</i>
<b>MTT</b>	(3, [4, 5- dimethylthiazole-2, 4]-2-5-diphenyl tetrazolium bromide)
<b>NIR</b>	<i>Near Infrared</i>
<b>NTM</b>	<i>Nontuberculosis Mycobacterium</i>
<b>Overlay</b>	Camada extra de meio de cultura
<b>PAS-FTIR</b>	<i>Photoacoustic Spectroscopy - Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>
<b>PBCO</b>	Programa brasileiro de eliminação da produção e do consumo das substâncias que destroem a camada de ozônio

<b>PC</b>	Policarbonato
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>PET</b>	Poli(tereftalato de etileno)
<b>PLGA</b>	Ácido poliglicólico
<b>PMMA</b>	Poli (metacrilato de metila)
<b>PNC</b>	Plano Nacional de Eliminação do CFC
<b>POM</b>	Polyacetal
<b>PPHMA</b>	Poli(hidroximetilmetacrilato)
<b>PP</b>	Polipropileno
<b>PR</b>	Resina fenólica, backelite <sup>®</sup>
<b>PS</b>	Poliestireno
<b>PTFE</b>	Poli (tetrafluoretileno)
<b>PUR</b>	Poliuretano
<b>PVC</b>	Poli(cloreto de vinila)
<b>RENISS</b>	Rede Nacional de Investigação de Surtos em Serviços de Saúde
<b>RF</b>	Potência de radiofrequência
<b>RIE</b>	<i>Reactive Ion Etching</i>
<b>RIE-O<sub>2</sub></b>	<i>Reactive Ion Etching - O<sub>2</sub></i>
<b>RIE-O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<i>Reactive Ion Etching - O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></i>
<b>RGM</b>	<i>Rapid Grow Mycobacterium</i>
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>Tg</b>	Temperatura de transição vítrea
<b>tg</b>	Tempo de geração
<b>Tm</b>	Temperatura de fusão cristalina

<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colônias
<b>UHMWPE</b>	<i>Ultra High Molecular Weight Polyethylene</i>
<b>USP</b>	<i>United States Pharmacopeia</i>
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>Valor D</b>	Parâmetro de resistência do microrganismo sensor do processo esterilizante
<b>XPS</b>	<i>X-ray Photoelectron Spectroscopy</i>



## LISTA DE SÍMBOLOS

<b>(O)</b>	oxigênio atômico
<b>μL</b>	microlitros
<b>Ar</b>	argônio
<b>CF<sub>4</sub></b>	tetrafluoreto de carbono
<b>cm</b>	centímetro
<b>cm<sup>-1</sup></b>	unidade por centímetro (unidade/cm)
<b>CO<sub>2</sub></b>	dióxido de carbono
<b>g</b>	gramas
<b>h</b>	horas
<b>H<sub>2</sub></b>	hidrogênio
<b>H<sub>2</sub>O</b>	água
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	peróxido de hidrogênio
<b>He</b>	hélio
<b>keV</b>	Kilo elétron volt
<b>kgf/cm<sup>2</sup></b>	Kilogramas força por centímetro quadrado
<b>L</b>	litros
<b>mg/L</b>	miligramas por litro
<b>MHz</b>	Mega hertz
<b>min</b>	minuto
<b>mL</b>	mililitros
<b>mm</b>	milímetro
<b>mTorr</b>	miliTorricelli

<b>N</b>	unidade de força Newton
<b>N<sub>2</sub></b>	nitrogênio
<b>N<sub>2</sub>O</b>	óxido nitroso
<b>O/C</b>	Razão entre os elementos oxigênio e carbono
<b>O°</b>	Radical oxigênio
<b>O<sub>2</sub></b>	oxigênio
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Radical superóxido
<b>°C</b>	graus Celsius
<b>HO°</b>	Radical hidróxido
<b>ppm</b>	partes por milhão
<b>q.s.p.</b>	quantidade suficiente para
<b>Ra</b>	Rugosidade média
<b>rpm</b>	rotações por minuto
<b>Rt</b>	Rugosidade pico a pico
<b>s</b>	segundos
<b>sccm</b>	<i>Standard cubic centimeters per minute</i> (centímetro cúbico padrão por minuto)
<b>SF<sub>6</sub></b>	hexafluoreto de enxofre
<b>SO<sub>2</sub></b>	dióxido de enxofre
<b>Torr</b>	Torricelli
<b>W</b>	Watts

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	31
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	34
2.1 Micobactérias .....	34
2.2 Biofilmes Microbianos .....	46
2.3 Desinfetantes/Esterilizantes Químicos .....	53
2.4 Sistemas de Esterilização Físicos, Químicos e Físico-Químicos .....	63
2.4.1 Sistemas de Esterilização por Plasma .....	67
2.4.1.1 Mecanismos de Ação .....	71
2.5 Materiais Poliméricos .....	75
2.5.1 Espectro de Aplicações .....	80
2.5.2 Obtenção e Características .....	82
2.5.2.1 Poli(cloreto de vinila) – PVC .....	82
2.5.2.2 Polietileno de Alta Densidade – PEAD .....	83
2.5.2.3 Polipropileno – PP .....	84
2.5.2.4 Poliuretano – PUR .....	85
2.5.2.5 Policarbonato – PC .....	87
2.5.3 Aspectos Regulatórios de Produtos para Saúde (Correlatos) .....	88
2.5.4 Biocompatibilidade de Polímeros .....	89
2.6 Análise de Materiais Poliméricos .....	90
2.6.1 Espectroscopia Fotoacústica no Infravermelho com Transformadas de Fourier (PAS-FTIR) .....	90
2.6.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	93
2.6.3 Perfilometria .....	94
2.6.4 Espectroscopia de Energia Dispersiva – <i>Energy Dispersive Spectroscopy</i> (EDS) .....	95
2.6.5 Citotoxicidade “ <i>in vitro</i> ” pelo método de Difusão em Ágar .....	97
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	100
<b>4. JUSTIFICATIVAS</b> .....	101

<b>5. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	103
<b>5.1 MATERIAL</b> .....	103
5.1.1 Obtenção das Suspensões de Esporos de <i>Bacillus atrophaeus</i> (PINTO, 1991; OLIVEIRA, 2000) .....	103
5.1.1.1 Repiques de Manutenção .....	103
5.1.1.2 Obtenção de Esporos .....	103
5.1.1.3 Recolhimento e Lavagem dos Esporos.....	104
5.1.2 Padronização das Suspensões de Esporos .....	105
5.1.3 Cepas de <i>Mycobacterium</i> spp.....	105
5.1.4 Desinfetantes/Esterilizantes Químicos .....	106
5.1.5 Agentes Neutralizantes .....	106
5.1.6 Suportes Poliméricos .....	106
<b>5.2 MÉTODOS</b> .....	108
5.2.1 Armazenamento das Amostras (KREMER et al., 2002) .....	108
5.2.2 Teste de Promoção de Crescimento dos Meios de Cultura .....	108
5.2.2.1 Meio de Cultura Sólido .....	108
5.2.2.1.1 Middlebrook 7H11 (M7H11) .....	108
5.2.2.2 Meios de Cultura Líquidos.....	109
5.2.2.2.1 Middlebrook 7H9 (M7H9) .....	109
5.2.2.2.2 Proskauer–Beck Modificado (AOAC, 1988).....	109
5.2.2.2.3 Meio de Kirchners (AOAC, 1988) .....	110
5.2.3 Padronização do Inóculo Microbiano (AOAC, 1988).....	111
5.2.4 Curva de Crescimento em Suspensão .....	111
5.2.5 Método Quantitativo em Suspensão para Avaliação da Eficácia Micobactericida de Desinfetantes (SUTTON et al., 2002; <i>Environment Protection Agency</i> , 2004; 2006).....	114
5.2.5.1 Avaliação da Toxicidade do Agente Neutralizante.....	114
5.2.5.2 Avaliação da Eficácia do Agente Neutralizante.....	115
5.2.5.3 Teste em Suspensão .....	115
5.2.6 Método Presuntivo para Avaliação da Atividade Micobactericida de Desinfetantes (AOAC, 1988).....	116
5.2.6.1 Avaliação da Toxicidade do Agente Neutralizante .....	116
5.2.6.2 Avaliação da Eficácia do Agente Neutralizante .....	116
5.2.6.3 Preparação dos Cilindros .....	117
5.2.6.4 Teste Presuntivo .....	117

5.2.7 Método Confirmatório para Avaliação da Atividade Tuberculocida de Desinfetantes (AOAC, 1988) .....	118
5.2.7.1 Avaliação da Toxicidade do Agente Neutralizante .....	119
5.2.7.2 Avaliação da Eficácia do Agente Neutralizante .....	119
5.2.7.3 Teste Confirmatório .....	119
5.2.8 Avaliação da Eficácia Micobactericida frente a Biofilmes em Suspensão .....	120
5.2.8.1 Crescimento de Biofilmes em Suspensão .....	121
5.2.8.2 Avaliação da Eficácia Micobactericida .....	121
5.2.9 Sistemas de Esterilização por Plasma .....	122
5.2.9.1 <i>Reactive Ion Etching</i> (RIE) .....	123
5.2.9.2 <i>Inductively Coupled Plasma</i> (ICP) .....	127
5.2.10 Avaliação da Compatibilidade das Amostras dos Polímeros com o Processo Esterilizante por plasma .....	129
5.2.10.1 Espectroscopia Fotoacústica no Infravermelho com Transformadas de Fourier (PAS-FTIR) .....	129
5.2.10.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	130
5.2.10.3 Perfilometria .....	133
5.2.10.4 Microanálise em Sistema <i>Energy Dispersive Spectroscopy</i> (EDS) .....	134
5.2.10.5 Citotoxicidade “ <i>in vitro</i> ” pelo método biológico de Difusão em Ágar .....	135
5.2.9.10.1 Cultura Celular .....	135
5.2.9.10.2 Método de Difusão em Ágar .....	136
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>138</b>
6.1 Teste de Promoção de Crescimento dos Meios de Cultura .....	138
6.2 Avaliação da Eficácia Micobactericida de Desinfetantes (SUTTON, 2002; <i>Environment Protection Agency</i> , 2006) .....	138
6.2.1 Teste de Toxicidade do Agente Neutralizante .....	139
6.2.1.1 Caldo Dey/Engley .....	140
6.2.1.2 Sulfito de Sódio 0,1% .....	142
6.2.1.3 Polissorbato 80 0,5% – Lecitina 0,07% .....	144
6.2.1.4 Polissorbato 80 0,5% .....	146
6.2.1.5 Soro de Cavalo .....	147
6.2.2 Avaliação da Eficácia do Agente Neutralizante .....	149
6.2.2.1 Caldo Dey/Engley .....	150
6.2.2.2 Sulfito de Sódio 0,1% .....	154

6.2.2.3 Polissorbato 80 0,5% – Lecitina 0,07% .....	158
6.2.2.4 Polissorbato 80 0,5% .....	163
6.2.2.5 Soro de Cavalo .....	166
6.2.3 Avaliação da Eficácia Micobactericida – Teste Quantitativo .....	175
6.3 Método Presuntivo para Avaliação da Atividade Micobactericida de Desinfetantes (AOAC, 1988) .....	180
6.3.1 Avaliação da Eficácia Micobactericida .....	180
6.4 Método Confirmatório para Avaliação da Atividade Tuberculocida de Desinfetantes (AOAC, 1988) .....	182
6.4.1 Avaliação da Eficácia Tuberculocida .....	182
6.5 Avaliação da Atividade Micobactericida de Desinfetantes frente a Biofilmes em Suspensão .....	186
6.6 Avaliação da Compatibilidade dos Polímeros com os Processos de Esterilização por Plasma .....	191
6.7 Espectroscopia Fotoacústica no Infravermelho com Transformadas de Fourier (PAS-FTIR) .....	195
6.8 Microscopia Eletrônica de Varredura e Perfilometria .....	209
6.9 Microanálise em Sistema <i>Energy Dispersive Spectroscopy</i> .....	221
6.10 Citotoxicidade “ <i>in vitro</i> ” pelo Método Biológico de Difusão em Ágar .....	229
6.11 Avaliação da Eficácia Esterilizante de Sistema de Plasma modo RIE .....	232
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>235</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>237</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos oito anos, o Brasil tem experimentado mudanças significativas principalmente no que diz respeito à área econômica (sistema financeiro regulamentado; controle da inflação; grandes reservas cambiais; seguimento industrial dinâmico; grande fornecedor de *commodities* como minério de ferro, café e soja; riquezas ambientais, áreas agricultáveis, entre outros). Ademais, os investimentos em infra-estrutura básica e os Planos de Aceleração do Crescimento (PAC), juntamente com a descoberta de novas reservas de petróleo nas camadas do pré-sal (PETROBRÁS), Programas Assistenciais (p.e. Bolsa-Família), a queda dos juros e redução de impostos estimularam o consumo interno e a baixa variabilidade econômica deu suporte ao desenvolvimento do país frente à crise mundial de 2008, o que não foi evidenciado em muitos países. Apesar das dificuldades e esforços em todas as esferas do governo (União, Estados, Distrito Federal e Municípios), as demandas sociais por alimentação, moradia, saúde, trabalho e segurança continuaram a crescer.

Apesar das dificuldades também encontradas, em 2009, com a pandemia de Gripe A (H1N1), é importante observarmos a crescente busca pela inovação e modernização tecnológica, no âmbito das Ciências da Saúde. Este fato muitas das vezes se traduziu no aumento da capacidade competitiva brasileira com a geração de novas tecnologias e recursos humanos altamente capacitados, além da captação de recursos externos.

A pesquisa por tecnologias inovadoras e o aperfeiçoamento de processos que envolvem a promoção da saúde permitiram que alternativas também se constituíssem em reflexo do referido desenvolvimento (RUTALA, 1995; RUTALA 1996). Entretanto, o atendimento às normas vigentes, abrangendo aspectos de *eficácia, qualidade e segurança* de produtos e serviços oferecidos aos consumidores (usuários ou pacientes), são requisitos imprescindíveis.

Neste contexto, podemos destacar a progressiva demanda por procedimentos médicos com a finalidade diagnóstica, terapêutica e/ou reparadora, principalmente, se considerarmos aqueles minimamente invasivos que empregam vídeo em alguma das etapas. Desta forma, relaciona-se a qualidade inerente aos produtos médico-

---

---

hospitalares e aos recursos humanos direcionados para estes fins, onde os processos de esterilização, desinfecção e descontaminação tornam-se fundamentais para a segurança, tanto para o usuário (paciente) quanto para o operador.

Com o aumento do número de procedimentos cirúrgicos (estéticos, reparadores, preventivos e outros), preocupações adicionais têm envolvido o cumprimento estrito a protocolos de desinfecção e esterilização que, além da eficácia microbida, devem preservar as características inerentes de cada item processado. Entretanto, muitos microrganismos apresentam-se altamente capazes de formar e sobreviver em comunidades (sistemas de biofilme), inclusive, em itens de natureza polimérica, sendo esta uma característica não avaliada em testes de eficácia antimicrobiana, se considerarmos aqueles que envolvem agentes de natureza química como os desinfetantes.

Muitos estudos têm relatado o aumento do número de casos de infecções oportunistas causadas por espécies do gênero *Mycobacterium*, principalmente aquelas de crescimento rápido, nos últimos nove anos (BARRETO; CAMPOS; 2000; ANVISA, 2009). Tal fato tem merecido atenção por parte de muitos Governos, Agências Regulatórias, Institutos de Pesquisa e outros órgãos. Ademais, o desenvolvimento de metodologias para identificação e caracterização molecular, resistência a antimicrobianos e a procedimentos de esterilização e protocolos terapêuticos para redução e/ou eliminação do quadro clínico instalado podem se apresentar, em muitas ocasiões, ineficazes devido à variabilidade comportamental demonstrada por algumas espécies desse grupo bacteriano.

Dentre os representantes deste gênero, as “Micobactérias de Crescimento Rápido” (MCR) ou “Micobactérias Não Causadoras de Tuberculose” (*Nontuberculosis Mycobacterium* – NTM) destacam-se como patógenos emergentes com expressivo potencial para causar infecções em pacientes imunodeprimidos e imunocompetentes e formar biofilmes (JEONG et al., 2004).

Estudos que permitam conhecer melhor estas bactérias tanto em relação à interação quanto, principalmente, a sua inativação empregando diferentes agentes antimicrobianos são indispensáveis para a elaboração de protocolos de desinfecção e esterilização, de forma que sejam eliminadas as possibilidades de

---



desenvolvimento de infecções advindas do emprego de itens de natureza polimérica, metálica ou até mesmo veiculados pela água.

Por conseguinte, foi avaliado neste trabalho, o potencial de MCR de reproduzir e sobreviver em sistemas de biofilme e o comportamento destas estruturas frente a agentes químicos de desinfecção e esterilização de artigos médico-hospitalares. Paralelamente, foi realizada a avaliação de sistemas inovadores empregando plasma na eliminação de cepas de MCR aderidas à diferentes superfícies poliméricas, como potenciais substitutos dos processos convencionais de esterilização em baixa temperatura como o gás Óxido de Etileno.

---

---

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Micobactérias

Micobactérias são bacilos aeróbicos pertencentes à família Mycobacteriaceae (Ordem Actinomycetales e Classe Actinomycetes) e caracterizam-se pelo elevado conteúdo lipídico em sua constituição de parede (SAIMAN, 2004). O gênero *Mycobacterium* compreende mais de 150 espécies bem definidas e pode ser dividido em dois grandes grupos quanto à taxa de crescimento, lento e rápido, segundo o tempo de desenvolvimento de colônias em sistemas apropriados (meios de cultura, macrófagos e outros) (NEWPORT, 2003). Em geral, esta divisão é suportada pela análise filogenética do gene 16S rRNA (TORTOLI, 2010).

As espécies dos Complexos *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium leprae* se apresentam como os patógenos mais importantes do gênero devido à extensão de virulência e amplitude de disseminação e constituem o grupo de Micobactérias de Crescimento Lento (MCL). Comumente, as espécies deste grupo demonstram tempo de geração (tg) (tempo necessário para que a população dobre o seu número) de aproximadamente 24 horas, podendo variar de acordo com as mudanças de sinais ambientais (STRAUS; WU, 1980).

O segundo grupo refere-se às Micobactérias de Crescimento Rápido (MCR) que eventualmente podem se apresentar patogênicas. MCR são bactérias ubiqüitárias, podendo apresentar-se como saprófitas, comensais ou simbióticas, sendo equipadas para suportar extremos de temperatura e falta de nutrientes (HALL-STOODLEY; LAPPIN-SCOTT, 1998; DAILLOUX et al., 1999). Adicionalmente, diferenciam-se entre si e entre as espécies do grupo anterior, segundo algumas características: crescimento rápido (tg= 2 a 12 horas), resistência inata a antibióticos e desinfetantes, além da possibilidade de formarem biofilme. Estudos sugerem que estas diferenças podem estar associadas à expressão de glicolipídeos, uma substância da classe dos glicopeptideólípides (GLP) (FREEMAN et al., 2006; YAMAZAKI et al., 2006; SCHOREY; SWEET, 2008).

No contexto da imunossupressão, MCR podem causar severas infecções oportunistas, principalmente após a ampla disseminação da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) e estão associadas a inúmeros surtos em todo o

---

mundo, porém em menor escala se comparadas à amplitude de infecção demonstrada por outras espécies do gênero, por exemplo, *Mycobacterium tuberculosis* (HENRY, 2004; MIGUEZ-BURBANO, 2005; MURCIA et al., 2007).

Diferentemente do Complexo *M. tuberculosis* e *M. leprae*, todas as micobactérias referem-se coletivamente às “Micobactérias não causadoras de tuberculose” (*Nontuberculous Mycobacterium* – NTM), sendo que este grupo foi anteriormente denominado de “micobactérias ambientais” e “micobactérias atípicas”. NTM são comumente isoladas de fontes ambientais como água e solo, compreendendo espécies com característica de crescimento lento ou rápido (Figura 1). Entretanto, algumas NTM, como *M. avium* são patogênicas e podem causar doenças severas e até mesmo a morte.

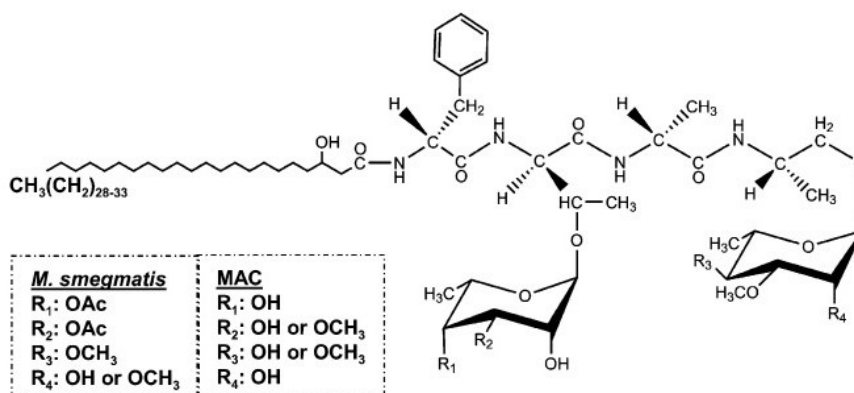


Figura 1 – Glicopeptideolípide não específico do Complexo *M. avium* (MCL) e *M. smegmatis* (MCR) (SCHOREY; SWEET, 2008).

As infecções por MCR podem acometer qualquer tipo de tecido, órgão ou sistema do corpo humano, com maior destaque para a pele. Segundo o Informe Técnico n° 1 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os principais sinais e sintomas apresentados são: febre, hiperemia, hipertermia, edema, vesículas (bolhas), nódulos, fistulações, secreção (serosa – piosanguinolenta) e difícil cicatrização com expectativas de recidiva, após melhorias iniciais (ANVISA, 2007).

Inúmeros estudos científicos têm relatado os casos de infecções causadas por estes microrganismos, como aqueles envolvidos em cirurgias estéticas e cosméticas (SAFRANEK et al., 1987; SOTO et al., 1991; CAMARGO et al., 1996; MURILLO et al., 2000; TRUPIANO et al., 2001; MEYERS et al., 2002; TOY; FRANK,

2003; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2004; FERGUSON et al., 2004; FOX et al., 2004; PRADO et al., 2004; NEWMAN et al., 2005; RAHAV et al., 2006; VIANA-NIERO et al., 2008), laparoscópicas (VIJAYARAGHAVAN et al., 2006; CARDOSO et al., 2007; RAJINI et al., 2007) e oftalmológicas (RAMASWAMY et al., 2000; BUSIN et al., 2003; FREITAS et al., 2003; SAMPAIO et al., 2006b) (Figura 2), na administração parenteral de substâncias (vitaminas, extrato de córtex adrenal e lidocaína) (VILLANUEVA et al., 1997; TORRES et al., 1998; GALIL et al., 1999), terapia medicamentosa (ZHIBANG et al., 2002), diálise (BOLAN et al., 1985), procedimento diagnóstico (NOLAN et al., 1991), em tratamentos por acupuntura (SONG et al., 2006; CASTRO-SILVA et al., 2010), banhos de piscina (DYTOC et al., 2005), água de abastecimento (CONGER et al., 2004; KLINE et al., 2004), exames realizados com endoscópios (CHRONEOU et al., 2008), desinfetantes contaminados (TIWARI et al., 2003), dentre outros procedimentos (CHADHA et al., 1998; ASTAGNEAU et al., 2001).

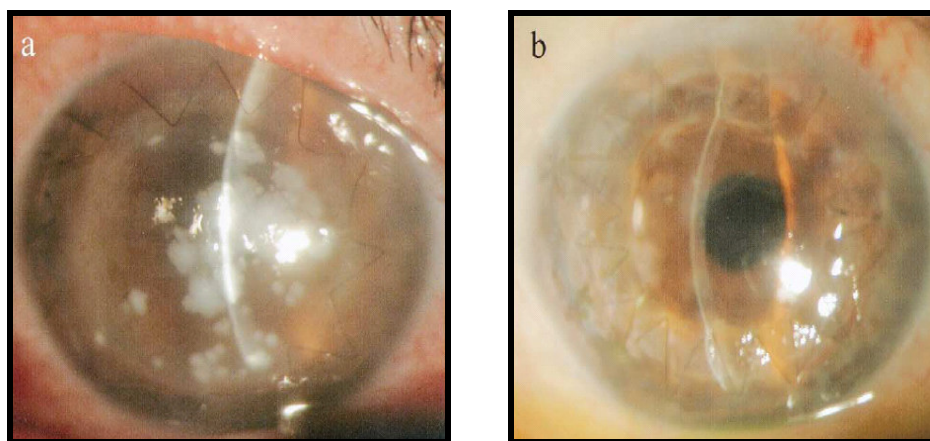


Figura 2 – Infiltrado esbranquiçado da interface córnea na presença de borda intacta, duas semanas após a cirurgia de endoqueratoplastia (a). Paciente modelo, após duas semanas de cirurgia de endoqueratoplastia (b) (BUSIN et al., 2003).

Ao descrever a espécie *Mycobacterium fortuitum*, Cruz (1938) já alertava para o perigo de acometimento de infecções por cepas de crescimento rápido.

Em 2002, outra espécie, *Mycobacterium chelonae*, foi apresentada como a principal causadora de ceratite após cirurgias para correção de miopia (BLANCO et al., 2002; SEABRA et al., 2002). De forma semelhante, Leão e colaboradores (2005)

---

também relataram o risco crescente de infecções em pacientes submetidos a procedimentos médicos invasivos.

A persistência de cepa de *M. fortuitum* em um hospital na cidade de Campinas, entre 18 de outubro de 2002 e 9 de abril de 2004, foi documentada por Sampaio e colaboradores (2006a), sendo que as infecções foram relacionadas a procedimentos para implantação de prótese mamária. Segundo a Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, os dados dos casos suspeitos avaliados indicaram: 14 casos confirmados de infecções causadas por NTM; 1 caso provável de infecção causada por NTM; 14 casos considerados como possíveis, com quadro clínico compatível com infecção relacionada a NTM, porém sem comprovação laboratorial; 6 casos de infecções causadas por outros agentes infecciosos bacterianos; 6 casos de complicações pós-cirúrgicas não infecciosas (SES-SP, 2004). Consequentemente, a interdição e suspensão cautelar da venda do produto Medidor de Implante Mamário foram alcançadas após a emissão da Resolução RE nº 689, em 28 de abril de 2004, abrangendo todo o território nacional.

Um surto de infecções por *M. avium* ocorrido em um centro de produção de carne suína revelou a prevalência de um grupo clonal B (32 das 79 amostras suínas tipificadas), sendo responsáveis por 40,5% das infecções (OLIVEIRA et al., 2003). Isolados pertencentes a este *cluster* apresentaram menor susceptibilidade à ação de desinfetantes químicos (PINHEIRO, 2001) e a adoção de sistemas de desinfecção customizados, baseados nos testes de susceptibilidade realizados, contribuíram para o controle do surto (SILVA et al., 2001).

Entre os anos de 2000 e 2008, dos casos notificados foram confirmadas 2128 infecções causadas por NTM em todos os Estados da Federação, sendo o Rio de Janeiro (1105), Pará (321) e Espírito Santo (293) aqueles que apresentaram os maiores números (Tabela 1) (ANVISA, 2009). Entretanto, apesar da existência de instituição de notificação obrigatória, em agosto de 2008 (BRASÍLIA, 2008), e de *software* para coleta de dados sobre infecções hospitalares no país, dos 700 hospitais apenas 90 abasteciam o sistema. Segundo o gerente-geral de Tecnologias de Serviços de Saúde da ANVISA, Heder Borba, acredita-se que este número foi subestimado e que o total de pacientes infectados tenha ultrapassado o número de 4000 casos (O ESTADO DE SÃO PAULO, 2008).

---

Tabela 1 – Distribuição dos casos notificados de infecções por Micobactérias não-tuberculosas, entre 2000 e 2008, no Brasil (ANVISA, 2009).

Classificação do Caso	Estado	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	Sem Identificação	Total	
Caso Confirmado	AC									1		1	
	AL									3		3	
	AM									1		1	
	BA									1	8	9	
	CE								1			1	
	DF						1	10	3	8	1	23	
	ES					1		4	223	17	48	293	
	GO							2	22	23		23	70
	MA								1				1
	MG					1		4	6	6	20	37	
	MS								8		1		9
	MT							1	9	36		1	47
	PA		3	1	7	247	27			3	7	26	321
	PE										2		2
	PI						9						9
	PR								1	49		14	64
	RJ			1		2	10		548	517	9	18	1105
	RO	1											1
	RS								11	67	9	14	101
	SC										1		1
SE							1	1	2	1		5	
SP										23		23	
TO										1		1	
<b>Caso Total</b>		<b>1</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>7</b>	<b>260</b>	<b>42</b>	<b>618</b>	<b>931</b>	<b>91</b>	<b>173</b>	<b>2128</b>	
Descartado	DF								1			1	
	MS							1				1	
	MT								1			1	
	PA					1						1	
	RJ								3			3	
RS								3			3		
<b>Descartado</b>					<b>1</b>		<b>1</b>	<b>8</b>				<b>10</b>	
Suspeito	MS									1		1	
<b>Suspeito Total</b>										<b>1</b>		<b>1</b>	
<b>Total Geral</b>		<b>1</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>7</b>	<b>261</b>	<b>42</b>	<b>619</b>	<b>939</b>	<b>92</b>	<b>173</b>	<b>2139</b>	

Conforme ilustra a Figura 3, a maior incidência de pacientes infectados por NTM ocorreu em 2007 (931) e, em 2008, houve redução do número de casos de infecção (91) (ANVISA, 2009). Até 27 de fevereiro de 2008, não havia casos notificados.

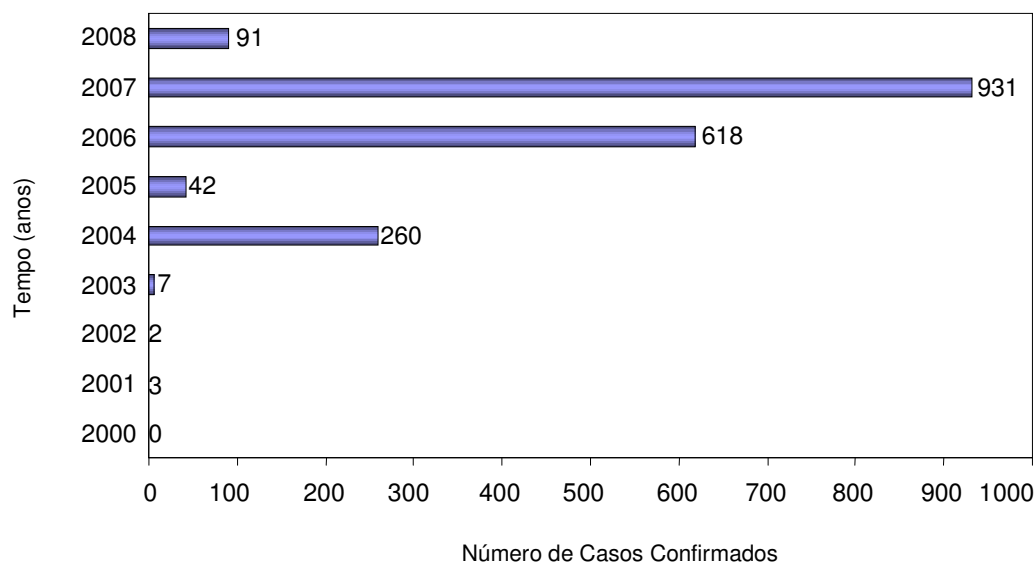


Figura 3 – Casos confirmados de infecção por NTM, no período entre 2000 e 2008 (ANVISA, 2009).

Dos 91 casos, em 2008, as espécies isoladas com maior frequência foram: *M. fortuitum* (10), *M. chelonae* (3), *M. massiliense* (3), *M. abscessus* (2) e *M. massiliense/M. abscessus/M. boletti* (2), sendo o maior número para aquelas onde houve apenas a identificação de gênero (12) (Tabela 2) (ANVISA, 2009). Ademais, o número de casos “Sem Informação”, 55 (2008) e 173 (2000 a 2008), surpreende na medida em que se desenvolvem novos métodos para identificação e medidas para a contenção do surto (SILVA et al., 2001).

Tabela 2 – Distribuição de NTM envolvidos no surto ocorrido no Brasil, em 2008 (ANVISA, 2009).

<b>Classificação</b>	<b>Cultura</b>	<b>Total</b>
<b>Caso</b>	<i>M. abscessus</i>	2
	<i>M. chelonae</i>	3
	<i>M. fortuitum</i>	10
	<i>M. massiliense/abscessus/boletti</i>	2
	<i>M. massiliense</i>	3
	MCR ( <i>Mycobacterium</i> sp.)	12
	Não fez	1
	Negativo	3
	Sem Informação	55
	<b>Total</b>	<b>91</b>
<b>Suspeito</b>	Sem Informação	1
	<b>Total</b>	<b>1</b>
<b>Total</b>		<b>92</b>

Em relação ao tipo de cirurgia (abdominal, estética, oncológica, pélvica, plástica, urológica e outras) e vias de acesso dos materiais cirúrgicos (convencional, vídeo e outras) destacam-se os casos onde as intervenções na região abdominal alcançaram o maior número (31), sendo que 28 pacientes foram acometidos por infecções quando empregado sistema de vídeo. Entretanto, para os 26 casos envolvendo cirurgias plásticas, apenas 01 (um) foi relatado como sendo por vídeo e o maior número em procedimentos denominados convencionais (23) (Tabela 3) (ANVISA, 2009).



Tabela 3 – Distribuição de casos notificados por grupo de procedimento e via de acesso, em 2008 (ANVISA, 2009).

<b>Grupo (Tipo de Cirurgia)</b>	<b>Via de Acesso</b>	<b>Total</b>	<b>Percentual</b>
Abdominal	Convencional	1	1,09
	Sem Informação	2	2,17
	Vídeo	28	30,43
<b>Total</b>		<b>31</b>	<b>33,70</b>
Estética	Injeção	7	7,61
<b>Total</b>		<b>7</b>	<b>7,61</b>
Oncologia	Convencional	1	1,09
<b>Total</b>		<b>1</b>	<b>1,09</b>
Pélvica	Vídeo	1	1,09
<b>Total</b>		<b>1</b>	<b>1,09</b>
Plástica	Convencional	23	25,00
	Sem Informação	2	2,17
	Vídeo + Convencional	1	1,09
<b>Total</b>		<b>26</b>	<b>28,26</b>
Urológica	Vídeo	1	1,09
<b>Total</b>		<b>1</b>	<b>1,09</b>
Sem Informação	Sem Informação	14	15,22
	Vídeo	9	9,78
<b>Total</b>		<b>23</b>	<b>25,00</b>
Outros	Convencional	2	2,17
<b>Total</b>		<b>2</b>	<b>2,17</b>
<b>Total</b>		<b>92</b>	<b>100,00</b>

O aumento da frequência de infecções por *Mycobacterium* spp. em parte se justifica pela facilidade e amplitude de disseminação dessas espécies, principalmente, quando veiculadas pela água (STIENSTRA et al., 2001) e materiais reprocessados (MBITHI et al., 1993; MARTINY, 2001). Adicionalmente, falhas nos procedimentos de assepsia, desinfecção e esterilização de instrumentais e insumos contribuem fortemente para que o fator operacional seja, de fato, epidemiologicamente relevante no acometimento de infecções. Mesmo garantindo a “ausência total” de todas as formas viáveis de vida (esterilidade), justifica-se a realização de controles e processos mais rígidos para a eliminação/inativação de todos os microrganismos e substâncias pirogênicas possivelmente presentes agregando, de fato, qualidade e segurança ao item processado (PINTO et al., 2000).

---

Atreladas a estas questões, somam-se os aspectos de limpeza prévia dos materiais envolvidos, controle de qualidade dos agentes biocidas, existência de critérios rigorosos que acompanham o seu cumprimento junto à Central de Material e Esterilização (CME), não reprocessamento de materiais de uso único (descartáveis), dentre outros (RUTALA, 1996; POSSARI, 2003).

A semelhança entre as espécies deste gênero pode induzir a erros de diagnóstico, inclusive quando são empregadas ferramentas moleculares. Estudos realizados por Adékambi e colaboradores (2004) demonstraram a diferença entre espécies no isolamento, em cultura pura, de cepa de *Mycobacterium* spp. de fluido broncoalveolar e pus de pacientes com pneumonia hemoptoica. Ambos os isolados apresentaram crescimento em tempo inferior a sete dias e temperaturas que variaram entre 24° e 37°C, sendo o crescimento ótimo a 30°C. Além destas características, as cepas isoladas também exibiram sobreposição de perfis bioquímicos e de susceptibilidade aos antimicrobianos compatíveis com cepas do grupo *M. chelonae-M. abscessus* (*M. chelonae*, *M. abscessus* e *M. immunogenum*). A diferença entre os isolados e *M. abscessus* foi observada na atividade de  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -N-acetil-glucosaminidase e  $\beta$ -glucuronidase e pela ausência de atividade na produção de nitrato redutase e indol, bem como sua susceptibilidade a minociclina e doxiciclina.

Os isolados de *M. abscessus*, por sua vez, diferiram de *M. chelonae* e *M. immunogenum* pela exibição de atividade de gelatinase e triptofano desaminase.

Outra diferença em relação a *M. abscessus* foi demonstrada através do sequenciamento parcial de genes *hsp65* e *sodA* (441bp) na quinta e terceira posição, respectivamente. Sequências parciais de genes *rpoB* e *recA* demonstraram 96% e 98% de similaridade com *M. abscessus*, respectivamente. De forma semelhante, a transcrição da sequência de 16S-23S rRNA dos isolados diferiu de *M. abscessus* por uma substituição A→G (adenina → guanina) na posição 60 e a inserção de uma molécula de citosina (C) na posição 102. Características fenotípicas e genotípicas dos dois isolados indicaram a representatividade de uma nova espécie de micobactéria dentro do grupo *M. chelonae-M. abscessus*, sendo que a análise filogenética sugeriu que esses isolados possam ser derivados de *M. abscessus*, ainda não comprovado. Adékambi e colaboradores também propuseram o nome de "*Mycobacterium massiliense*" para esta nova espécie. Segundo os autores, esta

---

cepa está depositada no Instituto Pasteur (França) com a sigla CIP 108297<sup>T</sup> e na Coleção de Culturas da Universidade de Göteborg (CCUG, Suécia), sendo denominada CCUG 48898<sup>T</sup> (Figura 4).

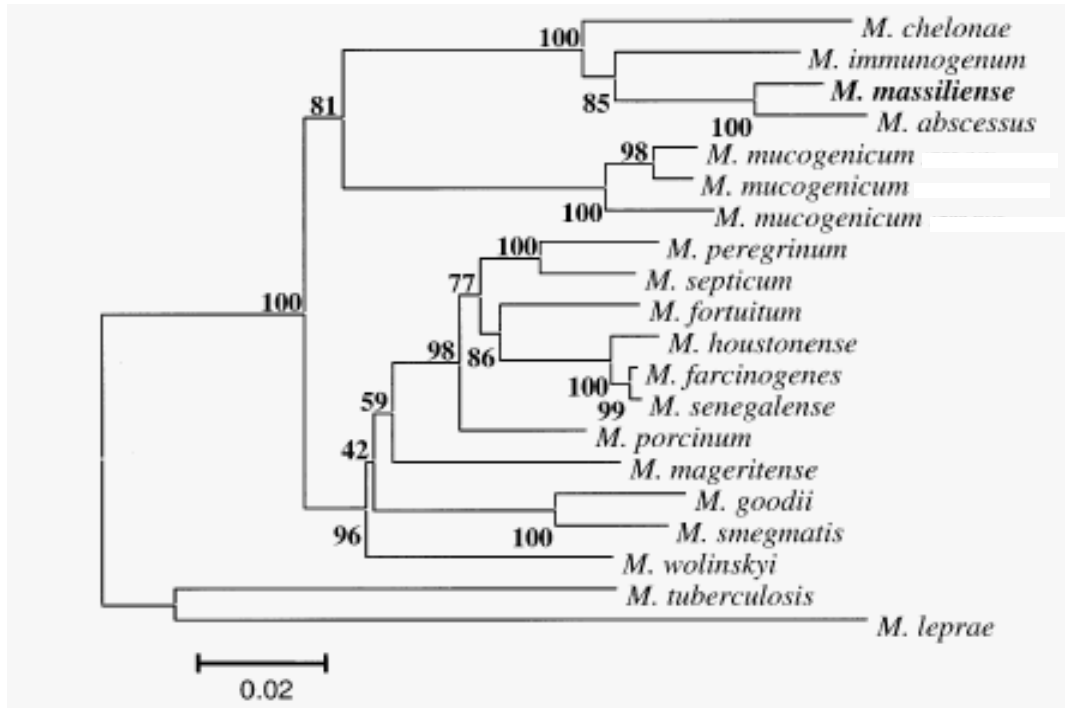


Figura 4 – Árvore filogenética de sequência de genes combinados *rpoB\_recA* de *M. massiliense* e 17 micobactérias de crescimento rápido usando o método *Neighbor-Joining* e modelo evolutivo *Kimura* (correlação com dois parâmetros de distância) (ADÉKAMBI et al., 2004).

Kim e colaboradores (2007) descreveram um surto de infecções causadas por *M. massiliense* associada à injeção intramuscular. Os resultados moleculares para as 12 amostras isoladas também reportaram 100% de semelhança quando realizada sequência de genes *rpoB* (306bp) para *M. massiliense*, sendo que para *M. abscessus*, *M. chelonae* e *M. immunogenum*, as semelhanças foram 97,7%, 97,4% e 97,7%, respectivamente. Em relação à sequência de gene *hsp65* (603bp) a porcentagem de semelhança foi de 100%, 98,8% e 90% para com *M. massiliense*, *M. abscessus* e *M. chelonae*, respectivamente.

Em estudo amplo, Telenti e colaboradores (1993) descreveram a amplificação do fragmento 441bp do gene *hsp65* pelo método de *Polymerase Chain Reaction*

---

(PCR), seguido de restrição do produto amplificado com *BstEII* e *HaeIII*, também conhecido como PCR *restriction enzyme analysis* (PRA). Embora rápido e simples, a variabilidade de interpretações das posições das bandas obtidas podem induzir a erros, sendo influenciadas pela alta sensibilidade e especificidade do método.

Empregando o método citado acima, Cardoso e colaboradores (2007) analisaram 18 amostras de pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos de artroscopia (77,8%) e laparoscopia (22,2%), em sete hospitais particulares da cidade de Goiânia-GO, dos 121 casos diagnosticados de infecções por MCR. Os resultados demonstraram a presença de *M. abscessus* em todas as amostras. Ademais, os resultados do sequenciamento parcial do gene *rpoB* de dois isolados apresentaram 100% de similaridade com aqueles encontrados para o clone de *M. massiliense* responsável pelo surto ocorrido em Belém entre 2004 e 2005 e associado à cirurgias de laparoscopia (VIANA-NIERO et al., 2008).

Outros métodos moleculares como Sondas de Ácido Nucleico, Ribotipagem, Hibridização, Perfil Plasmidial, bioquímicos, fenotípicos (Detecção direta em tecido embebido em parafina, Fluorescência *in situ*), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) etc. também podem auxiliar na identificação desses microrganismos (BROWN-ELLIOTT; WALLACE Jr., 2002).

Embora muito comum em países como a Índia, as infecções primárias por MCR são raras nos Estados Unidos acometendo, principalmente, indivíduos imunocomprometidos, imunodeficientes ou pessoas com alto risco de exposição ocupacional, como os fazendeiros (PARASHAR, 2004; NGUYEN et al., 2009). Entretanto, surtos de infecções associadas a procedimentos percutâneos e laparoscópicos têm merecido atenção nos últimos anos, sendo que o primeiro caso de infecção invasiva por *M. massiliense* nos Estados Unidos foi reportado por Simmon e colaboradores, em 2007. Os autores sugerem que, na maioria dos casos, *M. massiliense* pode ser erroneamente classificada como *M. abscessus*, tendo em vista a semelhança genética que apresentam.

Após extensiva caracterização fenotípica e genotípica de membros do grupo *M. chelonae-abscessus*, Leão e colaboradores (2009) propuseram a união de *M. abscessus*, *M. bolletii* e *M. massiliense* e o reconhecimento de duas espécies. De acordo com as regras do *Bacteriological Code* (Revisão 1990), as espécies foram

---

denominadas *M. abscessus* subsp. *abscessus* e *M. abscessus* subsp. *bolletii* (Leão et al., 2010).

---

## 2.2 Biofilmes Microbianos

Avanços tecnológicos envolvendo o desenvolvimento de lentes ópticas possibilitaram a descoberta e o entendimento, mesmo que preliminar, do mundo microbiano. Desde as primeiras observações microscópicas de materiais biológicos feitas por Anton van Leeuwenhoek (sec. XVII), a Ciência sempre demonstrou maior interesse em estudos envolvendo microrganismos dispersos em suspensão (planctônicos) e/ou em cultura pura (DAVEY; O'TOOLE, 2000). Com o aperfeiçoamento das tecnologias ópticas, grandes descobertas têm sido realizadas no campo da Microbiologia, principalmente, se considerarmos os sistemas comunitários de microrganismos denominados biofilmes (GIÃO et al., 2003; RODRIGUES et al., 2003).

Biofilmes microbianos são definidos como um consórcio de microrganismos associados à superfícies bióticas e abióticas (BARDOUNIOTIS et al., 2003), sendo a formação de matriz polimérica extracelular (*Extracellular Polymeric Substance* – EPS) (Figura 5) característica diferencial no crescimento da comunidade microbiana, em relação às células em crescimento planctônico (cultura pura em meio líquido) (ESTEBAN et al., 2008). Ademais, cada célula pode exibir fenótipo distinto com respeito à transcrição de genes e taxas de crescimento (DONLAN, 2002), em resposta à variedade de sinais ambientais (O'TOOLE et al., 2001).

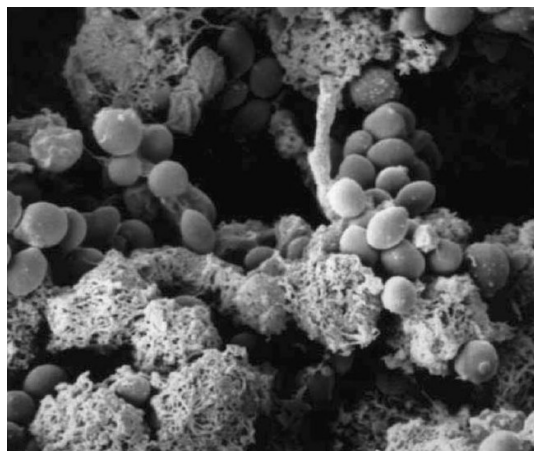


Figura 5 – Biofilme de *Candida albicans* na superfície de um cateter. A matriz do biofilme consiste de fungo, hifas e uma rede extensa de material polimérico extracelular (HAWSER; ISLAM, 2006).

A formação de biofilme confere uma vantagem seletiva para a sobrevivência sobre diversas condições ambientais e para a resistência a agentes antimicrobianos devido a formação de matriz de EPS (MARSOLLIER et al., 2007), facilitando a colonização do hospedeiro pela bactéria (COSTERTON et al., 1999). O processo de adesão microbiana, segundo as forças elétricas (atrativa de *van der Waals* e repulsiva eletrostática) que atuam na interface microrganismo–superfície, é descrita pela teoria DLVO. Proposta em 1948, pelos russos Derjaguin e Landau e pelos holandeses Verwey e Overbeek, a teoria DLVO explica a estabilidade cinética coloidal de partículas orgânicas em meio aquoso empregando as forças descritas anteriormente (RIJNAARTS et al., 1999).

No contexto dos sistemas de biofilmes, a teoria DLVO é talvez a contribuição mais importante para a compreensão dos mecanismos de adesão de bactérias à superfícies. Esta teoria tem sido usada para descrever a interação ( $V_{TOT}$ ) ou “adesão no mínimo secundário” entre a célula microbiana e o substrato, com balanço entre dois fatores aditivos, sendo  $V_A$  resultante das interações de *van der Waals* (geralmente, atrativas) e repulsiva eletrostática ( $V_R$ ), considerando a distância, em nanômetros, entre a célula e o substrato ( $d$ ), uma vez que a adesão total e irreversível (primária) raramente ocorre (Figura 6) (HERMANSSON, 1999).

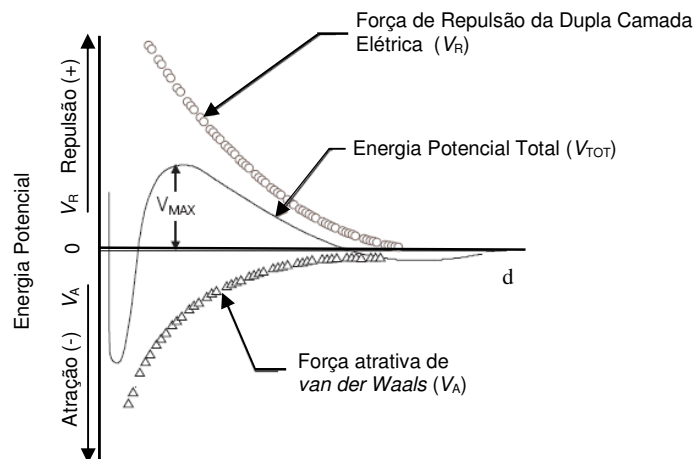


Figura 6 – Energia potencial ( $V$ ) de interação partícula-partícula em função da distância ( $d$ ) de separação entre a célula microbiana e a superfície.

Os sistemas de biofilmes podem ser compostos por uma população derivada de uma única espécie ou por comunidades de múltiplas espécies (heterogênea). A observação direta de inúmeros *habitats* naturais revelou que a maior parte dos microrganismos persiste aderida às superfícies em ecossistemas estruturados como biofilmes e não como organismos livres (COSTERTON et al., 1995). Além disso, a congregação de bactérias na matriz dos biofilmes funciona como um consórcio cooperativo de modo relativamente complexo e coordenado (O'TOOLE et al., 2001) (Figuras 7 e 8).

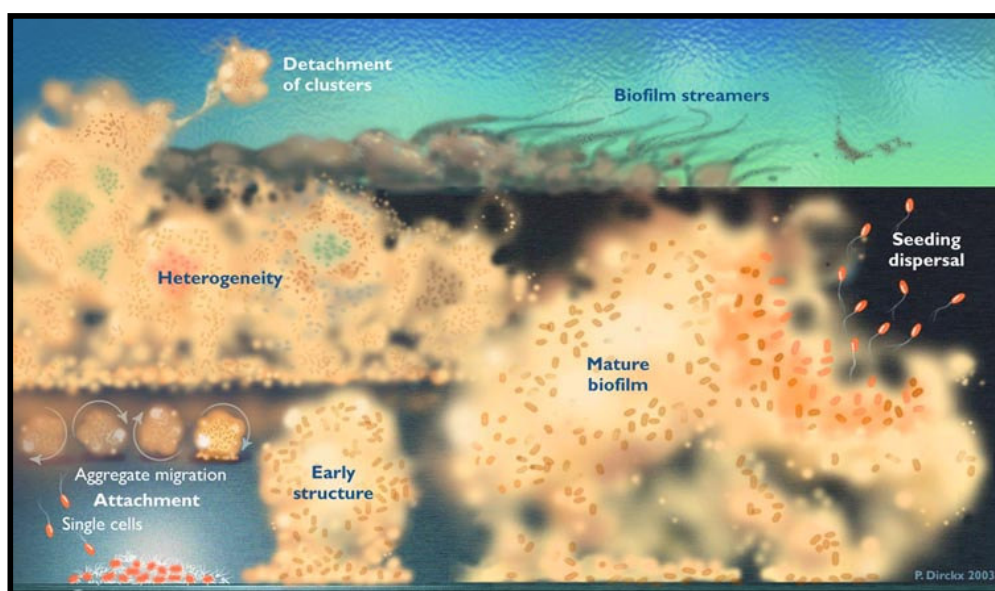


Figura 7 – Estrutura de biofilmes em diferentes fases de desenvolvimento. *Center for Biofilm Engineering at MSU-Bozeman*<sup>®</sup>, 2003.

Acredita-se que este atributo possa resultar em resistência aumentada a desinfetantes, antissépticos, preservativos e outros antimicrobianos convencionais (Figura 8) (STEWART; COSTERTON, 2001). Os mecanismos envolvidos ainda são motivo de especulação, mas algumas hipóteses têm sido aventadas: 1. alterações fenotípicas das bactérias – motilidade (ESTEBAN et al. 2008); 2. inativação dos desinfetantes por polímeros extracelulares ou enzimas modificadoras e 3. limitação de nutrientes, resultando em diminuição da velocidade de crescimento (DAVEY; O'TOOLE, 2000). Estas características, por sua vez, fazem com que os biofilmes sejam difíceis de erradicar quando comparados a organismos em estado planctônico (COSTERTON et al., 1999). Além disso, a formação de biofilmes facilita a



transmissão de microrganismos patogênicos, disseminando-os pela desagregação de partes do biofilme e pela dispersão de bactérias carregadas pela passagem de fluidos (HALL-STOODLEY; STOODLEY, 2005) (Figura 9).

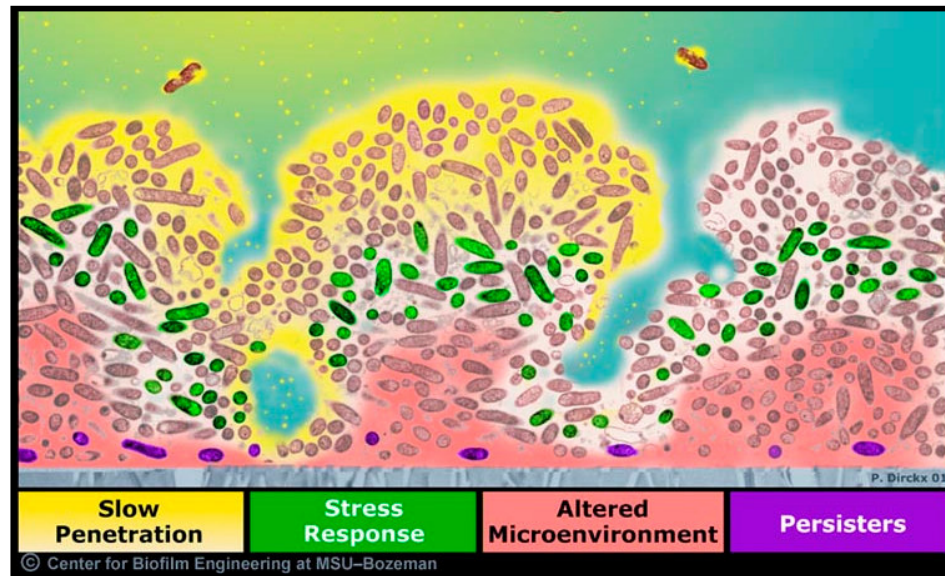


Figura 8 – Mecanismos de tolerância a antimicrobianos dos sistemas de biofilme. *Center for Biofilm Engineering at MSU-Bozeman*<sup>®</sup>, 2003.

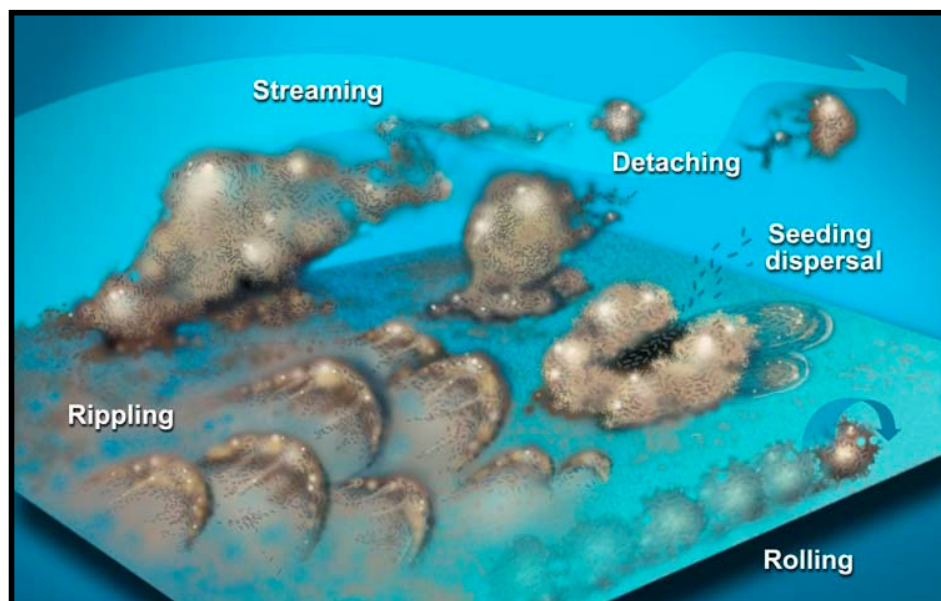


Figura 9 – Formas de dispersão de microrganismos em sistemas de biofilme. *Center for Biofilm Engineering at MSU-Bozeman*<sup>®</sup>, 2003.

Avanços recentes em microscopia e técnicas moleculares têm permitido o estudo destas comunidades “*in situ*” e em detalhe. A aplicação da microscopia Confocal (*Confocal Scanning Laser Microscopes* – CSLM) na pesquisa de biofilmes mudou a percepção da sua estrutura e função. Na Figura 10, podem ser visualizadas as fases de desenvolvimento de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* empregando esta técnica, sendo a maturidade alcançada no oitavo dia de incubação da cultura demonstrando a forma predominante e clássica de um cogumelo. Antes, a observação de biofilmes por microscopia eletrônica trazia a desvantagem da desidratação do material e colapso da estrutura do biofilme no momento de preparo das amostras. Adicionalmente, biofilmes formados por uma única espécie “*in vitro*” apresentam estrutura semelhante à de biofilmes produzidos na natureza por consórcios de várias espécies (COSTERTON et al., 1995). Por outro lado, diferenças na composição da matriz extracelular e tempo de formação de biofilmes por diferentes espécies são evidentes (FEICHTINGER, 1998). Do mesmo modo, pode haver grande variação nas propriedades de biofilmes formados por diferentes cepas da mesma espécie e variações importantes podem ser causadas por diferenças sutis nas condições ambientais (BRANDA et al. 2005).

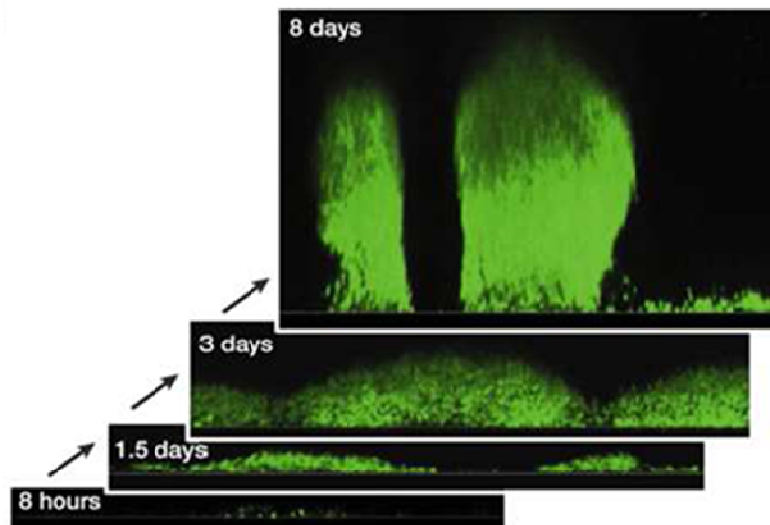


Figura 10 – Microscopia Confocal: Estágios da formação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature Reviews/Molecular Cell Biology*.

---

Em estudos realizados por Marsollier e colaboradores (2007) empregando Eletroforese em Gel (2-D) e Cromatografia Líquida combinada com Espectrometria de Massa foram identificadas 84 proteínas presentes dentro da fração da matriz de biofilmes de *Mycobacterium ulcerans*. Cerca de 70 apresentaram-se envolvidas em processos como: virulência, detoxicação e adaptação (*pgi*-, *pgk*-, *gltA2*- e *glcB*-) (14); metabolismo lipídico (10); respiração e metabolismo intermediário (32) e classe de proteínas hipotéticas (14). Dentre as nove proteínas envolvidas no choque térmico, a *GroEL1 chaperone* está relacionada com a modulação de síntese de ácido micólico durante a formação do biofilme, constituindo um dos fatores responsáveis pela virulência do microrganismo. Além disso, a caracterização dos constituintes da matriz de cepa selvagem de *M. ulcerans* resultou, principalmente, na detecção de: fosfatidilinositol manoses, fosfolípides (fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, cardiolipina), triacilglicerol e fitodilona difitoceranato.

Características envolvendo adesão microbiana podem ser entendidas a partir da natureza das superfícies bióticas (flagelo, pili, glicopolissacarídes, tecidos e outros) e abióticas (rugosidade, potencial elétrico, filme condicionante e outros) e do potencial de interação entre as mesmas.

Esteban e colaboradores (2008) estudaram a motilidade e a habilidade de formação de biofilme de 15 espécies obtidas de coleções internacionais de culturas (ATCC) de MCR (*M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. peregrinum*, *M. mucogenicum*, *M. septicum*, *M. immunogenum*, *M. mageritense*, *M. porcinum*, *M. senegalense*, *M. elephantis*, *M. smegmatis*, *M. goodii*, *M. alvei* e *M. brumae*) empregando diferentes meios de cultura. Todas as cepas com exceção de *M. goodii*, *M. chelonae*, *M. porcinum* e *M. septicum* demonstraram motilidade no sétimo dia de incubação, em meio de cultura Middlebrook 7H9 (Difco). Ademais, todas as espécies formaram biofilmes, sendo a *M. abscessus* a que apresentou crescimento mais rápido (quatro dias). Todas as cepas foram incubadas à temperatura ambiente para simular as condições de sobrevivência no meio ambiente. Portanto, implicações diretas na epidemiologia de doenças infecciosas podem ser aventadas, uma vez que esses microrganismos podem ser encontrados em diferentes ambientes.

Existem evidências de que *M. avium*, *M. chelonae* e *M. fortuitum* formam biofilmes em diferentes condições ambientais (SCHULZE-ROBBECKE et al., 1992; NGUYEN et al., 2009).

---

Várias espécies de MCR já foram associadas a biofilmes em instrumental cirúrgico (COX et al., 1997) e sistemas de água em ambiente hospitalar (KAUPPINEN et al., 1999).

---

---

### 2.3 Desinfetantes/Esterilizantes Químicos

Juntamente com o aumento no debate sobre a seleção de microrganismos resistentes a antibióticos, o uso de agentes químicos de limpeza e esterilização de artigos médico-hospitalares também tem despertado interesse pela comunidade científica. A alegação é feita, a partir da própria eficácia antimicrobiana, considerando o desconhecimento dos mecanismos envolvidos na inativação (MAILLARD, 2007). Entretanto, existe a necessidade de definir o termo “resistência”. No contexto da avaliação da sensibilidade aos antimicrobianos, apresenta-se bem definido e conciso, sendo as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM's) prontamente obtidas. Adicionalmente, as CIM's possuem menor relevância quando são considerados os testes empregando antissépticos, desinfetantes e esterilizantes químicos e os efeitos letais são consideravelmente mais importantes. Neste trabalho, este termo será empregado para denotar uma cepa que é (i) não susceptível à concentração do desinfetante ou (ii) não inativada (ou algumas vezes não exibida) pela concentração que inativa (ou inibe) a maioria das cepas dos microrganismos (RUSSELL, 1998).

De forma contrária aos antibióticos, um mesmo desinfetante químico pode atuar sobre diferentes estruturas da célula microbiana. Entretanto, diferenças na composição da parede microbiana (peptideoglicanos, análogos de peptídeo-glicano, polissacarídeos, proteínas e glicoproteínas) caracterizam similaridades e diferenças de respostas dos microrganismos frente aos agentes antimicrobianos (esterilizantes, desinfetantes, desinfestantes, antissépticos, preservativos e outros), principalmente, quando se apresentam na forma de biofilmes (RUSSELL, 1998) (Figura 11).

---

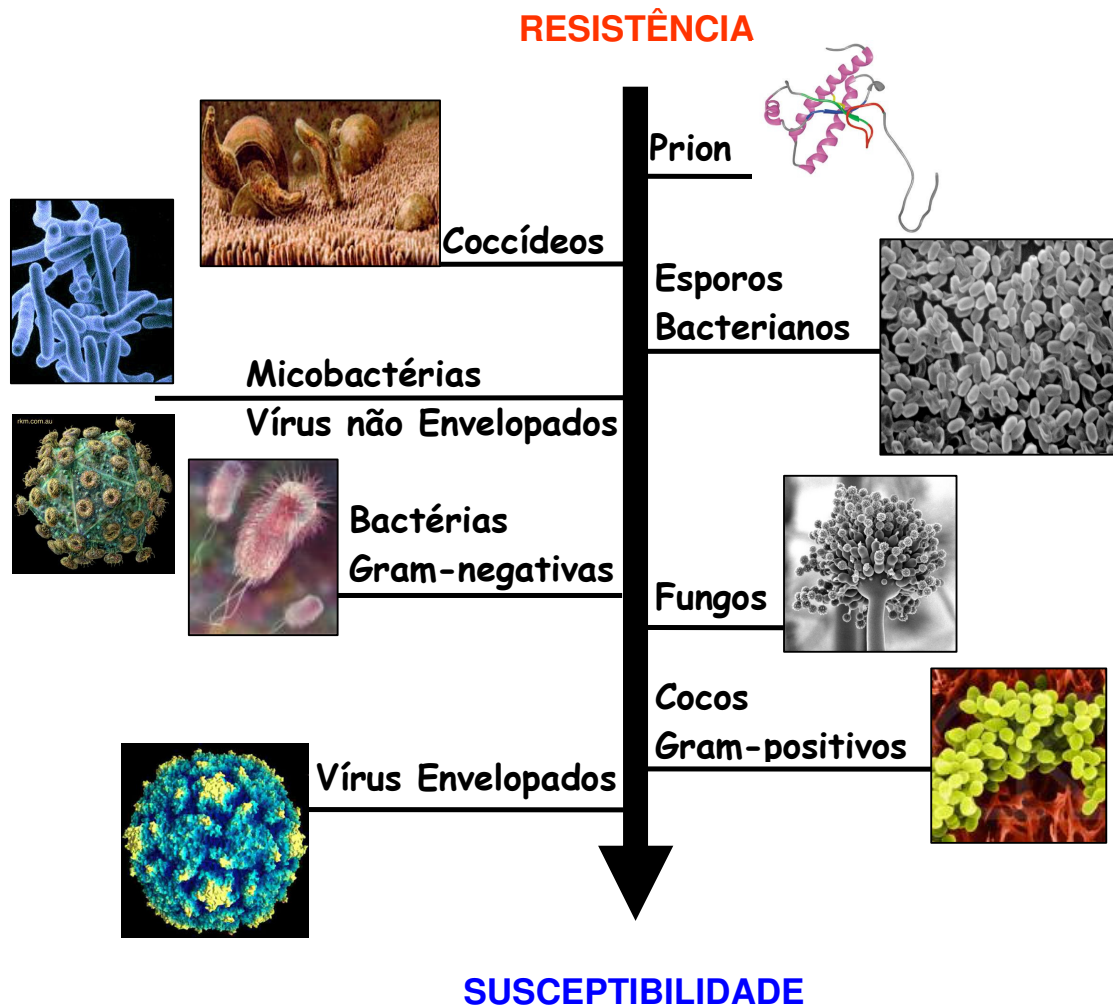


Figura 11 – Susceptibilidade microbiana relativa aos agentes antimicrobianos (RUSSELL, 1998).

**Legenda:** Prion (Proteína priônica) – Disponível em: <http://www.the-scientist.com/article/display/18534/>  
 Coccídeo (*Cryptosporidium parvum*) – Disponível em: <http://www.rkm.com.au/PARASITE/crypto.html>  
 Esporo bacteriano (*Bacillus atrophaeus*) - SILVA et al., 2007  
 Micobactéria (*Mycobacterium tuberculosis*) – Disponível em: <http://www.raw-milk-facts.com/tuberculosis.html>  
 Vírus Não-envelopado (Pólio) – Disponível em: <http://porpax.bio.miami.edu/~cmallery/150/gene/new.virus.htm>  
 Fungo (*Aspergillus niger*) – Disponível em: <http://129.215.156.68/Images/asexual.htm>  
 Bactéria Gram-negativa (*Escherichia coli*) – Disponível em: <http://anthropik.com/wp-content/uploads/e-coli.jpg>  
 Coco Gram-positivo (*Staphylococcus aureus*) – Disponível em: <http://swampie.wordpress.com/2008/02/17/>  
 Vírus envelopado (HIV) – Disponível em: <http://www.rkm.com.au/VIRUS/HIV/HIV-virion-laevo.html>

Para a redução/inativação destas formas microbianas, seja na indústria farmacêutica, de alimentos e cosméticos, de biotecnológicos e biomateriais, clínicas, hospitais etc., diferentes agentes químicos têm sido empregados. Dentre aqueles que apresentam ampla utilização, destacam-se:

– **Aldeídos:** Empregados como desinfetantes e esterilizantes compreendem o formaldeído, glutaraldeído e ortoftaldeído (OPA) (Figura 12). O glutaraldeído é mais comumente empregado na desinfecção de produtos termossensíveis como os endoscópios e lentes. Por outro lado, o formaldeído tem sido empregado como desinfetante/esterilizante de espaços físicos (laboratórios, cabines de segurança biológica, biotérios e instalações de produção), após ocorrência de evento contaminante. OPA encontra-se como alternativa ao glutaraldeído na desinfecção de alto nível. Entretanto, não devem ser empregados quando a esterilização é requerida (WALSH et al., 1999).

Em 1963, o emprego do glutaraldeído como agente antimicrobiano, de fato, tornou-se possível graças aos esforços de Pepper e Lieberman que, em 1962, pesquisaram por um eficiente substituto da formalina (formaldeído) (BLOCK, 1983). Na década de 80, a agência inglesa *Health and Safety Executive* já alertava sobre a exposição a vapores de formaldeído, mesmo a curtos espaços de tempo, cuja inalação presumiria a atribuição de alto risco carcinogênico a humanos (RUSSELL, 1982). Outras desvantagens deste composto como a baixa penetrabilidade e o tempo de contato relativamente grande com diferentes materiais possibilitaram a pesquisa e o advento de novos processos de desinfecção e esterilização (BLOCK, 1983). A eficácia do formaldeído dependente da concentração (mais que 0,3 mg/L<sub>ar</sub>), temperatura (abaixo de 30°C) e suficiente umidade relativa (50-65% UR) durante o período de exposição, em que não deve haver sujidades orgânicas presentes em intensidade.

Os aldeídos apresentam amplo espectro de atividade bactericida, fungicida, virucida e esporicida e são compatíveis com a maioria dos materiais. Entretanto, não são recomendados para uso na forma líquida, em situações de fabricação, e tendem a deixar resíduos que devem ser removidos devido às questões ocupacionais (SUTTON et al., 2007).

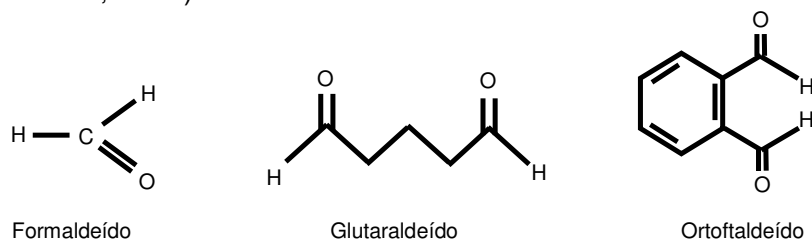


Figura 12 – Principais aldeídos empregados como desinfetantes/esterilizantes.

Obtido através da reação entre acroleína e vinil-etil-eter (Figura 13), o glutaraldeído (1,5-pentanedial) apresenta-se altamente reativo e instável em pH básico por período não superior a 28 dias, independente de sua aplicação. A causa principal desta característica decorre do fenômeno da polimerização, sendo que a perda de grupos aldeídos é pH dependente e extensiva acima de pH 9. (RUSSELL, 1982).

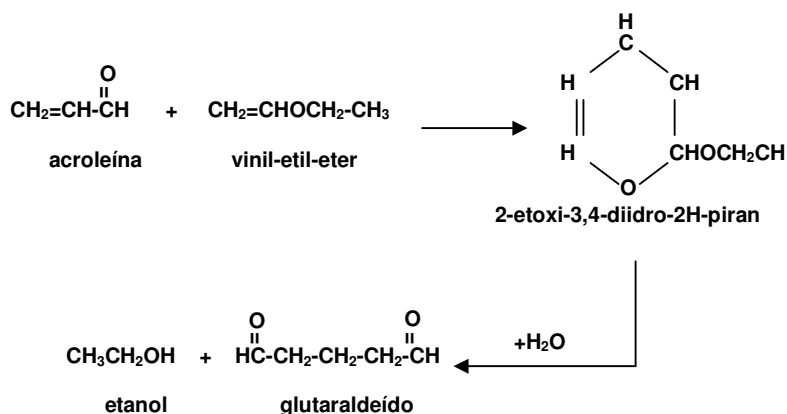


Figura 13 – Síntese para obtenção industrial de glutaraldeído (RUSSELL, 1982).

O glutaraldeído apresenta amplo espectro de atividade contra bactérias e seus esporos, fungos e vírus, sendo que sua principal ação envolve forte associação com as camadas externas das células bacterianas, especificamente, com aminas não protonadas da superfície celular. A atividade esporocida independe do pH de atuação da solução, sendo que formas básicas caracterizam-se pela alta penetração nos esporos, assemelhando-se ao formaldeído, enquanto que, na forma ácida, o glutaraldeído reage e permanece na superfície (RUSSELL, 1998).

Para fins de esterilização e desinfecção, diferentes concentrações de glutaraldeído podem ser encontradas no mercado comercial mundial, podendo variar, em sua constituição, entre 2% quando a solução também apresenta fenol (SPORICIDIN, Sporicidin International) a 3,4% (CIDEX Plus™, Johnson & Johnson). Ademais, os tempos de esterilização e desinfecção também se apresentam como variáveis de processo, sendo preconizados como entre 10-12hs e 20-90 min a 20-25°C, respectivamente.



– **Ácido Peracético:** Constitui-se em uma forte substância oxidante (Figura 14), formada da reação entre ácido acético e peróxido de hidrogênio (Figura 15) (STAMPI et al., 2001). Possui ação bactericida, fungicida, virucida e esporicida. Apresenta odor pungente, o que o torna desagradável e danoso ao ambiente de trabalho, além de reduzida compatibilidade com diferentes materiais devido as suas características oxidantes. Recentemente, produtos que associam peróxido de hidrogênio e ácido peracético têm sido desenvolvidos com melhor perfil para seu emprego com manutenção da eficácia desejada.

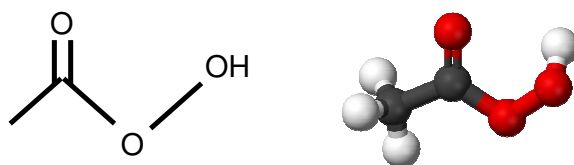


Figura 14 – Estrutura linear e espacial do ácido peracético.

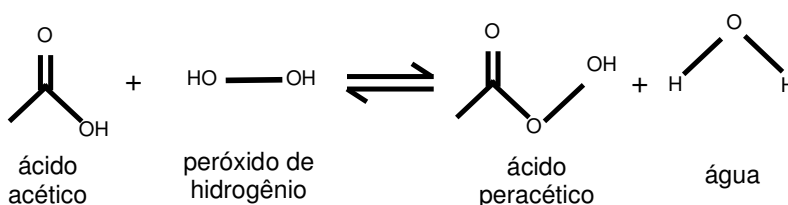


Figura 15 – Rota de obtenção do ácido peracético.

– **Peróxido de Hidrogênio:** Seu emprego tem despertado interesse como desinfetante de superfície rígida, não menos em decorrência de suas propriedades esporicidas que o elevam à classificação de esterilizante (Figura 16). Adicionalmente, apresenta atividade contra fungos, leveduras e vírus (MCDONNELL; RUSSELL, 1999). Considerando que seus produtos de degradação são água e oxigênio, não deixam resíduos tóxicos, além de não ocasionarem problemas de incompatibilidade com materiais. Nos anos recentes, a tecnologia empregando “Peróxido de Hidrogênio em Fase Vapor” (*Vapor Phase Hydrogen Peroxide*) tornou-se sistema popular de esterilização na indústria farmacêutica.



Figura 16 – Estrutura linear e espacial do peróxido de hidrogênio.

– **Biguanida:** Apresentam amplo espectro de atuação sobre os microrganismos pela reação com os grupos carregados negativamente das membranas microbianas, alterando sua permeabilidade (Figura 17). Entretanto, possuem eficácia limitada em relação aos vírus e não são esporicidas, micobactericidas ou fungicidas. Apresentam-se altamente reativos em pH entre 5 e 7, são tóxicos para peixes e não devem ser descartados no ambiente (MCDONNELL; RUSSELL, 1999).

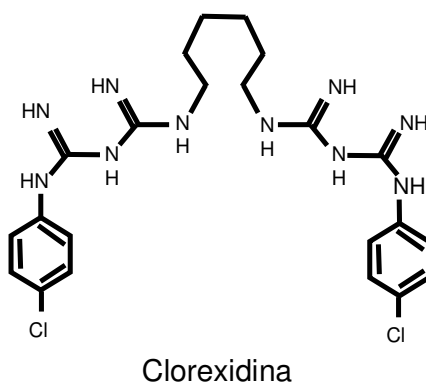


Figura 17 – Estrutura linear da biguanida clorexidina.

– **Compostos de Amônio Quaternário:** São agentes catiônicos empregados em superfície e que apresentam regiões hidrofóbicas em sua estrutura (Figura 18). São mais ativos contra organismos Gram-positivos, mas também contra vários Gram-negativos. Entretanto, há situações em que foram detectadas contaminações por *Pseudomonas spp.* e *Burkholderia cepacia* em formulações contendo compostos de amônio quaternário. A maior limitação na faixa de atividade antimicrobiana é a ausência geral de atividades contra micobactérias, esporos e vírus não lipídicos. Adicionalmente, são comprometidos de forma intensa por sujidade orgânica. No aspecto positivo, eles não afetam uma larga variedade de superfícies de trabalho, de

forma que raramente algo deva ser considerado no processo de seleção (MCDONNELL; RUSSELL, 1999).

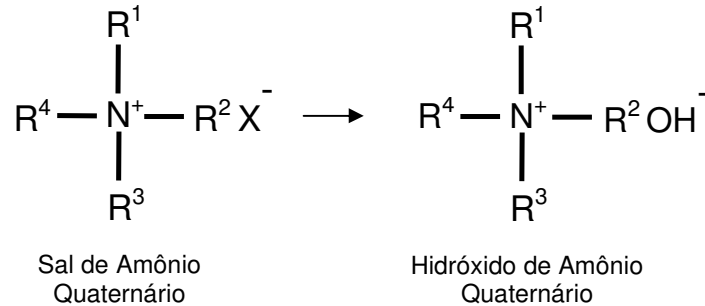


Figura 18 – Exemplos de compostos de amônio quaternário.

– **Iodo:** Compostos contendo iodo apresentam amplo espectro e são considerados efetivos para uma variedade de bactérias, micobactérias, fungos e vírus. O iodo desnatura proteínas e interfere no sistema enzimático dos microrganismos. São frequentemente formulados com sabões e apresentam-se relativamente seguros. Entretanto, compostos que apresentam iodo concentrado podem ser irritantes para a pele e danificam borrachas e alguns metais. Agentes contendo iodo são inativados por compostos de amônio quaternário e matéria orgânica (MCDONNELL; RUSSELL, 1999).

– **Iodóforos:** São complexos contendo iodo que aumentam a solubilidade e prolongam a liberação do iodo (Figura 19). Um dos iodóforos mais comumente empregado é o iodo-povidine. Apresentam-se menos reativo com a matéria orgânica se comparados aos compostos que empregam somente iodo. A diluição dos iodóforos possibilita o aumento da concentração de iodo livre e, conseqüentemente, a atividade antimicrobiana.

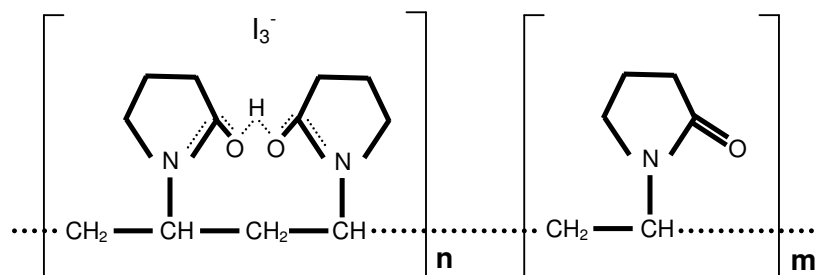


Figura 19 – Estrutura linear de iodóforos.

– **Compostos Fenólicos:** Têm sido usados desde a época do surgimento dos desinfetantes, no século XVII. Embora originalmente obtidos por destilação do carvão de hulha, hoje, são principalmente de origem sintética (Figura 20). Na avaliação da eficácia dos desinfetantes um marco inicial foi o coeficiente fenólico, onde a atividade era comparada ao próprio fenol (AOAC, 1994). O coeficiente fenólico perdeu sua relevância, tendo em vista que formulações modernas, incluindo derivados fenólicos, apresentam coeficiente fenólico de centenas ou mesmo milhares com os mesmos organismos. Estes derivados fenólicos apresentam amplo espectro de atividade contra bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e fungos, o que os torna desinfetantes vantajosos no geral. Apesar de apresentarem ação contra micobactérias, os compostos fenólicos, em geral, não são efetivos contra esporos ou vírus hidrófilos, embora tenham alguma atividade contra formas intermediárias de vírus. Adicionalmente, não demonstram incompatibilidade com materiais, embora alguns apresentem efeitos residuais em determinadas superfícies. Esta propriedade pode merecer considerações quanto aos riscos de resíduos, impactando a qualidade do produto devido à contaminação química (MCDONNELL; RUSSELL, 1999).

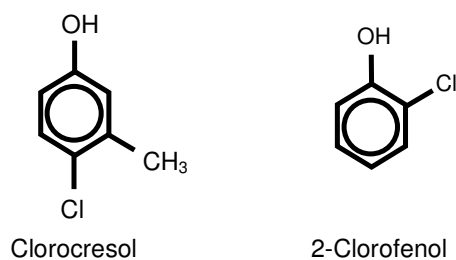


Figura 20 – Exemplos de compostos fenólicos.

---

Micobactérias são sabidamente mais resistentes à ação de desinfetantes e detergentes do que a maioria das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (HERNANDEZ et al., 2005). Entretanto, o mecanismo de ação dos desinfetantes sobre estas é ainda desconhecido, mas provavelmente envolve a atuação sobre a parede de suas células (Tabela 4). O uso destas substâncias em ambientes hospitalares pode tanto eliminar bactérias sensíveis quanto selecionar cepas de micobactérias que permanecerão no meio ambiente por longos períodos com livre acesso a nutrientes e diferentes espaços físicos.

Dentre os principais agentes químicos que apresentam maior atividade na inativação de MCR destacam-se aqueles constituídos de: fenol, ácido peracético, peróxido de hidrogênio, álcoois, glutaraldeído e ortoftaldeído, sendo que este apresenta maior emprego na desinfecção de alto nível de instrumentais cirúrgicos, em ambiente hospitalar. Outros, por sua vez, se destacam pela natureza micobacteriostática de seus agentes como a clorexidina e compostos de amônio quaternário quando empregados em altas concentrações ou de forma conjunta em uma mesma formulação (BROADLEY et al., 1991; GREGORY et al., 1999).

Uma das formas de reduzir a incidência de doenças causadas por processamentos inadequados de materiais médico-hospitalares é assegurar que a eficácia micobactericida de desinfetantes seja alcançada com precisão e padronização dos procedimentos de limpeza, rinsagem, secagem, acondicionamento, esterilização e armazenamento (IDO et al., 1996; GREGORY et al., 1999; GREENWALD, 2007).

A Tabela 4 apresenta os principais mecanismos de ação dos desinfetantes químicos (RUSSELL, 1982).

---

Tabela 4 – Mecanismos de ação de desinfetantes (RUSSELL, 1982).

<b>BIOCIDA</b>	<b>MEMBRANA CELULAR</b>	<b>MEMBRANA CITOPLASMÁTICA</b>	<b>CITOPLASMA</b>	<b>EFEITO</b>
Álcoois		Rompimento da membrana		Desnaturação de Proteínas
Bronopol		Proteínas com grupo Tiol	Proteínas com grupo Tiol	Oxidação de grupos Tiol a dissulfetos, modificando a estrutura das proteínas
Clorexidina		Rompimento da Membrana		Ligação a fosfato de ácidos graxos – rompimento da membrana
Óxido de Etileno		Proteínas com Grupo Tiol	Grupos Amina e Tiol	Alquilação de grupos Amino, Carboxil, Sulfidril e Hidroxila de proteínas, resultando em danos estruturais
Aldeídos	Ligação cruzada	Fixação	Fixação	Alquilação de grupos Amino, Carboxil, Sulfidril e Hidroxila de proteínas, resultando em danos estruturais
Hexaclorofeno		Rompimento da membrana		Lise celular
Peróxido de hidrogênio		Dano oxidativo	Dano oxidativo	Oxidação de grupos Tiol a dissulfetos, modificando a estrutura das proteínas
Hipocloritos, liberadores de cloro	Grupos Tiol e Amino	Grupos Tiol e Amino	Grupos Tiol e Amino	Halogenação de aminoácidos aromáticos
Iodo		Proteínas com grupos Tiol	Grupos Tiol	Modificação da estrutura protéica
Mercuriais	Ativo	Proteínas com grupos Tiol	Grupos Tiol	Ligação a grupos Tiol causando dano estrutural às proteínas
Fenóis		Rompimento da Membrana	Desnaturação de Proteínas	Desnaturação de Proteínas
Compostos de Amônio Quaternário		Rompimento da Membrana		Ligação a fosfato de ácidos graxos – rompimento da membrana

---

## 2.4 Sistemas de Esterilização Físicos, Químicos e Físico-Químicos

Os processos de esterilização têm como objetivo promover a completa eliminação ou destruição de todas as formas de microrganismos presentes em um determinado material, abrangendo vírus, fungos e bactérias, em suas formas vegetativas ou esporuladas, para um nível aceitável de segurança tanto para o paciente quanto para o usuário e operador (PADOVEZE; DEL MONTE, 2003).

Os métodos esterilizantes podem ser divididos em físicos, químicos e físico-químicos. Os processos físicos são, principalmente, o de vapor saturado (autoclaves), calor seco (estufas) e radiação (raios gama). Os métodos químicos são banhos ou lavagens que utilizam glutaraldeído, formaldeído e ácido peracético (RUSSELL et al., 1982; RUTALA, 1995). Os métodos físico-químicos, em geral considerados simplesmente químicos envolvem, principalmente, processos onde se têm as ações de dois dos fatores utilizados nos métodos anteriores, tal como no uso de esterilizador por gás óxido de etileno (EtO, EO ou E.O.) (OLIVEIRA, 2000) e peróxido de hidrogênio (SILVA et al., 2007).

Fatores limitantes dos métodos convencionais consistem, entre outros, nas elevadas temperaturas podendo, por exemplo, degradar os materiais poliméricos utilizados em cateteres e outros itens (MOISAN et al., 2001a). As limitações abrangem materiais empregados em endoscopias e grande diversidade de outros materiais hospitalares, plásticos e elastoméricos, a serem utilizados em vasta gama de técnicas clínicas, terapêuticas e cirúrgicas (HOLY et al., 2001).

Segundo Rutala, um sistema esterilizante considerado ideal deve ser capaz de inativar um inóculo clinicamente relevante, de um organismo altamente resistente, na presença de matéria orgânica e posicionado no mais inacessível local do item a ser processado. Por sua vez, deve contemplar características de: alta eficácia, inclusive em baixas temperaturas; rápida atividade; tempo de processo curto; alta penetrabilidade; compatibilidade; não ser tóxico e não deixar resíduos; atividade na presença de matéria orgânica; capacidade de monitoramento e custo-efetividade (RUTALA, 1996).

O não atendimento a essas características seja de forma parcial ou total impossibilita que um mesmo agente esterilizante seja empregado a um grande

---

---

número de artigos, principalmente, se tratarmos dos termossensíveis, sejam eles farmacêuticos, odontológicos, médico-hospitalares ou outros.

Desta forma, o grande impasse surgido nas últimas décadas, quanto à esterilização de materiais termossensíveis, foi valioso na busca de alternativas. A situação apresentava-se sob controle, a despeito das limitações dos processos de irradiação, sejam aqueles que empregam Cobalto 60 ou Elétron Acelerado. Europa e Estados Unidos divergiam quanto à esterilização – a primeira deslocando-se para o formaldeído, glutaraldeído e vapor em baixa pressão de peróxido de hidrogênio (RUSSELL et al., 1982), enquanto que, o segundo com elevado deslocamento para EtO, em cujo emprego, problemas ocupacionais e ambientais provocaram mudanças positivas (DEN ELZEN et al., 1992; RUTALA et al., 1996). Os controles tornaram-se mais rígidos e o atendimento a questões legais, com regulamentações severas direcionou a pesquisas de substâncias e processos alternativos (BRASIL, 1999; PINTO et al., 2002).

A tecnologia empregada em esterilizações sob baixa temperatura envolvendo radiação gama apresenta alto custo tanto pelo material utilizado, quanto pelos recursos de segurança necessários. Adicionalmente, as grandes intensidades de energia necessárias para a esterilização podem afetar as propriedades de materiais de natureza polimérica, promovendo modificações estruturais que incluem degradação das cadeias poliméricas, formação de radicais livres, ligações cruzadas e duplas ligações, resultando em alterações mecânicas e visuais, bem como reduzindo a vida útil dos mesmos e comprometendo sua funcionalidade (SHINTANI, 1995).

O grande mérito do uso do EtO decorre de sua aplicação abrangente, inclusive com relação a materiais incompatíveis com radiação esterilizante e calor (BURGESS; REICH, 1993; RUSSEL et al., 1996). Aliado às características de elevada difusibilidade e volatilidade que respondem pela eficácia e segurança biológica do processo esterilizante por EtO, a facilidade com que sempre se contornou suas características negativas (inflamabilidade, com a adoção de misturas inertes; toxicidade, com o emprego de equipamentos de proteção individual e coletiva – EPIs e EPCs) tornou este o processo de maior opção, particularmente, dentre os fabricantes de artigos médico-hospitalares (OLIVEIRA, 2000; PINTO et al., 2002; OLIVEIRA; PINTO, 2002).

---



---

O EtO, também denominado de oxirano, epóxi-etano e óxido de dimetileno, é um éter cíclico que se apresenta como um gás incolor à temperatura ambiente e pressão atmosférica. Apresenta fórmula molecular  $C_2H_4O$  com peso molecular de 44,02. Características sensoriais e físicas também podem ser destacadas como: odor desagradável, semelhante ao éter; miscível com acetona, éter, benzeno e a maioria dos solventes orgânicos. Em pH ácido reage formando etilenoglicol e na interação com íons cloro forma a etilenocloridrina, uma substância de toxicidade bastante reconhecida, sendo solúvel em água a 10 °C (SILVA, 2002).

Para metodologias envolvendo EtO, os processos utilizaram inicialmente o gás em sua forma pura, sem misturas. Variações deste método empregaram o gás diluído em clorofluorcarbonos (CFCs), principalmente para reduzir a inflamabilidade e explosividade inerentes a ele diminuindo, portanto, os riscos de sua aplicação (PINTO, 1991; PINTO et al., 2002; OLIVEIRA; PINTO, 2002). Esta prática foi posteriormente modificada devido ao emprego de CFCs que são conhecidamente prejudiciais à camada de ozônio (OLIVEIRA, 2000). Pesquisas envolvendo misturas com hidroclorofluorcarbonos (HCFCs), muito menos agressivos à camada de ozônio quando comparados aos CFCs, evidenciaram que os HCFCs são alternativas promissoras quando se trata da preocupação ambiental envolvendo tais questões (OLIVEIRA; PINTO, 2001; OLIVEIRA; PINTO, 2002).

Com relação às misturas esterilizantes, permanece ainda maior uso para aquela que utiliza proporção de 12% de EtO e 88% de CFC 12 (Clorofluorcarbono 12), sob denominação comercial de Oxyfume 12<sup>®</sup> (PINTO, 1991; OLIVEIRA, 2000; PINTO; OLIVEIRA, 2001; OLIVEIRA; PINTO, 2002), de custo bastante acessível se comparada à mistura que utiliza 10% de EtO, 27% de HCFC 22 e 63% de HCFC 124, denominada comercialmente de Oxyfume 2002<sup>®</sup> (OLIVEIRA, 2000; OLIVEIRA; PINTO, 2001; OLIVEIRA; PINTO, 2002).

Consenso internacional sobre a diminuição drástica do consumo mundial de CFCs resultou, em 1987, no chamado “Acordo de Montreal sobre substâncias que agridem a camada de ozônio” (Protocolo de Montreal), tendo sido assinado por 24 nações e estabelecendo reduções drásticas de consumo (MANZER, 1990). Embora as misturas que utilizam CFCs respondam por cerca de 2 a 5% de todo CFC utilizado domesticamente, foram incluídas no termo deste acordo. A resolução n° 267 de 14 de setembro de 2000 do Conselho Nacional do Meio Ambiente

---

---

(CONAMA) preconizou a retirada total deste ativo do mercado brasileiro até 2007 (três anos antes do prazo estabelecido pelo Protocolo de Montreal), sendo que sua importação iniciou supressão gradativa em 2001 (15%), atingindo 100% de totalidade em 2007. Ao custo de US\$ 26,700.000 (Fundo Multilateral), o Plano Nacional de Eliminação do CFC (PNC) propões eliminar a emissão de CFC em todo o território até 31 de agosto de 2010 (Projeto BRA/02/G76), priorizando o banimento de substâncias como CFC-11, CFC-12, CFC-113, CFC-114, CFC-115 até janeiro de 2010. As importações envolvendo os HCFCs continuarão permitidas, porém sofrendo controle por parte do governo brasileiro através da referida resolução e exigindo cadastramento da empresa importadora e comercializadora no Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) (BRASIL, 2000).

Segundo Oliveira e Pinto (2002), o uso de EtO apresenta aspecto bastante negativo no que diz respeito às propriedades carcinogênicas apresentadas pelos materiais esterilizados por este método, podendo afetar a segurança de pacientes e operadores. Estas propriedades estão diretamente relacionadas aos resíduos do gás, bem como seus subprodutos etilenocloridrina e etilenoglicol, potencialmente presentes no material processado. Assim, prosseguem as pesquisas relacionadas a aspectos de aeração de itens processados e, concomitante redução de níveis residuais, na tentativa de minimizar riscos potenciais (STEELMAN, 1992).

A preocupação inerente ao uso de EtO relativa a aspectos ocupacionais, levou a "*Occupational Safety and Health Administration*" (OSHA) a estabelecer limite de 1 ppm (parte por milhão) para jornada de trabalho de 8 horas, sendo que em 1988 foi acrescentado limite para exposição em curto prazo de 5 ppm (SARTO et al., 1991; SZOPINSKI et al., 1991). Assim, o treinamento de pessoal envolvido, quanto à execução correta de procedimentos de operação e uso de equipamentos de segurança, é fator primordial para redução de riscos de exposição desnecessários.

Também no reprocessamento de materiais médico-hospitalares, aspecto que se constitui em grande preocupação nos hospitais, o EtO tem sido o esterilizante de escolha (PINTO; GRAZIANO, 2000; GREENWALD, 2007). Entretanto, a frequente inexistência de instalações adequadas, seja no próprio hospital ou em empresas que oferecem serviços de terceirização, tem acarretado a busca de alternativas (RUTALA, 1996; RUTALA; WEBER; 1996). Estudos recentes abordando tais

---

---

aspectos de reprocessamento evidenciaram grande preocupação com relação à reutilização desses materiais, uma vez que os dados obtidos mostraram presença de esporos bacterianos e endotoxinas após alguns ciclos de reprocessamento laboratoriais. Ainda, ocorrência de falhas na integridade física dos materiais avaliados, bem como presença de resíduos de material estranho em algumas unidades levou à conclusão de que a reutilização desses materiais fabricados para uso único não deve ser permitida ou praticada ilegalmente, pois tal conduta acarreta em comprometimento da segurança do paciente (SILVA, 2002).

Desafios envolvendo o processo esterilizante por EtO têm sido concentrados no aperfeiçoamento da monitoração direta de parâmetros críticos durante o processo (*real time*) utilizando sensores de concentração gasosa e umidade relativa posicionados no interior das câmaras, os chamados *datalogers* (Patente no. 5788925, Estados Unidos da América) (PAI; ZELL, 1998). Estes, atualmente, têm demonstrado maior precisão, sensibilidade, acuidade, reprodutibilidade, em detrimento de fatores interferentes ao seu desempenho (condensação de vapor saturado de água e etilenoglicol em componentes ópticos) (SMITH, 2001).

#### **2.4.1 Sistemas de Esterilização por Plasma**

Uma das grandes possibilidades na área de esterilização, a mais revolucionária, consiste no emprego do plasma como processo esterilizante (JACOBS, 1994; BACKGROUND, 1996; SILVA et al., 2007). Embora já tenham sido, nos últimos anos, divulgados e, inclusive, comercializados equipamentos atrelados ao emprego do plasma, com ênfase para o Plazlyte™ (AbTox Inc., Mundelein, Illinois) (BRYCE et al., 1997) e Sterrad® (Advanced Sterilization Products, Johnson & Johnson, California) (HERMELIN et al., 1998), há controvérsias a serem esclarecidas.

Plasmas são formados ao submeter um gás a um campo eletromagnético, originando um ambiente de igual número de partículas positivas e negativas e um número diferente de moléculas neutras não-ionizadas (MOISAN et al., 2001a). As entidades altamente reativas formadas apresentam-se como responsáveis diretamente pelo ataque e reação com os sítios nucleofílicos dos microrganismos

---

presentes no processo, seja ao nível da membrana celular ou diretamente sobre o material genético dos mesmos, promovendo sua inativação (MOISAN et al., 2001b).

A expressão *plasma* foi primeiramente utilizada em 1927 por Langmuir que, ao trabalhar com descargas de baixas pressões, agora comuns em tubos fluorescentes e luminosos de néon, observou que nestas descargas a luminosidade conduzida pelo gás espalhava-se pelo sistema de vácuo. Langmuir introduziu a palavra *plasma* para descrever o gás ionizado (MOTT-SMITH, 1971).

O plasma, devido a sua formação, pode estar associado a altas temperaturas, como indicado na Figura 21.

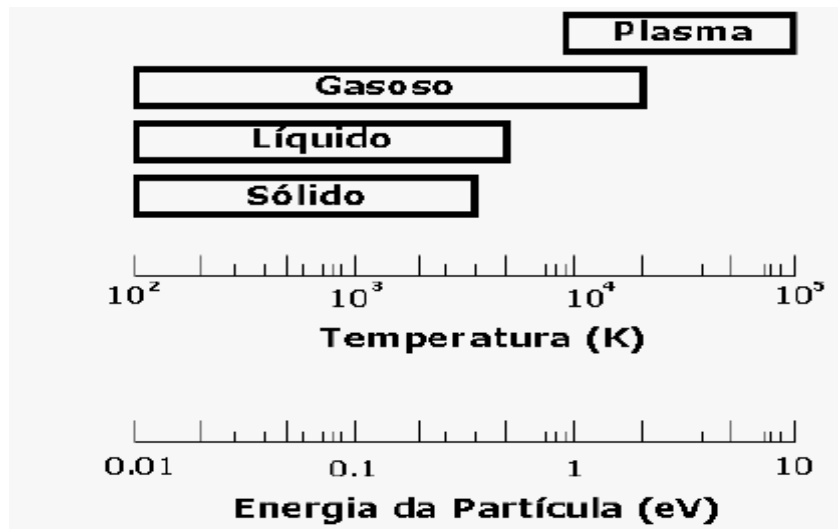


Figura 21 – Estados da matéria, temperatura e energia da partícula (GRILL, 1994).

No plasma, os elétrons podem alcançar temperaturas da ordem de  $10^4$ – $10^5$  °K (1–10 eV), enquanto que a temperatura do gás pode ser comparável à temperatura ambiente (GRILL, 1994). Por esta razão, estes podem ser chamados de plasmas frios. Os processos são responsáveis pela geração e recombinação de partículas carregadas, emissão e absorção de fótons, formação de novas espécies químicas, neutras ou carregadas e, adicionalmente, pela fragmentação de grupos atômicos e reações químicas. A interação entre dois elementos constituintes de um plasma é caracterizada pela grandeza denominada “seção de choque”. A colisão de elétrons

---

livres com outros componentes de um plasma constitui-se no principal mecanismo de produção de íons em descargas gasosas, a qual depende da energia cinética do elétron, adquirida pela ação do campo elétrico (GRILL, 1994).

O uso de técnicas de esterilização por plasma oferece vantagens em relação aos outros métodos utilizados, pois são bastante efetivas quanto à redução da carga microbiana, além de se desenvolverem em baixas temperaturas e não utilizarem gases tóxicos. Consistem em expor os materiais contendo microrganismos a espécies reativas geradas pela ionização de um gás, normalmente oxigênio ou misturas de oxigênio e peróxido de hidrogênio em diferentes concentrações, utilizando-se de campos eletromagnéticos (OHSHIMA et al., 1997; HERMELIN et al., 1998; RUTALA et al., 1998; LEROUGE et al., 2000b; SILVA et al., 2007).

Atualmente, os sistemas de plasma compreendem um considerável campo de pesquisa, sendo amplamente estudados em diversas áreas da Ciência, principalmente, nos setores envolvendo Astrofísica e Engenharia, com ênfase em Microeletrônica e em soluções definitivas para as demandas mundiais de energia através da Fusão Termonuclear Controlada (CHEN, 1994).

Aspectos de engenharia envolvendo esta tecnologia possibilitam o desenvolvimento e aplicação de diferentes formas de obtenção de plasma, tais como: baixa pressão (ELIASSON; KOGELSCHATZ, 1991; SOLOSHENKO et al., 2000), pressão atmosférica (MOREAU et al., 2000; XU et al., 2006), micro-ondas, campo elétrico pulsante (CHAU et al., 1996; GRADI et al., 2000; LEROUGE et al., 2001) e outros.

Uma das principais formas de obtenção de plasma se constitui na aplicação de baixa pressão sobre o gás na câmara, caracterizado no sistema denominado "*Reactive Ion Etching*" (RIE) com acoplamento capacitivo, a partir de gerador de radiofrequência (RF) de 13,56 MHz (MOREIRA et al., 2004). Esta característica, por sua vez, permite que o plasma seja gerado no mesmo ambiente onde se localiza a amostra a ser processada. No âmbito da esterilização, possibilita grande efetividade nos processos através da atuação direta dos mecanismos responsáveis pela inativação dos microrganismos (MOISAN et al., 2001b). Além disso, o sistema também possibilita o ajuste dos parâmetros conforme o item a ser processado,

---

---

aumentando sua aplicabilidade e reduzindo o custo dos processos (MOREIRA et al., 2004).

Outros sistemas possibilitam a formação de plasma de forma indutiva, caracterizado no sistema denominado *Inductively Coupled Plasma*, onde as entidades reativas são geradas em compartimento ou região específica e carregadas até a amostra através da aplicação de vácuo na câmara de esterilização (MOISAN et al., 2001a). Estes sistemas são menos efetivos quanto à redução da carga microbiana, uma vez que as espécies reativas geradas com a quebra do gás possuem meia-vida curta, o que diminui sua influência sobre o material a ser esterilizado (BOSCARIOL et al., 2008).

Muitos estudos envolvendo os sistemas de plasma têm empregado inúmeros microrganismos com propostas que atendam aos requisitos para utilização como indicadores biológicos na validação dos processos (ALFA et al., 1996; LEROUGE et al., 2000b; MOISAN et al., 2001a; PUREVDORJ et al., 2003). Como ainda não há regulamentação para esses sistemas pelos órgãos responsáveis, também não há um microrganismo que seja padronizado para estas pesquisas. Dentre os mais estudados, os esporos de *Bacillus atrophaeus* (*Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372) (FRITZE; PUKALL, 2001; SILVA et al., 2007) têm apresentado maior resistência frente a um grande número de microrganismos, sejam eles: enterobactérias, Gram-positivos e até mesmo dentre outros formadores de esporos como os do gênero *Clostridium*. Uma das grandes características dos esporos do gênero *Bacillus* e em especial a espécie *Bacillus subtilis* que justifica o seu emprego como indicador biológico é a de apresentar uma membrana rica em ácido dipicolínico (ácido 2,6-piridina-dicarboxílico), que constitui cerca de 10% de seu peso seco e lhe confere resistência superior a outros microrganismos aos processos de esterilização por plasma (PAIDHUNGAT et al., 2000).

No âmbito da tecnologia, há que se estudar o efeito da composição do plasma na letalidade dos esporos (LEROUGE et al., 2000a), visto que seus sistemas possibilitam a utilização de inúmeros gases e que nos equipamentos comercialmente disponíveis, o plasma se apresenta apenas como agente complementar de detoxificação do agente ativo principal, seja ele o peróxido de hidrogênio ou o ácido peracético. Estes sistemas, embora eficientes, não são considerados verdadeiros processos esterilizantes por plasma (KUCHMA et al., 1996; KREBS et al., 1998).

---

---

Addy (1989) apresenta premissas associadas ao gás precursor, ao efeito da temperatura e embalagem, influenciando o efeito esterilizante do plasma. Suportes dos esporos microbianos contendo ou não adição de soro e de sais são possíveis fatores de influência (ALFA et al., 1996). A importância da umidade fica entre questões operacionais e de eficácia (PENNA et al., 1999).

#### 2.4.1.1 Mecanismos de Ação

Para os processos empregando esta tecnologia, foram aventadas diferentes hipóteses de mecanismos para a inativação de células microbianas quando empregado gás oxigênio como agente precursor das espécies reativas (Figura 22) (MOISAN et al., 2002), a saber:

1) Destruição direta por radiação UV do material genético. A destruição do DNA do microrganismo por fótons UV é relativamente pequena decorrente da baixa penetração dos fótons sobre os microrganismos e está relacionada ao número de microrganismos, espessura e composição química da parede de revestimento de esporos, por exemplo, e a aspectos de superfícies expostas à radiação UV.

2) Erosão dos átomos por fotodessorção extrínseca de irradiação UV proveniente da quebra de ligações químicas em átomos, em contato intrínseco dos microrganismos, produzindo pequenas moléculas voláteis (p.e. CO e CH<sub>3</sub>).

3) Erosão dos microrganismos, átomo a átomo, também denominada processo *etching* (corrosão) é produzida a partir de espécies reativas, promovendo o processo de oxidação e degradação do biomaterial, transformando-o em produtos voláteis (CO<sub>2</sub>, CO, H<sub>2</sub>O e N<sub>2</sub>). O processo *etching* aumenta a quantidade de fótons UV agindo em sinergismo com as espécies reativas, potencializando a eliminação do microrganismo. A reação química induzida por fótons UV resulta na dessorção de radicais e moléculas na fase intermediária e final da oxidação

---

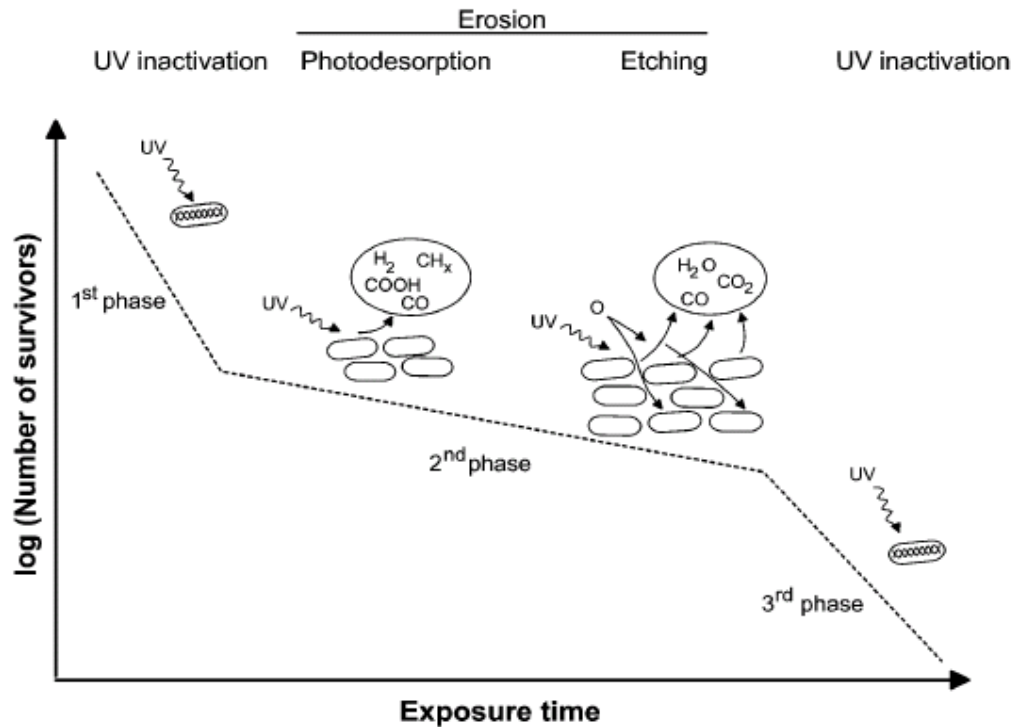


Figura 22 – Mecanismos de inativação de microrganismos por plasma (MOISAN et al., 2002).

A destruição de microrganismos é alcançada devido à elevada energia dos fótons ou íons intensamente acelerados ou por espécies quimicamente ativas como átomos de oxigênio e moléculas de O<sub>2</sub> metaestável. O plasma originado do gás oxigênio produz estes fatores combinados, sendo bastante efetivo devido ao sinergismo entre as espécies reativas (BOL'SHAKOV et al., 2004).

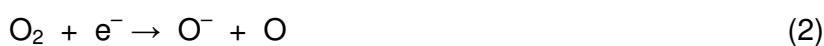
As partículas ionizadas geradas no plasma de gás oxigênio são: O<sup>+</sup><sub>2</sub>, O<sup>+</sup>, O<sup>-</sup>, elétrons (e<sup>-</sup>), molécula neutra de O<sub>2</sub> e átomo de oxigênio neutro (O). (SHIBATA; et al., 1998).

Dentre os mecanismos cinéticos envolvidos destacam-se:

– Ionização de O<sub>2</sub> por impacto de elétron:

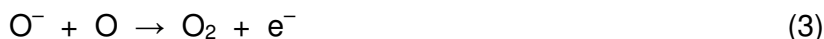


– Eletro-associação ao O<sub>2</sub> (*electron attachment reaction*):





A resultante  $O^- + O$  é alcançada através da reação de separação dos elétrons na geração do volume do plasma como fonte de novos elétrons (*electron detachment reaction*):

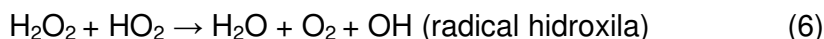


As três principais combinações com  $O_2$ , exemplificadas acima, compõem o complexo sistema de quase neutralidade do plasma, pois a sequência de reações de recombinação/dissociação é controlada por radiofrequência (RF) em plasma de oxigênio. A reação de eletro-dissociação entre  $O$  e  $O^-$  fornecem novos elétrons ao sistema plasma (SHIBATA et al., 1998). O parâmetro RF, em Watts, muda a energia dos elétrons e, por consequência, sua distribuição eletrônica.

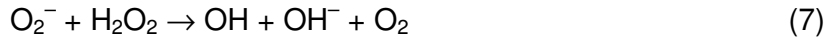
O número de colisões elásticas de elétrons em moléculas de oxigênio metaestável  $O_2$  e oxigênio atômico no estado fundamental aumentam sob baixa pressão de  $10^{-3}$  torr (0,13 Pa) (ELIASSON; KOGELSCHATZ, 1991).

Considerando os processos empregando peróxido de hidrogênio, o impacto da energia de RF decompõe suas moléculas em radicais livres reativos. Parte desta energia é transferida para os íons, elétrons, átomos excitados e moléculas excitadas, os quais interagem com os componentes vitais das células como membranas celulares, enzimas e ácido nucleico (BLOCK, 1983). As espécies reativas originadas na quebra do gás peróxido de hidrogênio apresentam-se como radicais livres de: hidrogênio (H), hidroxila (OH) e hidroperóxido ( $HO_2$ ) (SOLOSHENKO et al., 2002).

Os mecanismos de reação do gás peróxido de hidrogênio são:



Outro mecanismo proposto para o peróxido de hidrogênio na destruição da bactéria está relacionado ao íon superóxido ( $O_2^-$ ), resultando na produção de radical hidroxila (OH), espécie de relevante efetividade na letalidade microbiana.



O radical hidroxila livre é um forte oxidante, altamente reativo e que interage com a membrana lipídica, DNA e outros componentes essenciais da célula. No final do processo, são obtidos como produtos finais apenas água e oxigênio.

É fundamental, portanto, o conhecimento dos mecanismos de geração do plasma (GADRI et al., 2000). Apenas desta forma, a busca do agente esterilizante ideal, de alta eficácia, atividade rápida, alta penetrabilidade e compatibilidade, atóxico e que seja custo-efetivo poderá vir a ser de fato bem sucedida, com respostas acima de tudo pautadas no conhecimento científico (RUTALA et al., 1996).

---

---

## 2.5 Materiais Poliméricos

O nascimento da Ciência dos polímeros decorre do resultado de estudos realizados em grandes laboratórios industriais e o descobrimento dessas substâncias representa uma das grandes contribuições da química para o desenvolvimento industrial do século XX. Polímeros são moléculas de cadeia longa de alto peso molecular, frequentemente medido em centenas de milhares (SPERLING, 2006). Por esta razão, o termo “macromoléculas” é frequentemente usado para se referir aos materiais poliméricos. Estes são formados por longas cadeias de unidades químicas denominadas “*meros*” ligadas por covalência a partir de interações intra e intermoleculares. A quantidade média de *meros* existentes em uma molécula (tamanho médio da cadeia) é representada pelo grau de polimerização (MANO; MENDES, 1999; CANEVAROLO Jr., 2004; SPERLING, 2006).

Na grande maioria dos polímeros industrializados, o peso molecular se encontra entre  $10^4$  e  $10^6$ , sendo que muitos são considerados materiais de engenharia. Em alguns produtos de origem natural, o peso molecular pode atingir valores muito altos como na celulose (300.000 – 500.000) ou superiores. Todos os polímeros apresentam longos segmentos moleculares, de dimensões entre 100 e 100.000 Å, os quais propiciam enlaçamentos e emaranhamentos, alterando o espaço vazio entre as cadeias (volume livre) (MANO; MENDES, 1999; CANEVAROLO Jr., 2004). Com a mudança da temperatura, os movimentos desses segmentos são modificados, alterando a flexibilidade do material (SPERLING, 2006).

Monômeros são micromoléculas ou subunidades dos polímeros que apresentam alta susceptibilidade para reagir e formar polímeros. A composição centesimal do polímero pode ser similar à dos monômeros, ou diferente, na dependência do tipo de reação que promoveu a interligação dos *meros* para formar a cadeia polimérica. Esta reação, por sua vez, é denominada de polimerização, sendo que os mecanismos podem ser classificados em: adição (em cadeia) ou condensação (por etapas) (MANO; MENDES, 1999; CANEVAROLO Jr., 2004; SPERLING, 2006).

---

---

As propriedades especiais de moléculas muito grandes começam a surgir a partir de peso molecular da ordem de 1.000 a 1.500, tornando-se mais evidentes na medida em que ocorre o aumento do peso molecular. (MANO; MENDES, 1999; CANEVAROLO Jr., 2004).

Quanto aos tipos de cadeias os polímeros podem se apresentar sem ramificações, admitindo conformação em zigue-zague (polímeros lineares) ou ramificados com diversos níveis de complexidade. Adicionalmente, ainda podem exibir cadeias com ligações cruzadas formando polímeros reticulados. Como consequências imediatas, surgem propriedades diferenciadas decorrentes de cada tipo de cadeia, especialmente com relação à fusibilidade e solubilidade. A formação de ligações cruzadas promove grande interação entre as cadeias, impedindo seu deslizamento umas sobre as outras, aumentando a resistência mecânica e tornando o polímero insolúvel e infusível (MANO; MENDES, 1999; CANEVAROLO Jr., 2004).

A nomenclatura dos polímeros é prevista segundo as regras do Comitê de Nomenclatura da *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC). O princípio geral para nomear polímeros é a utilização do prefixo “poli”, seguido da Unidade Estrutural Repetitiva (UER) entre parêntesis, por exemplo, poli(tio-1,4-fenileno). Outras classificações tornaram-se comuns ou popularizadas (origem, número de monômeros envolvidos, método de preparação, estrutura química da cadeia, tipo de encadeamento, configuração dos átomos, taticidade da cadeia, fusibilidade e/ou solubilidade, comportamento mecânico), tendo em vista que as normas da IUPAC só foram preconizadas em 1952 (SPERLING, 2006).

Destaca-se também a importância das características moleculares do monômero para que seja possível uma expectativa fundamentada quanto às propriedades e desempenho do material polimérico dele resultante sendo, portanto, necessário o conhecimento da estrutura química dos monômeros, o processo de preparação do polímero e a técnica escolhida para essa preparação. As propriedades serão, então, determinadas pela composição química, constituição, configuração e conformação das moléculas do polímero (MANO; MENDES, 1999; CANEVAROLO Jr., 2004).

Os polímeros podem também existir no estado amorfo ou cristalino, sendo que a grande maioria se apresenta parcialmente nos dois estados. No estado amorfo

---

---

ocorre uma disposição desordenada das moléculas e, no cristalino, uma ordenação tridimensional, ou seja, existe cristalinidade. Na preparação dos polímeros, quando sua massa quente e viscosa é resfriada sem interferências de forças externas ocorre, primeiramente, a formação de cristalitos, em maior ou menor grau, dependendo da estrutura do polímero. Invertendo-se o processo, ao elevar-se progressivamente a temperatura da massa polimérica resfriada, passa-se primeiro por uma transição de pseudo-segunda ordem, chamada de “temperatura de transição vítrea” ( $T_g$ ), a partir da qual as regiões amorfas readquirem progressivamente sua mobilidade. Prosseguindo-se o aquecimento, passa-se para uma transição de primeira ordem denominada “temperatura de fusão cristalina” ( $T_m$ ), acima da qual o polímero estará no estado viscoso e adequado para a moldagem de artefatos (MANO; MENDES, 1999; CANEVAROLO Jr., 2004). Citam-se como processos de transformação de composições moldáveis em artefatos de borracha, plástico e fibras: o vazamento, a fiação por fusão, a compressão, a injeção, a calandragem, a extrusão, o sopro, a termoformação, a fiação seca, a fiação úmida e a imersão (MANO; MENDES, 1999).

Ampliações da faixa de aplicação dos materiais poliméricos tornam-se possível devido à síntese de novos polímeros (com estrutura química diferenciada) e pela modificação de polímeros já existentes. Neste último caso, têm-se os copolímeros, as misturas poliméricas e os compósitos. Os aditivos têm exercido papel fundamental na alteração de importantes propriedades finais dos polímeros originais, onde, através da escolha e dosagem adequadas dos componentes, é possível a obtenção de materiais poliméricos feitos sob medida para aplicações específicas, como os polímeros usados para aplicações médicas ou ainda conferir estabilidade ao material durante o próprio processamento ou esterilização (MANO; MENDES, 1999; RABELLO, 2000).

As alterações poliméricas sejam conformacionais, mecânicas ou funcionais têm merecido atenção, uma vez que podem comprometer direta ou indiretamente o uso de produtos médico-hospitalares (STROBEL et al., 1995; KACZMAREK et al., 2002; AOUTINI, 2003; BORCIA et al., 2004; BORCIA et al., 2004a; SVORCIK et al., 2006; TAJIMA; KOMVOPOULOS, 2006). É fundamental, portanto, que seja estudada a compatibilidade entre os processos envolvendo os sistemas de

---

---

esterilização por plasma e os polímeros de diversas naturezas, pesquisando quaisquer modificações que limitem a utilização destes após seu processamento.

Processos comercialmente disponíveis, como plasma de ácido peracético (Plazlyte™) e peróxido de hidrogênio (Sterrad®) são apresentados pelos fabricantes como compatíveis com ampla variedade de materiais, incluindo os termossensíveis. Entretanto, estudos que, de fato, comprovem a eficácia e eficiência de ambos os métodos, ainda são escassos. Ademais, ambos os sistemas empregam fortes agentes oxidantes. Desta forma, é de suma importância atentar quanto à possibilidade de alterações em materiais diversos como efeito indireto desses processos.

O emprego de processos de plasma como promotor de modificação em materiais são amplamente desenvolvidos no âmbito das Engenharias, particularmente, modificando superfícies sólidas via mecanismo de bombardeamento, erosão e reações de deposição de partículas (filmes finos), bem como na esterilização envolvendo polímeros semicondutores (LEROUGE et al., 2002), litografia de alta resolução, fotopolimerização (deposição de camadas superficiais para fins protetores) e remoção à seco de compostos orgânicos aderidos a superfícies (KACZMAREK et al., 2002).

Peças ortopédicas constituídas de polietileno de altíssima densidade (UHMWPE) foram submetidas aos efeitos do plasma de peróxido de hidrogênio (Sterrad®) e radiação ionizante, comparativamente, tendo sido avaliados danos superficiais (nível de oxidação), bem como alterações nas propriedades mecânicas do material. Foram encontrados níveis de oxidação comparados às amostras controle para o tratamento com plasma. Entretanto, as propriedades mecânicas não foram afetadas de forma significativa quando comparadas ao tratamento com radiação ionizante, o que levou à conclusão de promissora compatibilidade do processo por plasma com este tipo de polímero em particular (GOLDMAN; PRUITT, 1998).

Materiais médicos de fixação interna (pinos) constituídos de polímeros prolactídeos foram submetidos a processos empregando plasma de naturezas distintas (Ar, N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>), sendo avaliadas as características de esterilidade, propriedades mecânicas e estabilidade molecular. Sob as condições testadas, foram

---

---

obtidos resultados insatisfatórios com relação à esterilidade das amostras, não tendo sido observada interferência significativa com relação às propriedades mecânicas, peso molecular, polidispersão, cristalinidade e temperatura de fusão. Entretanto, a Microscopia Eletrônica de Varredura evidenciou formação de rachaduras semelhantes a “teias de aranha” quando o plasma atingiu partículas aderidas ao material, tendo também a superfície se tornado mais lisa comparativamente às peças controle (GOGOLEWSKI et al., 1996).

Em estudo realizado por Lerouge e colaboradores (2002) com biomateriais foram submetidos tubos e filmes de poli(cloreto de vinila) (PVC), cateteres de poliuretano (PUR) e tubos de polietileno de baixa densidade (LDPE) a sucessivos ciclos esterilizantes, empregando os processos Plazlyte™ e Sterrad®, sob condições pré-definidas pelos fabricantes. Modificações substanciais foram observadas em todos os polímeros estudados, tendo sido a intensidade das alterações proporcional ao número de ciclos processados. Espectroscopia Eletrônica de Raios X (XPS), medida de Ângulo de Contato (DCA) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) apontaram, respectivamente, oxidação de superfície, mudanças na característica de molhabilidade e drásticas alterações superficiais em todos os polímeros, sendo esta última mais intensa com relação ao PVC.

Adicionalmente, questão importante se refere ao comportamento diferente apresentado por polímeros idênticos possuindo forma distinta (exemplos: tubos e filmes de PVC) quando submetidos a processos esterilizantes por plasma. Os resultados evidenciaram a importância de se considerar as diferenças relativas ao processo de produção, concentração e natureza dos aditivos usados na formulação do polímero. Estas questões apontam também para o fato de que a composição genérica de um determinado polímero é insuficiente no julgamento sobre a segurança de esterilidade para itens de conformação distinta (LEROUGE et al., 2002).

---

### 2.5.1 Espectro de Aplicações

Desde a II Guerra Mundial tem havido grande expansão da indústria de polímeros e produtos plásticos, adotando-se novos usos e tecnologias para estes materiais em velocidade surpreendente. Rapidamente, os polímeros têm substituído materiais tradicionais como os metais, o vidro e a madeira nos mais diversos campos de aplicação, incluindo indústrias automobilística, alimentícia, eletroeletrônica, construção civil e em produtos especiais, como aqueles destinados a aplicações médicas (RABELLO, 2000).

A Tabela 5 apresenta um histórico da comercialização dos polímeros sintéticos (SPERLING, 2006).

Tabela 5 – Comercialização de materiais poliméricos sintéticos.

Ano	Polímero	Produtor
1909	Poly(phenol-co-formaldehyde)	General Bakelite Corporation
1927	Poly(vinyl chloride)	B.F. Goodrich
1929	Poly(styrene-stat-butadiene)	I.G. Farben
1930	Polystyrene	I.G. Farben/Dow
1936	Poly(methyl methacrylate)	Rohm and Haas
1936	Nylon 66 (Polyamide 66)	DuPont
1936	Neoprene (chloroprene)	DuPont
1939	Polyethylene	ICI
1943	Poly(dimethylsiloxane)	Dow Corning
1954	Poly(ethylene terephthalate)	ICI
1960	Poly( <i>p</i> -phenylene terephthalamide)	DuPont
1982	Polyetherimide	GEC

A utilização dos materiais poliméricos tem alcançado distintas áreas da Saúde como: biomateriais, bioengenharia, engenharia biomédica e de tecidos, biotecnologia, biomecânica, medicina regenerativa e farmacêutica (sistema de liberação controlada de fármacos).



Grande parte dos “materiais de uso em Saúde” são enquadrados pela ANVISA como biomateriais (materiais naturais ou sintéticos, sólidos ou líquidos utilizados em dispositivos médicos ou em contato com sistemas biológicos), sendo: próteses, implantes, lentes de contato, cateteres, tubos de circulação extra-corpórea entre outros. Estes materiais, por sua vez, também podem ser definidos com “parte de um sistema que trata, aumenta ou substitui qualquer tecido, órgão ou função do corpo” (HELMUS; TWEDEN, 1995).

Os biomateriais compreendem um grupo importante dos mais de 300.000 produtos para uso na área da Saúde e aqueles de natureza polimérica apresentam amplo espectro de aplicação (Tabela 6) (ROSATO, 1983). Os requisitos de estabilidade, atoxicidade e ausência de degradação em produtos tóxicos, assim como as questões de adequação em conjunto com a aplicação específica, originaram o emprego do termo biocompatibilidade na área de biomateriais (PINTO; GRAZIANO, 2000; KATZ, 2001).

Tabela 6 – Aplicações clínicas e tipos de polímeros empregados na medicina (RATNER et al., 2004).

<b>Aplicação Clínica</b>	<b>Polímero</b>
Ouvido ou partes do ouvido	Acrílico, polietileno, silicone, PVC
Dentaduras	Acrílico, UHMWPE, epoxy
Prótese facial	Acrílico, PVC, PUR
Tubo traqueal	Acrílico, silicone, nylon
Coração e componentes do coração	Poliéster, silicone, PVC
Marcapasso	Polietileno, acetal
Pulmão, joelho e partes do fígado	Poliéster, polialdeído, PVC
Segmento esofágico	Polietileno, polipropileno, PVC
Válvulas sanguíneas	PVC, poliéster
Suturas biodegradáveis	PUR
Segmento gastrointestinal	Silicones, PVC, nylon
Articulações dos dedos	Silicone, UHMWPE
Ossos e articulações	Acrílico, nylon, silicone, PUR, PP, UHMWPE
Articulações do joelho	Polietileno

**Legenda:** PVC: poli(cloreto de vinila)  
 PUR: poliuretano  
 PP: polipropileno  
 UHMWPE: polietileno de altíssima densidade

---

O progresso nesta área tem crescido desde então, em parte devido à necessidade de atendimento às situações não acomodadas pelo transplante autólogo e, concomitantemente, pelos desenvolvimentos tecnológicos. Adicionalmente, tal situação impulsionou o desenvolvimento de materiais que possuam características funcionais, mecânicas e de biocompatibilidade adequada (PINTO; GRAZIANO, 2000). Portanto, é necessário que tais materiais tenham garantidos seu emprego seguro e eficaz, tendo em vista o papel que devem desempenhar (KATZ, 2001).

## **2.5.2 Obtenção e Características**

### **2.5.2.1 Poli(cloreto de vinila) – PVC**

O poli(cloreto de vinila) é um dos polímeros de menor custo disponíveis para a fabricação de produtos médico-hospitalares. Dentre os itens comercializados se destacam: tubos endotraqueais, tubos de traqueostomia, tubos de diálise, tubos de transfusão de sangue, bolsas de sangue e outros (RATNER et al., 2004).

Com relação às principais características deste polímero termoplástico, citam-se as propriedades mecânicas, elevada resistência à chama e ótima capacidade para receber grandes quantidades de aditivos, podendo ser plastificável em ampla faixa. A poliadição é o principal método de obtenção do polímero (MANO; MENDES, 1999).

Alterações incorporadas na estrutura polimérica, como os aditivos, se refletem em propriedades mecânicas mais adequadas para aplicações específicas (JAYABALAN, 1995; RABELLO, 2000, RATNER et al., 2004). Dentre os mais empregados para PVC estão: estabilizantes, espumantes, anti-estáticos, agentes de expansão, reticulantes, modificadores de impacto, nucleantes, doadores de cargas e, principalmente, lubrificantes e plastificantes como o dioctilftalato (DOP) (RABELLO, 2000). A Figura 23 mostra um desenho esquemático do método de síntese para a obtenção de PVC.

---

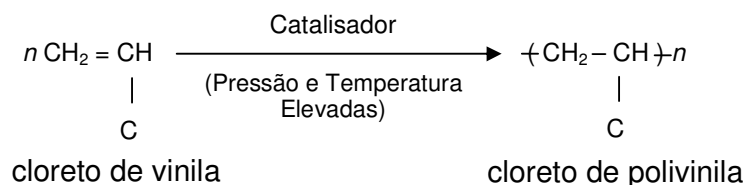


Figura 23 – Desenho esquemático do método de síntese para obtenção de poli(cloreto de vinila).

Estudo envolvendo a exposição do PVC em sistema de plasma de pressão atmosférica gerado por aplicação de RF foi realizado por Kaczmarek e colaboradores. Filmes com 20µm de espessura foram expostos e testados quanto à mudança de superfície envolvendo a característica de molhabilidade (propriedade que um material líquido tem em se espalhar sobre a superfície de um sólido promovendo contato íntimo entre ambos) (KACZMAREK et al., 2002).

### 2.5.2.2 Polietileno de Alta Densidade – PEAD

O Polietileno de Alta Densidade (PEAD) ou *High Density Polyethylene* (HDPE) foi introduzido inicialmente na década de 50 e atualmente é o quarto termoplástico mais vendido e a segunda resina mais reciclada no mundo. Com relação às principais características deste polímero termoplástico, citam-se as moderadas propriedades mecânicas e excelente resistência química (MANO; MENDES, 1999).

Entre os aditivos mais empregados para o PEAD estão: estabilizantes, anti-estáticos, lubrificantes, agentes de expansão, espumantes, pigmentos, nucleantes, doador de cargas e reticulantes. A poliadição é o principal método de obtenção deste polímero (RABELLO, 2000). A Figura 24 mostra um desenho esquemático do método de síntese para a obtenção de PEAD.

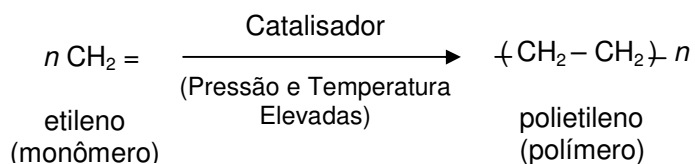


Figura 24 – Desenho esquemático do método de síntese para obtenção de polietileno de alta densidade.

Pesquisa envolvendo a exposição de *pellets* de PEAD em sistema de plasma ICP foi realizada por Tajima e Komvopoulos, a fim de elucidar o grau de modificação topográfico das superfícies expostas, bem como a mudança na propriedade de molhabilidade do polímero (TAJIMA; KOMVOPOULOS, 2006). Borcia e colaboradores (2004) trabalharam com exposição de filmes de PEAD sob plasma de pressão atmosférica de barreira dielétrica, com o objetivo de estudar a extensão da modificação das camadas superficiais envolvendo a rugosidade, molhabilidade e adesividade do polímero. Seguindo esta mesma tendência, trabalho de Svorcik e colaboradores (2006) submeteram folhas de PEAD de 40 $\mu$ m de espessura sob plasma de gás argônio, tendo verificado aumento significativo na rugosidade superficial do polímero.

### 2.5.2.3 Polipropileno – PP

Com a utilização comercial da polimerização coordenada, em 1957, este polímero tornou-se por décadas um dos principais plásticos comercializados, alcançando a cifra de 4.0 bilhões de libras, a US\$ 0.40 por libra, em 1982 (BILLMEYER Jr., 1984).

Entre as propriedades que caracterizam este polímero termoplástico, destacam-se: elevada cristalinidade, moderadas propriedades mecânicas, excelente resistência química (MANO; MENDES, 1999) e quanto à taticidade (forma de distribuição de grupamentos químicos ao longo de uma cadeia) podem se apresentar como isotáticos, sindiotático ou atático (BILLMEYER Jr., 1984). Os aditivos mais comumente empregados para o PP são: reticulantes, nucleantes, anti-estáticos,

espumantes e modificadores de impacto, sendo a poliadiação o principal método de obtenção do polímero (RABELLO, 2000). A Figura 25 mostra um desenho esquemático do método de síntese para obtenção de PP.

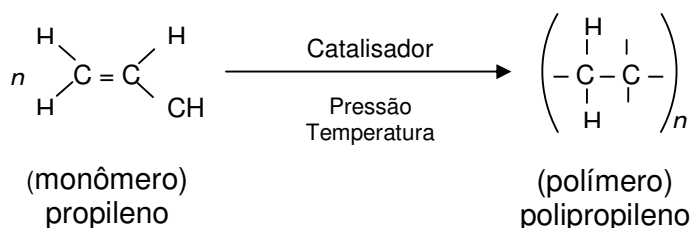


Figura 25 – Desenho esquemático do método de síntese para obtenção de polipropileno.

Filmes de PP de 100µm de espessura foram expostos sob plasma de CO<sub>2</sub> gerado em potência de micro-ondas sob distintas condições de parâmetros de processo. A intenção foi estudar a extensão da modificação topográfica superficial e a alteração na sua rugosidade e energia de superfície (AOUTINI et al., 2003). Outros sistemas de plasma também foram usados para avaliar a extensão da modificação superficial em filmes de PP de 40µm, tendo sido usados plasma com sistema corona, sistema de chama e plasma remoto gerado por potência de micro-ondas (STROBEL et al., 1995). Em ambas as pesquisas foram verificadas modificações importantes através do uso adequado de métodos de caracterização de superfície.

#### 2.5.2.4 Poliuretano – PUR

Elastômeros de poliuretano são produzidos através de diferentes etapas, sendo formados quando um álcool (diol) reage com um isocianato. Também pode ser chamado de carbamato porque, formalmente, este é um éster de um álcool (ROH) e um ácido carbâmico (R'NHCO<sub>2</sub>H) (BILLMEYER Jr., 1984).

Com relação às principais características deste polímero termoplástico ou termorrígido, podem ser citadas a alta resistência à abrasão, a óleos e solventes e ao rasgamento, bem como sua versatilidade (na dependência dos monômeros e do catalizador) (BILLMEYER Jr., 1984; MANO; MENDES, 1999). Entre os aditivos mais

empregados para o PUR estão agentes de expansão, pigmentos, e espumantes. A policondensação é o principal método de obtenção deste polímero (RABELLO, 2000). A Figura 26 mostra um desenho esquemático do método de síntese para a obtenção de PUR.

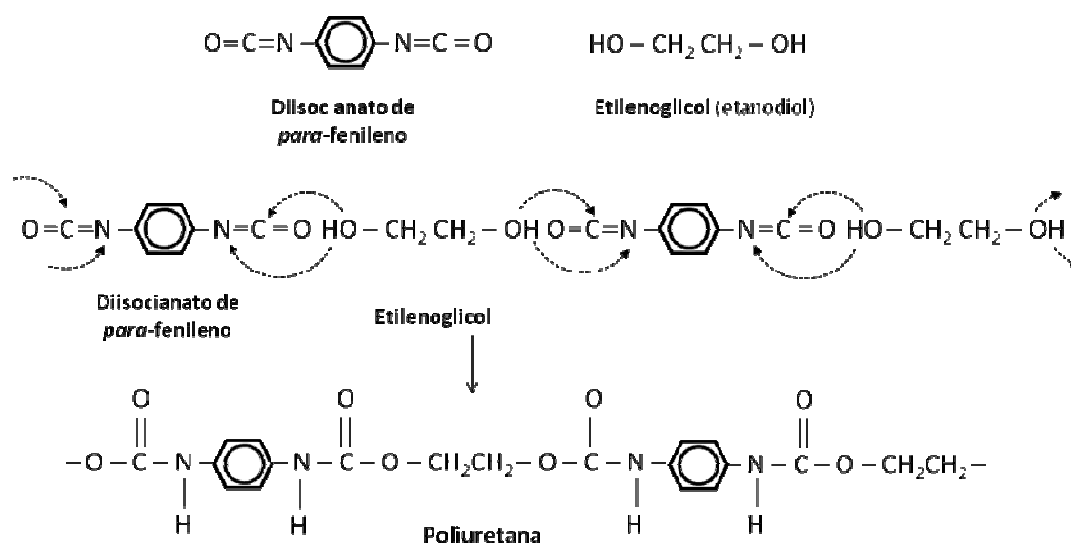


Figura 26 – Desenho esquemático do método de síntese para obtenção de poliuretano.

Amostras de poliuretanos biodegradáveis contendo segmentos hidrofílicos poli(óxido de etileno) e hidrofóbicos poli(caprolactona) foram expostos em sistemas de plasma usando  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\text{CO}_2$ , e  $\text{NH}_3$ . Para caracterização das superfícies expostas, dentre outras técnicas foi usada a Perfilometria, que evidenciou aumento na Rugosidade média ( $R_a$ ) para a exposição ao  $\text{H}_2\text{O}_2$ , bem como diminuição, variando conforme o tipo de gás utilizado. Para alguns casos, o valor chegou a ser 200% maior do que a rugosidade inicial comparativamente aos polímeros não expostos. Entretanto, os motivos para tal variação foram duvidosos, levando os autores a sugerirem estudos adicionais (GORNA; GOGOLEWSKI, 2003).

### 2.5.2.5 Policarbonato – PC

Este polímero termoplástico, também conhecido como poli(bisfenol carbonato A), apresenta como principais características a excelente propriedade mecânica, alta resistência ao impacto, estabilidade dimensional, resistência às intempéries e à chama (MANO; MENDES, 1999). Entre os aditivos mais empregados para o PC estão os nucleantes, sendo a poliadição o principal método de obtenção do polímero (RABELLO, 2000). A Figura 27 mostra um desenho esquemático de PC em uma de suas denominações comerciais, o Lexan<sup>®</sup> (General Electric).

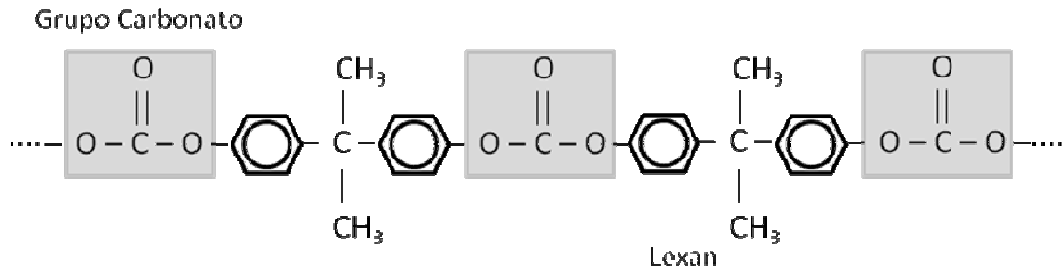


Figura 27 – Desenho esquemático de policarbonato em uma de suas denominações comerciais, o Lexan<sup>®</sup>.

Borcia e colaboradores (2004a) trabalharam com exposição de filmes de PC sob plasma de pressão atmosférica de barreira dielétrica a fim de estudar a extensão da modificação das camadas superficiais envolvendo a rugosidade e a energia de superfície do polímero. Foram evidenciadas modificações superficiais variáveis na dependência dos parâmetros adotados.

### 2.5.3 Aspectos Regulatórios de Produtos para Saúde (Correlatos)

Os fabricantes de diferentes materiais poliméricos, com distintas formulações e aditivos, diversificam especificações e descrições responsáveis pelo desempenho e estabilidade dos termoplásticos usados na fabricação de produtos médico-hospitalares. Entre os polímeros mais frequentemente utilizados na manufatura destes itens estão: PVC, PC, PP, PUR, PE, PS e poliéster (JAYABALAN, 1995).

Na manufatura de produtos médico-hospitalares são descritos os requisitos básicos com relação às condições de Boas Práticas de Fabricação para estes itens. Considerando a diversidade de produtos, têm-se a classificação de riscos em três categorias distintas: Classe 1 (Baixo), Classe 2 (Médio) e Classe 3 (Alto).

A primeira classe se refere aos produtos médicos que, por dispensarem o emprego de procedimentos, técnicas especiais de produção e cuidados ou precauções em seu uso ou aplicação, representam baixo risco intrínseco à saúde de seus usuários, seja paciente ou operador (ex.: gaze não estéril). A segunda categoria dispõe sobre produtos médicos que necessitam de cuidados ou precauções em seu uso ou aplicação (ex.: todos os equipamentos de apoio médico-hospitalar utilizados para esterilização de outros produtos médicos). Por fim, a terceira se refere aos produtos que por necessitarem de técnicas e cuidados especiais de produção, bem como precauções em seu uso e aplicação, representam alto risco intrínseco à saúde de seus usuários (ex.: todos os produtos invasivos em longo prazo e artigos implantáveis) (BRASIL, 1994).

Somente empresas nacionais, fabricantes ou importadoras podem registrar produtos para a saúde na ANVISA. É necessária que a documentação contemple o atendimento a alguns requisitos por parte do fabricante, como a descrição detalhada do produto, conteúdo, composição, indicação e finalidade de uso, precauções, restrições, advertências, cuidados especiais, condições de armazenamento e transporte, descrição detalhada das etapas de processamento até obtenção do produto acabado e descrição de eficácia e segurança do produto (BRASIL, 2001).

Apesar da extensa utilização de produtos médico-hospitalares fabricados com polímeros, a legislação brasileira não descreve detalhadamente os aspectos pertinentes ao processamento e controle de qualidade dos mesmos. Alguns dados

---



---

detalhados estão disponíveis para o PVC, especificamente, para sua utilização na fabricação de bolsas plásticas para o acondicionamento de sangue humano e seus componentes. Estão descritas informações como condições de fabricação, impressão, composição de solução preservadora (anticoagulante) permitida, esterilização, acondicionamento, rotulagem, requisitos para os acessórios e outros. Com relação à inclusão de aditivos, ressalta-se a ausência de corantes ou pigmentos, limites para o principal aditivo dioctilftalato (DOP) e limites para determinados íons e metais (BRASIL, 1988). Tal omissão justifica-se pelo elevado número de inovações sob sigilo de patentes que ocorrem para polímeros inovadores dimensionados para aplicações específicas.

#### **2.5.4 Biocompatibilidade de Polímeros**

Distintas informações podem ser obtidas na avaliação do comportamento da superfície e da massa interna (*bulk*) dos polímeros, na dependência dos métodos escolhidos para estes estudos.

Para a escolha do método, diferentes fatores devem ser avaliados, tais como: a) natureza da avaliação requerida; b) extensão e profundidade da área analisada; c) tipo de interação entre a técnica e a superfície a ser analisada; d) adequação entre amostra e metodologia escolhida; e) preparação da amostra; f) limitações impostas pela superfície do polímero analisado; g) precisão e exatidão do método; h) facilidade de uso; i) custo e j) disponibilidade do equipamento/instrumental necessário. Ademais, ressalta-se que as vantagens e desvantagens encontradas em cada método podem influenciar o emprego, concomitantemente, de outras tecnologias. Desta forma, os métodos biológicos são de extrema importância na avaliação com o objetivo de se empregar um polímero como biomaterial. Portanto, devem ser adequadamente dimensionados para complementar um amplo estudo sobre o comportamento desses materiais, principalmente, tendo em vista que alterações superficiais interferem diretamente na biocompatibilidade de polímeros (STROBEL et al., 1995; KACZMAREK et al., 2002; AOUTINI, 2003; BORCIA et al., 2004; BORCIA et al., 2004a; SVORCIK et al., 2006; TAJIMA; KOMVOPOULOS, 2006).

---

---

Dentre as técnicas adequadas para proporcionar estudo abrangente, citam-se métodos espectroscópicos, microscópicos, termodinâmicos e outros complementares, como métodos biológicos (MERRET et al., 2002; USP 29, 2006). Os métodos de análise empregados no presente trabalho foram: Espectroscopia Fotoacústica no Infravermelho com Transformadas de *Fourier* (PAS-FTIR), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Perfilometria, microanálise em sistema *Energy Dispersive Spectroscopy* (EDS) e citotoxicidade “*in vitro*” pelo método biológico de Difusão em Ágar.

## **2.6. Análises de Materiais Poliméricos**

### **2.6.1 Espectroscopia Fotoacústica no Infravermelho com Transformadas de *Fourier* (PAS-FTIR)**

O séc. XX foi marcado pelas notáveis contribuições dos métodos que empregam tecnologias de espectroscopia para o estado da arte da física atômica e molecular, da química e da biologia molecular.

A espectroscopia pode ser definida como um método físico de determinação da estrutura molecular de um composto e se baseia no estudo da interação da radiação eletromagnética com a matéria, seja por absorção, emissão ou espalhamento da radiação, originando sinais denominados espectros.

A obtenção de espectros pode ser realizada de modos diferentes, onde os mais utilizados para o estudo de polímeros são: Transmissão ou Absorção, Reflectância Total Atenuada (ATR), Reflectância Difusa (DRIFTS), Reflectância Especular, Microscopia no Infravermelho e Fotoacústico no Infravermelho (PAS).

O efeito fotoacústico foi descoberto por Alexander Graham Bell em 1880, mas sua aplicação prática só foi desenvolvida entre 1970 e 1980. Bell mostrou que um sinal audível pode ser obtido diretamente ao interromper rapidamente um raio de luz com um disco rotativo dotado de fendas. O raio pode ser focalizado sobre o selênio ou qualquer sólido sob a forma de diafragmas conectados a um sistema de audição. Ele demonstrou que o efeito fotoacústico baseou-se na absorção de luz e que o sinal resultante foi proporcional à intensidade da luz incidente. Como suas investigações

---

---

basearam-se no uso da audição como mecanismo detector, poucos projetos envolveram esse método, até que equipamentos adequados foram desenvolvidos nos anos 70 (CIURCZAK, 1999).

A espectroscopia vibracional (Infravermelho) configura ferramenta poderosa na identificação, determinação de grupos funcionais e estudos conformacionais e estruturais de polímeros, permitindo a obtenção do espectro vibracional completo da molécula (KAWANO, 2004). As moléculas apresentam vibrações normais que podem ser do tipo estiramento de ligação, deformação angular e torção. A vibração normal de estiramento pode ser do tipo simétrico, anti-simétrico, degenerado, em fase, fora de fase e pulsação ou respiração de anel. Já a vibração normal de deformação angular pode ser do tipo simétrico, *wagging*, *twisting*, *rocking*, degenerado, no plano, fora do plano, deformação de anel e torção (KAWANO, 2004).

Em um espectro vibracional, além das bandas fundamentais, podem ser identificadas as do tipo combinações por soma ou por diferença e as bandas harmônicas (múltiplos de uma banda fundamental). Na região de frequências baixas ( $< 500 \text{ cm}^{-1}$ ) podem aparecer bandas de torção, bandas de modo de rede (devido aos movimentos de uma cadeia em relação a outras) e bandas devidas ao modo acústico (vibração de cristais). Além disso, algumas bandas poderão apresentar-se desdobradas devido à existência de vibrações normais, fundamentais em fase e fora de fase de grupos adjacentes, numa cadeia ou entre duas vibrações normais de cadeias próximas, no interior de uma célula unitária. Assim, as frequências vibracionais de uma molécula dependem da natureza do movimento, massa dos átomos, geometria da molécula, natureza das ligações químicas e ambiente físico/químico (KAWANO, 2004). A Espectroscopia de Absorção no Infravermelho (IR) pode ser dividida em três regiões distintas: IR afastado ( $10 - 400 \text{ cm}^{-1}$ ), IR médio ( $400 - 4.000 \text{ cm}^{-1}$ ) e IR próximo ( $4.000 - 12.820 \text{ cm}^{-1}$ ). A maior parte dos estudos em IR referem-se à região média, onde se localizam as frequências vibracionais fundamentais, sendo que a região que compreende frequência entre  $400$  e  $1800 \text{ cm}^{-1}$  é conhecida como região da impressão digital, pois é nesta região que aparece a maior parte das frequências vibracionais fundamentais (KAWANO, 2004).

---

---

O PAS-FTIR é um método indireto para se obter o espectro vibracional no IR, ou seja, a radiação IR modulada incidente é absorvida pela amostra até uma profundidade específica. A energia absorvida é convertida em energia térmica por um processo de relaxação não radioativo e, devido à modulação da radiação IR, cria-se uma flutuação térmica periódica que se difunde até a superfície da amostra, onde é gerada uma onda de pressão sonora na interface amostra/gás (hélio gasoso). Esta, por sua vez, é detectada por um microfone de alta sensibilidade que converte a onda sonora em sinal elétrico, o qual é finalmente amplificado e conectado ao circuito eletrônico do equipamento (CAHEN, 1980; CIURCZAK, 1999). O sinal detectado pelo microfone *versus* a diferença do caminho óptico resulta num interferograma que, pela aplicação da transformada de *Fourier*, dá origem a um espectro IR (KAWANO, 2004).

As principais vantagens desta metodologia se constituem na facilidade de obtenção dos espectros com pequenas quantidades de material, não destrutiva, fácil utilização e baixa sensibilidade à morfologia da amostra, podendo esta se apresentar na forma sólida, líquida ou gasosa. A técnica também apresenta importância em estudos de diferentes naturezas como: nível de penetração de aditivos em polímeros (YANG et al., 1987; SOWA et al., 1996), padrão de adesão de compostos em superfícies induzida por radiação (YUE-E et al., 1999), caracterização do perfil de profundidade na adesão de camadas de coberturas comestíveis e microrganismos em superfície de frutas (YANG et al., 2001).

Na determinação da orientação molecular de filmes de poli(tereftalato de etileno) (PET) foi empregada a técnica de PAS-FTIR comparativamente a ATR-FTIR. Foram obtidos dois espectros que se complementam, sendo que a primeira técnica evidenciou bandas diferenciadas que somente ficaram evidentes devido à profundidade alcançada pela técnica fotoacústica (KRISHNAN et al., 1982). A complementação das informações obtidas por técnicas de caracterização de polímeros foi evidenciada também entre a Espectroscopia Fotoacústica (PAS-FTIR) e Espectroscopia Fotoeletrônica de Raios X (XPS) na avaliação dos efeitos decorrentes de processo de corrosão aplicado a dióxido de silício (sílica) (GARDELLA et al., 1983). A capacidade da metodologia PAS-FTIR em atingir diferentes níveis de profundidade de materiais foi avaliada por Yang em experimento envolvendo a distribuição de produtos de degradação em nível superficial e profundo

---

---

de amostras de fibras de PP e algodão tratadas quimicamente com composto antichamas (YANG, 1992).

Trabalho de Ryczkowski e Pasieczna (2003) descreve a excelente aplicabilidade do PAS-FTIR em conjunto com a espectroscopia Raman na atribuição de bandas bem definidas e fundamentais para caracterização de superfícies poliméricas submetidas a distintos processos de tratamento como homopolimerização de hidroxipropil-metacrilato, fotoxidação de copolímero estireno-isopreno e fotoxidação de filmes poli-octenâmeros.

### **2.6.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

O primeiro microscópio eletrônico de varredura foi descrito e desenvolvido por Zworynkin e colaboradores em 1942 usando três lentes eletrostáticas e bobinas eletromagnéticas (MICHLER, 2008)

A técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) ou *Scanning Electron Microscopy* (SEM) tem sido muito utilizada em conjunto com outras técnicas de caracterização de polímeros e outros materiais, fornecendo informações valiosas a respeito do aspecto visual de inúmeros tipos de superfícies e subsídios na investigação do seu comportamento frente a situações de distintas naturezas, como efeitos físicos e morfológicos decorrentes de diferenciados processos de tratamento de superfícies (BORCIA et al., 2004; CLODE, 2006; SVORCIK et al., 2006).

A MEV tem encontrado vasta aplicabilidade no estudo da superfície polimérica e também na resposta celular aos biomateriais. Esta técnica faz uso de um feixe primário de elétrons capaz de interagir com a amostra de interesse, em ambiente de vácuo, resultando em diferentes tipos de ondas eletrônicas e eletromagnéticas sendo emitidas. Os elétrons secundários ejetados a partir da amostra são coletados e visualizados, resultando numa fotomicrografia de alta resolução (MERRET et al., 2002). A preparação da amostra envolve fixação (se necessário), posicionamento no porta-amostra metálico e cobertura da amostra com uma camada metálica de 20 a 30nm de espessura previamente à análise. O metal usado deve ser condutivo e inclui normalmente ouro, platina ou mistura ouro/paládio. Após a inserção da

---

---

amostra, a aquisição das imagens é muito rápida e pode ser obtida sob várias ordens de grandeza, podendo chegar até em 200.000 vezes (MERRET et al., 2002).

Sammons e Marquis (1997) usaram reduzida pressão de vácuo para possibilitar a visualização de imagens provenientes de células de tecido ósseo aderidas em substrato polimérico sem a camada de cobertura metálica. As amostras metalizadas com ouro, prata e carbono também foram comparadas. A qualidade das imagens geradas demonstrou eficiência do procedimento, tendo sido equivalentes ambas as amostras metalizadas e não metalizadas.

Melhoramento adicional envolvendo a execução da técnica analítica foi obtido por Clode (2006), que avaliou a utilização de diferentes pressões de vácuo, proporcionando ausência de camada superficial de metal condutivo para possibilitar visualização das imagens, bem como incrementando aspectos relacionados à qualidade das imagens fornecidas pelo equipamento.

Dentre as principais vantagens citam-se a possibilidade de observação de amostras que liberam partículas sólidas ou gasosas sem danificar o instrumento, observação de amostras não-condutivas, observação de amostras com alto conteúdo de água sem a necessidade de prévia secagem e observação da dinâmica de certos processos no momento em que eles ocorrem (hidratação, desidratação, congelamento, aquecimento e testes de compressão e tensão) (MANERO et al., 2003).

### **2.6.3 Perfilometria**

O emprego da perfilometria tem por objetivo a medição da rugosidade de uma superfície, no qual se utiliza o contato mecânico (físico) de um sensor com a mesma. Desta forma, o desvio vertical deste sensor é medido em função da sua posição horizontal, podendo ser obtidas imagens bi-dimensionais e tri-dimensionais e avaliação dos valores de altura dos vários degraus (VERDONCK, 1998).

O funcionamento desse sistema engloba o posicionamento de um fragmento da amostra numa plataforma interna de forma a permanecer num ângulo de 90° em relação à agulha (sensor). O procedimento envolve também ajuste do equipamento

---

---

para medir rugosidade de material desconhecido. Para o início da varredura, permite-se o deslocamento da agulha verticalmente à amostra até que esta seja tocada e aciona-se o comando para a realização da varredura de 1mm. Ao final da varredura, a agulha separa-se automaticamente da amostra, retrocedendo à sua posição inicial.

Os valores obtidos para a rugosidade de uma determinada superfície representam a relação entre a altura medida e a distância entre o ponto mais baixo da ponta da agulha e o degrau da trincheira sendo, portanto, útil na obtenção do perfil de rugosidade de uma determinada superfície polimérica (VERDONCK, 1998).

Na avaliação da rugosidade de diferentes biocerâmicas utilizadas como substrato para o crescimento de células derivadas de ossos humanos, a técnica de perfilometria mostrou-se ferramenta útil. Tendo em vista a busca por métodos que aumentem a biocompatibilidade de próteses, foi verificado que o aumento da rugosidade influenciou a biocompatibilidade das células, juntamente com as características químicas de tais substratos (ZREIQAT et al., 1999).

Em estudos de processos por plasma, a técnica de perfilometria evidenciou padrões de aumento e diminuição na Rugosidade média (Ra) quando foram tratadas amostras de poliuretanos biodegradáveis, variando conforme o tipo de gás utilizado. Para algumas amostras, o valor obtido chegou a ser 200% maior do que a rugosidade inicial, comparativamente às amostras não submetidas à exposição por plasma. Entretanto, os motivos para tal variação foram duvidosos, levando os autores a sugerirem investigações complementares (GORNA; GOGOLEWSKI, 2003).

#### **2.6.4 Espectroscopia de Energia Dispersiva – *Energy Dispersive Spectroscopy* (EDS)**

Em adição à obtenção de imagens da superfície de polímeros, o microscópio eletrônico de varredura pode ser acoplado em sistema *Energy Dispersive Spectroscopy* (EDS) para possibilitar identificação e quantificação de elementos químicos da amostra.

---

---

Considerando os polímeros como amostras a serem submetidas a esta técnica, apresentam baixa emissividade eletrônica, baixa condutividade térmica e elétrica, assim como baixo conteúdo de água. Embora esta última característica seja desejável sob o ponto de vista de tratamento da amostra, paradoxalmente dificulta a estabilização das ligações químicas frente ao feixe eletrônico, o que deve ser considerado no momento do estabelecimento dos parâmetros relacionados à análise (GOLDSTEIN et al., 1992).

Neste sentido, em trabalho de Themner e colaboradores (1990) foram investigadas as modificações de parâmetros para a operação do equipamento, principalmente a variação da intensidade de emissão de prótons, exercendo influência direta na perda de massa da amostra analisada e na precisão do método, especialmente, em relação a polímeros, amostras biológicas (tecidos) e proteínas (gelatina).

O funcionamento do método baseia-se na interação entre o feixe de elétrons e a amostra que, quando é atingida, tem seus átomos excitados e que, ao voltarem ao estado fundamental, emitem fótons com energias características. Os fótons são assim identificados em termos de sua energia e contados pelo detector de raios X, localizado no interior da câmara de vácuo.

Desta forma, o sistema gera o espectro relativo ao número de contagens em função da energia (keV), identificando os elementos químicos presentes na amostra. Além dos espectros, o sistema realiza análise de pontos, linhas e regiões definidas sobre a imagem capturada da amostra e gera também mapa dos elementos sobre a imagem obtida (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2006).

A microanálise pode coletar informações sobre possíveis mudanças na distribuição atômica dos polímeros, representando também recurso adicional a fim de elucidar o grau de oxidação das primeiras camadas superficiais expostas, através da obtenção das concentrações elementares das amostras em percentagem e sua posterior razão atômica entre oxigênio e carbono (O/C) (STROBEL et al., 1995; LEROUGE et al., 2000a; SIDOUNI et al., 2001; AOUINTI et al., 2003; GORNA; GOGOLEWSKI, 2003; BORCIA et al., 2004; BORCIA et al., 2004a; VINOGRADOV; LUNK, 2005; WANG et al., 2005).

---



---

A determinação quantitativa do elemento enxofre em matrizes copoliméricas (sulfonato metalil de sódio-SMAS, sulfonato estireno de sódio-SSS e ditiazona-DTH) foi efetuada por MEV em sistema EDS. O método revelou-se apto a detectar baixíssimas concentrações de elementos presentes na amostra como “traços” (RAO; PANDEY, 1991). Seguindo esta tendência, Taubert e Winey constataram que a técnica representa poderosa ferramenta na determinação de traços do elemento sódio em agregados e matrizes de polietileno (ácido metacrílico) (TAUBERT; WINEY, 2002).

Modificação da técnica através do uso de dispositivo de derivatização eletrônica com nível de resolução lateral de cerca de 1 $\mu$ m foi desenvolvida por Sugiura e colaboradores (2001) para a determinação de grupos funcionais em polímeros derivatizados, Nylon-6 e copolímero de etileno e carbono. Os resultados mostraram incremento no limite de detecção, na sensibilidade (cerca de trinta vezes superior) e na resolução lateral quando comparado a espectroscopia no IR, habilitando o método para estudos de caracterização/degradação polimérica.

### **2.6.5 Citotoxicidade “*in vitro*” pelo método de Difusão em Ágar**

Em função das possíveis alterações que o processo empregando plasma possa acarretar a polímeros e biomateriais, principalmente tendo em vista a superfície e, portanto, sua biocompatibilidade, faz-se necessária a avaliação do grau de comprometimento da segurança biológica dos polímeros expostos quanto à citotoxicidade. O método de Difusão em Ágar revela-se adequado para proceder esta avaliação e está descrito em compêndios oficiais e normas internacionais (ISO, 1999; USP 29, 2006). Apresenta como vantagens: sensibilidade, facilidade na execução, reprodutibilidade, baixo custo, além de atender à tendência mundial em suprimir o uso de modelos animais experimentais.

Apesar da descrição de outros testes biológicos aplicáveis a polímeros na USP 29, como o teste de injeção intradérmica, teste intracutâneo e teste de implante muscular que permitem avaliar a toxicidade dos materiais ou seus extratos, esforços têm sido feitos para substituir os testes empregando animais, buscando estudar a correlação entre as respostas obtidas por testes “*in vitro*” e “*in vivo*”. Adicionalmente,

---

---

a norma “ISO 10.993-5: *Biological evaluation of medical devices. Part 5. Test for cytotoxicity: ‘in vitro’ methods*” recomenda que sempre que possível priorizar o uso de testes “*in vitro*” (ISO, 1999; USP 29, 2006).

O termo cultura de células refere-se às culturas derivadas de células dispersas obtidas de um tecido, de uma cultura primária ou de uma linhagem celular através de desagregação enzimática, mecânica ou química. Nos anos 1940, o desenvolvimento dos meios líquidos e a descoberta dos antibióticos possibilitaram o desenvolvimento dos experimentos com as culturas de tecidos, impulsionando ampla gama de pesquisas (FRESHNEY, 1987).

A primeira linhagem celular isolada a partir de tecido subcutâneo de camundongo recebeu o nome de linhagem L. Através de clonagem, procedeu-se ao isolamento de uma nova linhagem denominada NCTC clone 929 da ATCC (*National Colletion of Type Cultures – American Type Culture Collection*), sendo amplamente utilizada nas pesquisas envolvendo citotoxicidade, até o presente momento. Desde então, as técnicas de culturas celulares são amplamente empregadas, apresentando baixo custo, facilidade de manutenção, demanda de pouco espaço físico, podendo ser utilizadas nas mais diferenciadas pesquisas, principalmente, na avaliação da toxicidade dos mais variados produtos. A verificação da viabilidade celular envolve a sobrevivência e/ou proliferação celular e podem ser avaliadas por contagem do número de células ou pelo uso de corantes vitais (CRUZ, 2003).

Visando agregar informação a respeito da biocompatibilidade de polímeros com diversas aplicabilidades, células de fibroblastos de camundongo linhagem NCTC clone 929 foram utilizadas em estudos de toxicidade de implantes confeccionados em compósitos de polietileno de altíssima densidade e polidimetilsiloxano (KHORASANI et al., 2005), bem como filmes de poli(caprolactona) a serem dimensionados como potenciais cimentos em engenharia de tecidos (SERRANO et al., 2005).

A literatura descreve dois principais corantes usados para esta finalidade, o brometo de 3 (4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5 difeniltetrazólio (MTT) e o vermelho neutro (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina.HCl). O vermelho neutro em pH fisiológico passa facilmente através da membrana plasmática e se concentra no interior dos

---

lisossomos. A perda deste gradiente de pH por mortalidade da célula ou a perda da permeação da membrana inibe a incorporação do corante (CRUZ, 2003).

Cateteres urinários de látex foram avaliados frente a quatro ensaios e comparados entre si (citotoxicidade em cultura celular, injeção intracutânea dos extratos em coelhos, implante intramuscular dos fragmentos dos cateteres em coelhos e cateterização de ovelhas no teste de irritação de mucosa). Considerando principalmente sensibilidade e aplicabilidade prática, o teste de citotoxicidade em cultura celular com captura de vermelho neutro se mostrou adequado na avaliação da segurança de tais itens (GRAHAM et al., 1984).

A biocompatibilidade de implantes ortopédicos foi avaliada utilizando cultura de osteoblastos e fibroblastos, tendo a citotoxicidade sido mensurada através de algumas características como alterações celulares, conteúdo de proteínas, perda de enzima pela membrana celular e ensaio de viabilidade usando o MTT. Este último mostrou-se adequado para atestar a segurança de tais implantes (MORRISON et al., 1995).

Compósitos de polietilenoglicol (trimetil) quitosana em diversos graus de substituição tiveram a sua biocompatibilidade avaliada através de ensaio usando o MTT. Os resultados mostraram diferentes respostas celulares, dependendo da estrutura obtida após a síntese, portanto, os autores sugerem investigações adicionais, na tentativa de ser bem sucedida a utilização de tais compósitos como veículos de liberação de fármacos (MAO et al., 2005).

---

---

### 3. OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivos:

1. Avaliar a susceptibilidade de cepas de *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* em crescimento planctônico e biofilme, envolvidas (B31 e INCQS 594) ou não em surtos de infecção (B67 e MG3-6) e cepas-padrão (*M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155, *M. bovis* BCG Moreau e *M. massiliense* CCUG 48898) frente aos seguintes desinfetantes químicos: Glutaraldeído 2%, Ácido Peracético 0,2%, Peróxido de Hidrogênio 35%, Solução Alcoólica de Digluconato de Clorexidina 0,5%, Solução Aquosa de Clorexidina 0,2%, Iodo 1%, Compostos de Amônio Quaternário 1,2% e Fenol 5%.

2. Avaliar a eficácia esterilizante dos processos que empregam tecnologia de plasma (*Reactive Ion Etching* e *Inductively Coupled Plasma*) frente às cepas acima mencionadas e inoculadas em suportes poliméricos de poli(cloreto de vinila) (PVC), polietileno de alta densidade (PEAD), policarbonato (PC), polipropileno (PP) e poliuretano (PUR).

3. Avaliar possíveis danos aos polímeros expostos ao plasma através de Espectroscopia Fotoacústica no Infravermelho (PAS-FTIR), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), microanálise em sistema *Energy Dispersive Spectroscopy* (EDS) e Perfilometria.

4. Avaliar a biocompatibilidade dos polímeros descritos acima através do método de Citotoxicidade “*in vitro*”.

---

---

#### 4. JUSTIFICATIVAS

Inúmeros agentes biocidas têm surgido nos últimos tempos como substâncias que, de fato, proporcionam a redução ou a completa eliminação de diferentes microrganismos de um determinado item, superfícies e outros sistemas. Entretanto, diferentes mecanismos adaptativos e de reparo celular podem impedir ou reverter a ação de desinfetantes e, conseqüentemente, selecionar clones resistentes. No âmbito hospitalar, a disseminação desses fatores, por sua vez, pode estar envolvida com a contaminação cruzada entre os itens médico-cirúrgicos, materiais de limpeza, sistemas de eliminação de resíduos sejam eles químicos ou biológicos e, principalmente, através do contato entre pacientes e funcionários, possivelmente contaminados.

A preocupação inerente ao uso inadequado desses agentes tem se tornado motivo de grande preocupação por parte da comunidade científica e, principalmente, por órgãos regulatórios e agências de saúde. Ademais, a busca por novos medicamentos e procedimentos terapêuticos apresenta-se como parcela considerável de conseqüências reais do uso inadequado de agentes de desinfecção e esterilização. Muitos desses microrganismos também possuem a capacidade de promover o desenvolvimento de novas doenças, de forma que sejam requeridos novos gastos em pesquisas e aquisição de medicamentos, realização de procedimentos cirúrgicos reparatórios e outros. Conseqüências maiores têm sido observadas em surtos de infecções como aqueles ocorridos nas cidades de Campinas, Belém e Rio de Janeiro, sendo as MCR, veiculadas em materiais médico-cirúrgicos, as principais causadoras (VIANA-NIERO et al., 2008).

Tendo em vista tais considerações, o Laboratório de Controle Biológico de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e o Laboratório de Sistemas Integráveis da Escola Politécnica, ambos da Universidade de São Paulo, juntamente com o Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de São Paulo buscaram a aquisição de conhecimentos quanto à eficácia microbida de agentes químicos (desinfetantes) na inativação de cepas de *M. abscessus* subsp. *bolletii*, envolvidas ou não em surtos no Brasil. Adicionalmente, estes isolados foram avaliados quanto à influência do sistema de

---

esterilização por plasma, tendo em vista sua grande capacidade de eliminação de substâncias aderidas às superfícies.

---

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 MATERIAL

#### 5.1.1 Obtenção de Suspensões de Esporos de *Bacillus atrophaeus* (PINTO, 1991; OLIVEIRA, 2000)

##### 5.1.1.1 Repiques de Manutenção

Manter as cepas padrão de referência do microrganismo-teste sob refrigeração a uma temperatura de 8°C de acordo com os procedimentos preconizados para este microrganismo (USP 23, 1995). Os repiques de manutenção realizados em tubos de ensaio contendo Ágar para Dosagem de Antibióticos nº1 (Difco, Interlab, Brasil) devem ser incubados em estufa a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 48 horas. Transferir a massa microbiana obtida, assepticamente, para *erlenmeyer* contendo 100 mL de Caldo Caseína de Soja (Difco, Interlab, Brasil) e incubar nas mesmas condições.

##### 5.1.1.2 Obtenção de Esporos

Da suspensão microbiana obtida anteriormente, inocular 5 mL em garrafas de *Roux* (R) contendo 200 mL de Ágar para Esporulação composto de: extrato de levedura (8,0g), caldo nutriente (4,0g), sulfato de manganês tetrahidratado (0,05g), cloreto de cálcio hexahidratado (0,05g), ágar (30,0g) e água destilada (q.s.p. 1000 mL) (PINTO, 1991; OLIVEIRA, 2000). As garrafas de *Roux* devem ser incubadas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por cerca de 12 a 15 dias. O acompanhamento do grau de esporulação deve ser realizado, diariamente, através de coloração específica, utilizando solução saturada de verde malaquita e solução aquosa de safranina sobre esfregaço devidamente fixado em lâmina de vidro 26mm x 76mm por 10 minutos sob leve aquecimento.

---

Proceder à contagem de, pelo menos, 10 campos microscópicos para cada garrafa, determinando-se a porcentagem de esporos em relação ao total de células vegetativas. Após atingir o grau de 95% de esporulação, interromper a incubação no 12º ou 13º dia e recolher as suspensões de esporos das garrafas de *Roux*, respeitando os distintos grupos.

Este procedimento, sempre envolvendo oito garrafas de *Roux*, efetuado em cinco réplicas, ao final das quais originaram os grupos de esporos de G1 a G5, sendo reunidos em um único grupo e submetidos à padronização, de forma que foi obtida a suspensão padronizada S1, conforme descrito na Tabela 7. Destinar esta suspensão às análises comparativas de perfis de susceptibilidade entre esta e as cepas do gênero *Mycobacterium*.

Tabela 7 – Padronização da nomenclatura utilizada no procedimento de produção de suspensão de esporos de *Bacillus atrophaeus*.

Grupo de Suspensão Padronizada	Grupo de Garrafas (G)	Número de Garrafas	Garrafas Individuais (R)
S <sub>1</sub>	G <sub>1</sub>	08	R 1.1 a R 1.8
	G <sub>2</sub>	08	R 2.1 a R 2.8
	G <sub>3</sub>	08	R 3.1 a R 3.8
	G <sub>4</sub>	08	R 4.1 a R 4.8
	G <sub>5</sub>	08	R 5.1 a R 5.8

### 5.1.1.3 Recolhimento e Lavagem dos Esporos

Recolher, assepticamente, a massa celular de cada garrafa de *Roux* em 30 mL de água destilada estéril com auxílio de 12g de pérolas de vidro. Centrifugar a suspensão resultante por 60 minutos a 3000 rpm para completa separação da massa celular, submetendo a tratamento térmico em banho de água a  $70 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 30 minutos, com o objetivo de eliminar possíveis microrganismos na forma vegetativa.



### 5.1.2 Padronização das Suspensões de Esporos

A partir do grupo de cinco cultivos utilizando oito garrafas para cada um ( $G_1$  a  $G_5$ ), obter cinco suspensões microbianas. Estas, por sua vez, devem ser reunidas em um único frasco originando, então, *pool* de esporos sob denominação  $S_1$ . Iniciar o procedimento de padronização com o descongelamento e a promoção de choque térmico ( $70 \pm 2^\circ\text{C}$  por 15 minutos) e, posteriormente, diluir a suspensão em água destilada estéril, de forma que as diluições de  $10^{-6}$  a  $10^{-11}$  sejam submetidas à contagem, em triplicata, pela técnica de semeadura em profundidade *Pour Plate* (USP 23, 1995). O número obtido deve ser representativo para todas as alíquotas, tendo em vista a condição de uniformidade entre as mesmas.

### 5.1.3 Cepas de *Mycobacterium* spp.

As cepas de *Mycobacterium* spp. encontram-se apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8 – Micobactérias de Crescimento Rápido isoladas de surto, não relacionadas ao surto, de ambiente natural e cepas-padrão.

<b>Espécie</b>	<b>Origem</b>
<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155	FIOCRUZ (RJ)
<i>M. bovis</i> BCG Moreau	FIOCRUZ (RJ)
<i>M. massiliense</i> (48898)	CCUG
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> (MG3-6)	Ambiental (Vitória – ES)
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> (B67)	Não Surto (Belém – PA)
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> (B31)	Surto (Belém – PA)
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> INCQS 594	Surto (Belém – PA)

**Legenda:** FIOCRUZ (RJ): Fundação Instituto Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro)  
 BCG: *Bacillus Calmette-Guerin*  
 CCUG 48898: *Culture Collection University of Göteborg*  
 INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

#### 5.1.4 Desinfetantes Químicos

Os seguintes desinfetantes químicos foram empregados no presente estudo: Glutaraldeído 2% (Fornecedor A), Ácido Peracético 0,2% (Fornecedor B), Peróxido de Hidrogênio 35% (Fornecedor B), Solução Alcoólica de Digluconato de Clorexidina 0,5% (Fornecedor C), Solução Aquosa de Clorexidina 0,2% (Fornecedor C), Iodo 1% (Fornecedor C), Compostos de Amônio Quaternário 1,2% (Fornecedor C) e Fenol 5% (Fornecedor A). Estas concentrações, recomendadas pelos fabricantes, simulam o emprego destas substâncias como agentes de redução da carga microbiana presente em superfícies, equipamentos e artigos médico-hospitalares.

#### 5.1.5 Agentes Neutralizantes

Como agentes para neutralização dos desinfetantes químicos foram empregados: Caldo Dey/Engley (BD, Estados Unidos da América); Polissorbato 80 0,5% – Lecitina de Soja 0,07% (Synth, Brasil); Polissorbato 80 0,5% (Synth, Brasil), Sulfito de Sódio 0,1% (Sigma-Aldrich, Alemanha) e Soro de Cavalo estéril sem Micoplasma (Inlab, Brasil).

#### 5.1.6 Suportes Poliméricos

Os suportes poliméricos empregados nos estudos envolvendo os processos por plasma, em dimensões de 16mm x 16mm, se constituem de: poli(cloreto de vinila) (PVC); polietileno de alta densidade (PEAD), polipropileno (PP), poliuretano (PUR) e policarbonato (PC), inoculados com  $1,0 - 5,0 \times 10^7$  Unidades Formadoras de Colônias/suporte dos microrganismos descritos nos itens 5.1.2 e 5.1.3. O conjunto de três suportes inoculados e acondicionados em Placa de Petri (fundo e tampa) com três divisões constituem as amostras-teste. A Figura 28 apresenta os esporos de *B. atrophaeus* inoculados em suporte vítreo destinados a ensaios preliminares.



Figura 28 – Suportes vítreos contendo esporos de *B. atrophaeus*, em placa de Petri, destinados às validações dos sistemas de plasma.

## 5.2 MÉTODOS

### 5.2.1 Armazenamento das Amostras (KREMER et al., 2002)

Para o armazenamento das cepas de *Mycobacterium* spp. adicionar 20 mL de água destilada estéril e 10 mL de glicerol (Sigma, Alemanha) a 1,5g de Caldo Caseína de Soja (Difco, Interlab, Brasil). Após homogeneização e esterilização a temperatura de 121 °C por 15 minutos, distribuir em alíquotas de 1,0 mL em tubos *criovials* (Eppendorf, Alemanha) e, posteriormente, adicionar uma alíquota de 1,0 mL de cada uma das seis suspensões microbianas a cada *criovial*. Adicionalmente, proceder à homogeneização do conteúdo para posterior acondicionamento do conjunto em freezer a -70 °C (Laboratório de Imunologia – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo).

### 5.2.2 Teste de Promoção de Crescimento dos Meios de Cultura

Este procedimento atende aos requisitos de Boas Práticas de Laboratório em Microbiologia (USP 30, 2008) e às recomendações dos fabricantes, tendo como objetivo a verificação da esterilidade do meio, viabilidade e pureza da cultura nos respectivos meios e, conseqüentemente, a padronização do crescimento microbiano, tanto das cepas-padrão quanto daquelas isoladas de ambientes hospitalares (surto e não relacionadas ao surto) e fonte ambiental.

#### 5.2.2.1 Meio de Cultura Sólido

##### 5.2.2.1.1 Middlebrook 7H11 (M7H11)

Após a completa dissolução de 21g do meio base (Difco, Interlab, Brasil) em 900 mL de água purificada e 0,5 mL de glicerol (Sigma, Alemanha), autoclavar a mistura por 15 minutos a 121 °C.

---

---

A cada porção de 180 mL, à temperatura de  $53 \pm 2^\circ\text{C}$  adicionar, assepticamente, 20 mL da solução de enriquecimento BBL™ MGIT™ OADC (BD, Estados Unidos da América) constituída de ácido oleico (0,6g), albumina bovina fração V (50g), dextrose (20g), catalase (0,03g) e água purificada (q.s.p 1000 mL). Previamente ao resfriamento, distribuir 15 mL do meio de cultura em placas de Petri estéreis, sendo o conjunto armazenado sob refrigeração a  $2 - 8^\circ\text{C}$ . No momento da utilização, as placas de Petri devem ser mantidas a temperatura ambiente ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ), por no mínimo 3 horas, previamente à inoculação dos microrganismos.

### **5.2.2.2 Meios de Cultura Líquidos**

#### **5.2.2.2.1 Middlebrook 7H9 (M7H9)**

Dissolver 4,7g do meio base (Difco, Interlab, Brasil) em 900 mL de água purificada e 0,5 mL de glicerol (Sigma, Alemanha) e, posteriormente, autoclavar a mistura por 15 minutos a  $121^\circ\text{C}$ .

A cada porção de 180 mL, à temperatura de  $53 \pm 2^\circ\text{C}$  adicionar, assepticamente, 20 mL da solução de enriquecimento BBL™ MGIT™ OADC (BD, Estados Unidos da América).

#### **5.2.2.2.2 Proskauer–Beck Modificado (AOAC, 1988)**

Em detrimento da não comercialização deste meio de cultura base, pesar devidamente os seguintes constituintes: 2,5g de fosfato monopotássico (Merck, Alemanha), 5,0g de asparagina (Fluka, Alemanha), 0,6g de sulfato de magnésio heptahidratado (Sigma-Aldrich, Alemanha), 0,001g de sulfato de zinco heptahidratado (Mallinckrodt Baker, Estados Unidos da América), 2,5g de citrato de magnésio (Fluka, Alemanha), 0,0046g de cloreto férrico (Carlo Erba, Itália), 20 mL de glicerol (Sigma, Alemanha) e adicionar 1000 mL de água purificada.

---

---

Após homogeneização dos componentes do meio base, proceder ao aquecimento da mistura para completa dissolução e, posteriormente, ajustar o pH para 7,3 (Hanna, Romênia) a 25°C com solução de NaOH a 1N. Após a filtração em papel de filtro tipo 10 (gramatura – 65,28g/m<sup>2</sup> e porosidade – 2,96µm) (Inlab, Brasil), autoclavar o meio de cultura a 121°C por 15 minutos. Decorrido o tempo para resfriamento, filtrar e distribuir novamente o meio de cultura em porções de 10 mL em tubos de vidro de 20mm x 150mm (Pyrex, México) para posterior re-autoclavação do conjunto nas mesmas condições anteriores.

#### **5.2.2.2.3 Meio de Kirchners (AOAC, 1988)**

De semelhante forma ao meio Proskauer–Beck, em detrimento da não comercialização do meio de cultura base de Kirchners, pesar devidamente os seguintes constituintes: 1,5g de fosfato dipotássico (Fluka, Alemanha), 2,5g de fosfato monopotássico (Merck, Alemanha), 0,6g de sulfato de magnésio (Sigma-Aldrich, Alemanha), 2,5g de citrato de sódio (Sigma, Alemanha), 5,0g de asparagina (Fluka, Alemanha), 1,0g de ágar (Difco, Brasil), 20 mL de glicerol (Sigma, Alemanha) e adicionar 1000 mL de água purificada.

Após homogeneização dos componentes, proceder ao aquecimento da mistura para completa dissolução e ajustar o pH para 7,2 (Hanna, Romênia) a 25°C com solução de NaOH a 1N. Posteriormente, distribuir o meio base em porções de 180 mL e autoclavar por 15 minutos a 121°C. Adicionar, assepticamente, à temperatura de 53 ± 2°C, 20 mL de meio de enriquecimento BBL<sup>TM</sup> MGIT<sup>TM</sup> OADC (BD, Estados Unidos da América). Distribuir, assepticamente, 20 mL do meio de cultura em tubos de 20mm x 150mm.

---

### 5.2.3 Padronização do Inóculo Microbiano (AOAC, 1988)

O meio de cultivo empregado para a padronização dos inóculos nos testes de avaliação da eficácia micobactericida constitui-se de Proskauer–Beck Modificado com adição de 0,1% de Polissorbato 80 (Inlab, Brasil).

Para os testes envolvendo cilindros de porcelana (Teste Presuntivo e Confirmatório de Eficácia Micobactericida/Tuberculocida), ajustar o inóculo para 20% de transmitância a 650 nm (Micronal Modelo B-395, Brasil). Dispersar o agregado microbiano com a adição de solução de gelatina 2% (Gellita, Brasil), sendo que para o teste em Suspensão, a densidade aproximada compreende  $1,0 - 5,0 \times 10^7$  UFC/mL.

### 5.2.4 Curva de Crescimento em Suspensão

Para a caracterização do crescimento da cepa de *M. abscessus* subsp. *bolletii*, isolada de surto (INCQS 594) foi retirada alíquota de 100 $\mu$ L da suspensão padronizada ( $1,0 - 5,0 \times 10^7$  UFC/mL) e transferida para *erlenmeyer* contendo 100 mL de Caldo M7H9 (Difco, Interlab, Brasil) e Polissorbato 80 0,1%, sendo o conjunto incubado a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 10 dias.

Para o acompanhamento do crescimento microbiano, uma alíquota de 1,0 mL da suspensão contida no *erlenmeyer* foi retirada, diariamente, e submetida à diluições seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ . Posteriormente, 1 mL de cada diluição foi transferida para placas de Petri, em triplicata, seguido de adição de 15 mL de Ágar M7H11 (Difco, Interlab, Brasil). O conjunto foi, então, incubado a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por sete dias para o acompanhamento do crescimento microbiano. Após o período de incubação, as placas de Petri foram submetidas à contagem dos microrganismos em equipamento tipo Quebec (Quimis, Brasil). Os resultados obtidos da carga microbiana contida no inóculo inicial e na cultura de crescimento se encontram na Tabela 9.

Tabela 9 – Contagem de *M. abscessus* subsp. *bolletii* (INCQS 594) isolada de surto ocorrido em Belém, após 10 dias de incubação.

Tempo (dias)	UFC/mL	Log (UFC/mL)
0	$2,4 \times 10^6$	6,38
1	$6,5 \times 10^5$	5,81
2	$6,5 \times 10^6$	6,81
3	$1,2 \times 10^7$	7,08
4	$2,7 \times 10^8$	8,43
5	$2,3 \times 10^8$	8,36
6	$2,4 \times 10^8$	8,38
7	$2,3 \times 10^8$	8,36
8	$1,5 \times 10^7$	7,17
9	$1,2 \times 10^6$	6,08
10	$1,0 \times 10^5$	5,00

Média de triplicata de amostras.

A construção da curva de crescimento microbiano (Figura 29) torna-se pertinente na medida em que se busca aquisição de conhecimento quanto à cinética de crescimento do microrganismo, tendo em vista a natureza de seu isolamento. Adicionalmente, aspectos desta curva, como a fase logarítmica, serão válidos na padronização do inóculo, visto a predominância de células jovens, aptas a serem empregadas em testes de eficácia de agentes antimicrobianos.



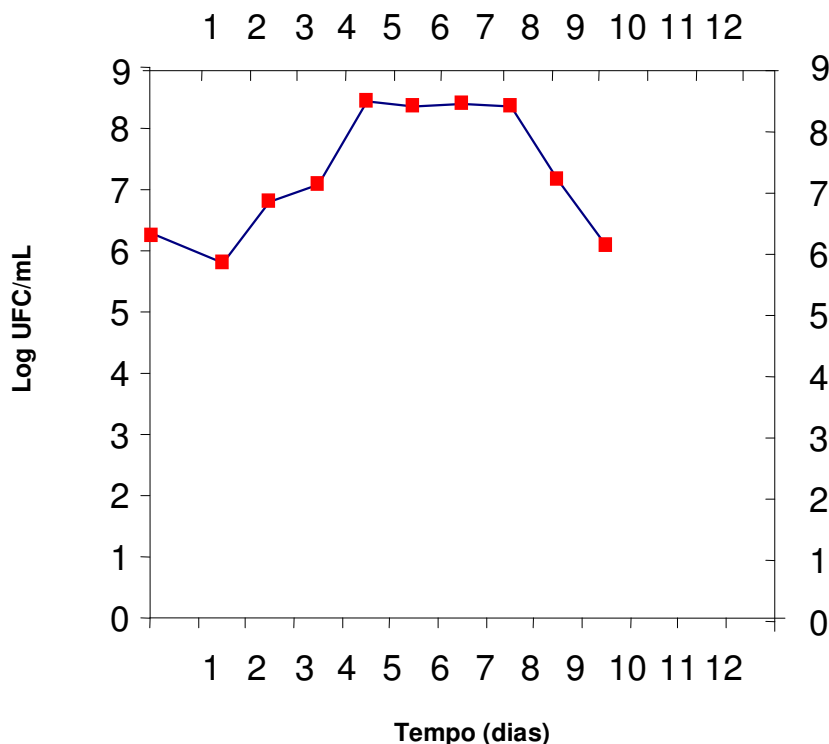


Figura 29 – Curva de crescimento microbiano referente à cepa *M. abscessus* subsp. *bolletii* (INCQS 594) isolada de surto ocorrido em Belém.

A fase exponencial, neste experimento, foi obtida entre o primeiro e o quarto dia de incubação, podendo ser calculada a velocidade específica de crescimento através da equação 9:

$$\text{Log } N = \text{Log } N_0 + (k/2,303)t \quad (9)$$

Onde, Log N= logaritmo decimal da população (8,43), após o tempo (t) de incubação (72 horas); Log N<sub>0</sub>= logaritmo decimal da população (5,81) no tempo inicial (t= 1º dia); k=constante de velocidade específica de crescimento por hora (h<sup>-1</sup>).

O resultado obtido através dos cálculos da equação 9 para a constante *k* foi de 0,046h<sup>-1</sup>. Adicionalmente, foi calculado o “tempo de geração” (g= tempo necessário para que o número de células dobre) da cepa *M. abscessus* subsp. *bolletii*, através da equação 10:

---

$$g=0,693/k \quad (10)$$

Substituindo o valor de  $k$  (0,046) na equação 10, obtém-se o valor de 15 horas, ou seja, a população microbiana contida no cultivo dobra o seu número a cada incremento de 15 horas de incubação.

Os dados obtidos serão utilizados no acompanhamento da viabilidade da cepa após os desafios de eficácia micobactericida, a partir da análise comparativa com a cinética de morte microbiana – *valor D*.

#### **5.2.5 Método Quantitativo em Suspensão para Avaliação da Eficácia Micobactericida de Desinfetantes (SUTTON et al., 2002; *Environment Protection Agency*, 2004, 2006)**

Este teste baseia-se na demonstração da eficácia micobactericida de desinfetantes químicos e emprega a cepa *Mycobacterium smegmatis* (mc<sup>2</sup> 155) como microrganismo padrão.

Previamente ao teste, faz-se necessária a avaliação da toxicidade e eficácia do agente neutralizante frente aos microrganismos e agentes desinfetantes, respectivamente, como descrito nos subitens abaixo.

##### **5.2.5.1 Avaliação da Toxicidade do Agente Neutralizante**

Para cada cepa de microrganismo-teste, adicionar alíquota de 1 mL do inóculo padronizado a três tubos contendo 9 mL dos agentes neutralizantes: Caldo Dey/Engley (D/E) (Difco, Interlab, Brasil), Polissorbato 80 0,5% – Lecitina de Soja 0,07% e Polissorbato 80 0,5%, mantendo a mistura sob diferentes tempos de exposição (5, 10, 15 e 20 min.). Este teste avalia o efeito tóxico do agente neutralizante sobre as células, sendo o resultado caracterizado pela exibição ou não da viabilidade celular. Para isto, decorridos os tempos de contato, adicionar 1 mL de cada mistura (agente neutralizante-microrganismo) a placas de Petri, em triplicata de amostras e, posteriormente, distribuir 15 mL de Ágar M7H11. Incubar o conjunto a 35 ± 2°C por 14 dias, prosseguindo à leitura após o tempo preconizado.

---

### 5.2.5.2 Avaliação de Eficácia do Agente Neutralizante

Adicionar alíquota de 1 mL do desinfetante a 9 mL do agente neutralizante, em triplicata de amostras e manter o conjunto em contato por diferentes tempos (5, 10, 15 e 20 min.). Adicionar 1 mL do inóculo padronizado dos microrganismos-teste a 9 mL da mistura desinfetante-neutralizante. Manter o conjunto em contato por 10 minutos, a fim de se verificar a eficácia do agente neutralizante sobre o desinfetante. Decorrido este tempo, inocular 1 mL da mistura desinfetante-neutralizante-microrganismo em placas de Petri, em triplicata de amostras, com posterior adição de Ágar M7H11, seguida de incubação a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 14 dias, para verificar a viabilidade das células microbianas.

### 5.2.5.3 Teste em Suspensão

Previamente à exposição dos microrganismos, manter os tubos (20mm x 150mm) contendo 9 mL de agente desinfetante, em quadruplicata para cada tempo e para cada cepa, em banho de água a temperatura de  $20^\circ\text{C}$  durante todo o tempo do teste (BEST et al., 1990).

Adicionar alíquota de 1 mL do inóculo padronizado dos microrganismos-teste aos tubos contendo desinfetante, agitar por 10 segundos em vórtex a 1500 rpm (IKA, Estados Unidos da América) e manter o conjunto por diferentes tempos de contato (5, 10, 15, 20 e 30 minutos). Decorridos os respectivos tempos de exposição, retirar uma alíquota de 1 mL da mistura da reação e adicionar a tubo contendo 9 mL do agente neutralizante (Caldo D/E, Polissorbato 80 0,5% – Lecitina de Soja 0,07% ou Polissorbato 80 0,5%), sendo este designado Tubo A (diluição  $10^0$ ). Após tempo de contato de 10 minutos diluir, de forma seriada, uma alíquota de 1 mL até  $10^{-2}$ , sendo os tubos designados B ( $10^{-1}$ ) e C ( $10^{-2}$ ). Posteriormente, adicionar 1 mL de cada diluição a placas de Petri, em triplicata, sendo recobertas/homogeneizadas por Ágar M7H11, seladas com *Parafilm* (3M, Estados Unidos da América) para evitar a dessecação do meio de cultura e incubadas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 14 dias. Decorrido o tempo de incubação, proceder à contagem dos microrganismos sobreviventes, sendo o número de UFC considerado uma variável indispensável na avaliação da

eficácia micobactericida do desinfetante através do perfil de susceptibilidade dos microrganismos-teste.

### **5.2.6 Método Presuntivo para Avaliação da Atividade Micobactericida de Desinfetantes (AOAC, 1988)**

#### **5.2.6.1 Avaliação da Toxicidade do Agente Neutralizante**

A três tubos contendo 9 mL do agente neutralizante (Sulfito de Sódio 0,1%, Polissorbato 80 0,5% – Lecitina de Soja 0,07% ou Polissorbato 80 0,5%), adicionar uma alíquota de 1 mL do inóculo contendo, aproximadamente,  $1,0 \times 10^7$  UFC/mL, em triplicata. Manter o conjunto em contato por diferentes tempos (5, 10, 15 e 20 min.), a fim de se avaliar o efeito tóxico sobre as células microbianas. O resultado deve ser visualizado através da exibição ou não de crescimento microbiano com o desenvolvimento de colônias características em Ágar M7H11 a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  após 14 dias, caracterizando ou não a perda da viabilidade celular.

#### **5.2.6.2 Avaliação da Eficácia do Agente Neutralizante**

Manter em contato por diferentes tempos (5, 10, 15 e 20 min.) a mistura de 1 mL do desinfetante e 9 mL do agente neutralizante, em triplicata de amostras. Posteriormente, a 9 mL desta mistura adicionar 1 mL do inóculo padronizado dos microrganismos-teste. Manter o conjunto em contato por 10 minutos. O procedimento para recuperação das células inoculadas se constitui de inoculação de 1 mL dos tubos ensaiados à placas de Petri com posterior adição de Ágar M7H11, em triplicata de amostras, seguida de incubação a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 14 dias.

---

### 5.2.6.3 Preparação dos Cilindros

Para avaliação da eficácia de desinfetantes químicos empregam-se cilindros como sistemas carreadores de microrganismos, sendo aqueles constituídos de porcelana, os utilizados para veiculação de cepas do gênero *Mycobacterium*. Os cilindros empregados tanto no teste presuntivo quanto no confirmatório possuem dimensões de 6 mm de diâmetro externo, 4 mm de diâmetro interno e 6 mm de comprimento (Fisher Scientific Co., Estados Unidos da América). A seleção dos cilindros para os testes segue critérios de integridade e danos visíveis, excluindo-se aqueles que apresentarem orifícios, rachaduras, lascas e manchas.

Após a seleção, mergulhar os cilindros em solução Triton X-100 (Inlab, Brasil) por, aproximadamente, 2 horas e lavar cuidadosamente com água destilada. Mergulhar os cilindros em solução de NaOH 1M durante 12 horas e, posteriormente, lavar com água destilada até que o pH atinja a neutralidade. Dispor os cilindros em placas de Petri forradas com duas folhas de papel de filtro e autoclavar por 20 minutos a 121 °C.

### 5.2.6.4 Teste Presuntivo

Transferir 22 cilindros de porcelana para 20 mL de cada uma das seis suspensões bacterianas padronizadas, conforme item 5.2.3, contidas em tubos de 20mm x 150mm, sendo 20 para o teste de eficácia e os demais para controle de viabilidade celular e contagem da carga microbiana aderida. Após 15 minutos de contato, remover e acondicionar os cilindros na posição vertical em placa de Petri forrada com papel de filtro (conjunto estéril) e incubar a  $36 \pm 1$  °C por 30 minutos para secagem.

Com o auxílio de proveta estéril de 250 mL, preparar as soluções dos desinfetantes conforme recomendações dos fabricantes, quanto a concentração, pH e armazenamento.

---

---

Durante todo o teste, os tubos contendo 10 mL do desinfetante devem ser mantidos em banho de água à temperatura de 20 °C, a fim de que a temperatura não se constitua em agente potencializador da ação antimicrobiana.

Os 20 cilindros contaminados e secos devem ser adicionados a cada um dos 20 tubos contendo o desinfetante a intervalos de 30 segundos, cronometricamente. Imediatamente, após a adição do cilindro, agitar levemente e manter os tubos no banho de água por 30 minutos.

Decorrido o tempo preconizado para avaliação da atividade micobactericida, transferir os cilindros para número igual de tubos contendo 10 mL de caldo Proskauer–Beck Modificado e agente neutralizante (Sulfito de Sódio 0,1%: Glutaraldeído, Ácido Peracético e Peróxido de Hidrogênio; Polissorbato 80 0,05% – Lecitina de Soja 0,07%: Digluconato de Clorexidina, Clorexidina e Compostos de Amônio Quaternário; Polissorbato 80 0,5%: Iodo e Fenol), sendo esta denominada sub-cultura 1. Após 20 minutos de contato, mantendo os intervalos de tempos descritos anteriormente, re-transferir os cilindros para número igual de tubos contendo 10 mL de caldo Proskauer–Beck Modificado e os respectivos agentes neutralizantes (sub-cultura 2). Os 40 tubos devem ser agitados e incubados a  $36 \pm 1$  °C durante 14 dias.

Como ferramenta comparativa na determinação da eficácia micobactericida de desinfetantes, empregar como microrganismo de referência *M. smegmatis*, conforme metodologia preconizada pela *American Organization of Analytical Chemists* (AOAC) (AOAC, 1988).

#### **5.2.7 Método Confirmatório para Avaliação da Atividade Tuberculocida de Desinfetantes (AOAC, 1988)**

A eficácia tuberculocida, realizada neste teste, é determinada através da inativação comparativa frente a *Mycobacterium bovis* cepa BCG Moreau, tendo em vista a impossibilidade do emprego de cepa de *M. tuberculosis*, o que tornaria o teste inviável.

---

---

### 5.2.7.1 Avaliação da Toxicidade do Agente Neutralizante

A tubos contendo 9 mL do agente neutralizante constituído de Soro de Cavalo Estéril sem Micoplasma (Interlab, Brasil) adicionar uma alíquota de 1 mL do inóculo padronizado dos microrganismos-teste, em triplicata, e manter o conjunto em contato por 5, 10, 15 e 20 minutos. Decorrido este tempo, também em triplicata de amostra, inocular 1 mL da mistura em Ágar M7H11 e incubar o conjunto a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 14 dias.

### 5.2.7.2 Avaliação da Eficácia do Agente Neutralizante

De forma semelhante aos testes anteriores para verificação da eficácia do agente neutralizante, adicionar uma alíquota de 1 mL do desinfetante a 9 mL do agente neutralizante (Soro de Cavalo Estéril sem Micoplasma) (Inlab, Brasil) e manter o conjunto em contato 5, 10, 15 e 20 minutos. Posteriormente, adicionar a 9 mL desta mistura 1 mL do inóculo padronizado dos microrganismos-teste. Manter o conjunto em contato por 10 minutos e adicionar 1 mL da mistura à placas de Petri com posterior adição de Ágar M7H11, seguida de incubação a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 14 dias.

### 5.2.7.3 Teste Confirmatório

Transferir 12 cilindros de porcelana para 20 mL de cada uma das seis suspensões bacterianas padronizadas, conforme item 5.2.3, contidas em tubos de 20mm x 150mm, sendo 10 para o teste de eficácia e os demais para controle de viabilidade celular e contagem da carga microbiana aderida. Após 15 minutos de contato, remover e acondicionar os cilindros na posição vertical em placas de Petri forradas com duas folhas de papel de filtro (Inlab, Brasil) e incubar o conjunto a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por 30 minutos para secagem.

Com o auxílio de proveta estéril de 250 mL, preparar as soluções desinfetantes, conforme recomendações dos respectivos fabricantes.

---

---

Durante todo o teste os tubos contendo 10 mL de desinfetante devem ser mantidos em banho de água a temperatura de 20°C, a fim de que a temperatura não se constitua em agente potencializador da ação antimicrobiana.

Adicionar aos 10 tubos contendo o desinfetante 10 cilindros contaminados e secos a intervalos de 30 segundos, cronometricamente. Imediatamente, após cada adição do cilindro, agitar levemente e manter os tubos em banho de água a 20°C por 30 minutos.

Decorrido o tempo preconizado para avaliação da atividade tuberculocida, transferir os cilindros para número igual de tubos contendo 10 mL de Soro de Cavalo estéril (neutralizante). Posteriormente, agitar levemente e transferir os cilindros para número igual de tubos contendo 20 mL de caldo Proskauer–Beck Modificado. Dos mesmos tubos contendo Soro de Cavalo estéril, retirar alíquotas de 4 mL e adicionar cada alíquota de 2 mL em Caldo M7H9 e Meio de Kirchners, distribuídos em porções de 20 mL. Agitar e, posteriormente, incubar os tubos por 60 dias a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ . Se após esse período de incubação não for evidenciado crescimento nos tubos ou se somente for observado apenas crescimento ocasional, reincubar por período adicional de 30 dias, antes da leitura final do teste.

Para a verificação da eficácia tuberculocida dos desinfetantes, empregar *M. bovis* cepa BCG Moreau como microrganismo de referência, conforme metodologia preconizada pela AOAC (1988).

### **5.2.8 Avaliação da Eficácia Micobactericida frente a Biofilmes em Suspensão**

A partir da inexistência de um método oficial para avaliação da atividade biocida frente a sistema de biofilme, foi empregado o método “Presuntivo para Avaliação da Eficácia Micobactericida” (item 5.2.6), sendo realizadas adaptações que respeitassem as características inerentes a este tipo de conformação microbiana.

---



### 5.2.8.1 Crescimento de Biofilmes em Suspensão

A partir do crescimento microbiano em tubo das seis cepas de *Mycobacterium* spp., adicionar alíquota de 1 mL ( $1,0 - 5,0 \times 10^7$  UFC/mL) a *erlenmeyer* contendo 200 mL de caldo Caseína de Soja, sem adição de Polissorbato 80 para promover a formação de aglomerados celulares. Após dez dias de incubação, proceder à retirada de 20 mL da massa microbiana para ser empregada em experimentos envolvendo a avaliação da eficácia micobactericida de desinfetantes químicos.

### 5.2.8.2 Avaliação da Eficácia Micobactericida

Transferir 22 cilindros de porcelana para 20 mL do crescimento em biofilme das seis cepas de *Mycobacterium* spp., contidas em tubos de 20mm x 150mm, sendo 20 para o teste de eficácia e os demais para controle de viabilidade celular. Após 15 minutos de contato, remover e acondicionar os cilindros na posição vertical em placa de Petri forrada com papel de filtro (conjunto estéril) e incubar a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por 30 minutos para secagem.

Com o auxílio de proveta estéril de 250 mL, preparar as soluções desinfetantes de forma que estejam em conformidade com as recomendações dos fabricantes.

Durante todo o teste, os tubos contendo 10 mL do desinfetante devem ser mantidos em banho de água à temperatura de  $20^\circ\text{C}$ , a fim de que a temperatura não se constitua em agente potencializador da ação antimicrobiana.

Os 20 cilindros contaminados e secos devem ser adicionados a cada um dos 20 tubos contendo o desinfetante a intervalos de 30 segundos, cronometricamente. Imediatamente, após a adição do cilindro, agitar levemente e manter os tubos no banho de água por 60 minutos.

Decorrido o tempo para avaliação da atividade micobactericida sobre biofilmes, transferir os cilindros para número igual de tubos contendo 10 mL de caldo Proskauer-Beck Modificado e agente neutralizante, sendo esta denominada subcultura 1. Após 20 minutos de contato, mantendo os intervalos de tempos descritos

anteriormente, re-transferir os cilindros para número igual de tubos contendo 10 mL de caldo Proskauer–Beck Modificado e os respectivos agentes neutralizantes (sub-cultura 2). Os 40 tubos devem ser agitados e incubados a  $36 \pm 1$  °C durante 14 dias.

### 5.2.9 Sistemas de Esterilização por Plasma

Para os estudos envolvendo os processos de esterilização por plasma foram empregados sistemas constituídos de reator com acoplamento capacitivo (*Reactive Ion Etching*) e reator com acoplamento indutivo (*Inductively Coupled Plasma*), ambos localizados no Laboratório de Sistemas Integráveis da Escola de Engenharia Politécnica da Universidade de São Paulo (LSI – EP/USP).

Os gases empregados para ambos os sistemas se constituíram de: oxigênio 99,998% de pureza (White Martins, Brasil) e peróxido de hidrogênio 30% estabilizado pela empresa Baker (Baker, Brasil). Segue, abaixo, a curva de calibração referente à vazão de peróxido de hidrogênio em função da pressão e vazão de oxigênio (Tabela 10).

Tabela 10 – Curva de calibração da vazão de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em função da pressão e vazão de O<sub>2</sub> no interior da câmara.

Pressão (mtorr)	Vazão de O <sub>2</sub> (sccm)	Vazão de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (sccm)
6,8	11	10
10,6	17	15
12,0	22	20
14,5	28	25
16,6	33	30
18,7	39	35
20,5	44	40
22,6	50	45
24,8	56	50
26,2	61	55
28,2	67	60
29,8	72	65
31,5	78	70
34,9	90	80
37,7	100	90
40,4	111	100

**Legenda:** mtorr = militorr

sccm = centímetros cúbicos padrão por minuto

Os parâmetros de processos empregados para ambos os sistemas de plasma (RIE e ICP) estão descritos na Tabela 11, sendo que todos os polímeros descritos no item 5.1.6 foram inoculados com os microrganismos–teste e, posteriormente, submetidos a diferentes combinações de variáveis destes processos.

Tabela 11 – Parâmetros de processo estudados nos sistemas de plasma RIE e ICP.

Modo	Vazão (scm)	Gases Concentração (sccm)	Pressão (mtorr)	Potência (Watts)	Tempo (min.)	Umidade Relativa (%)
RIE	200	O <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (160:40)	100	150	1, 3, 6, 9	60-70
ICP	200	O <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (160:40)	100	300	1, 3, 6, 9	25-35

**Legenda:** min. = minutos  
mtorr = militorr  
sccm = centímetros cúbicos padrão por minuto

#### 5.2.9.1 *Reactive Ion Etching (RIE)*

O sistema de plasma RIE empregado neste estudo constituiu-se de: gerador de radiofrequência (RF), reator (câmara), refrigerador de eletrodos e bomba de vácuo, conforme apresentados na Figura 30, sendo que a câmara pode ser visualizada exterior e internamente nas Figuras 31 e 32, respectivamente.

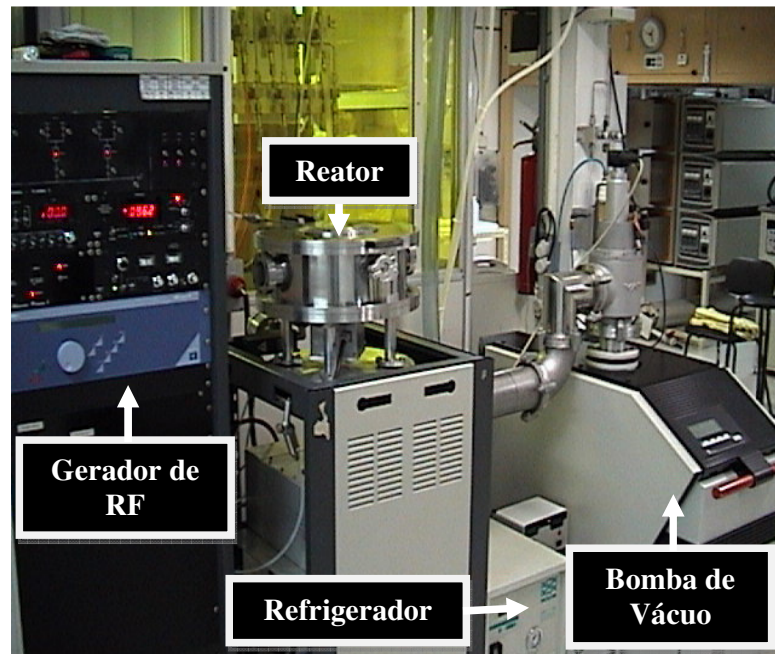


Figura 30 – Sistema de plasma com acoplamento capacitivo modo *Reactive Ion Etching* (RIE).

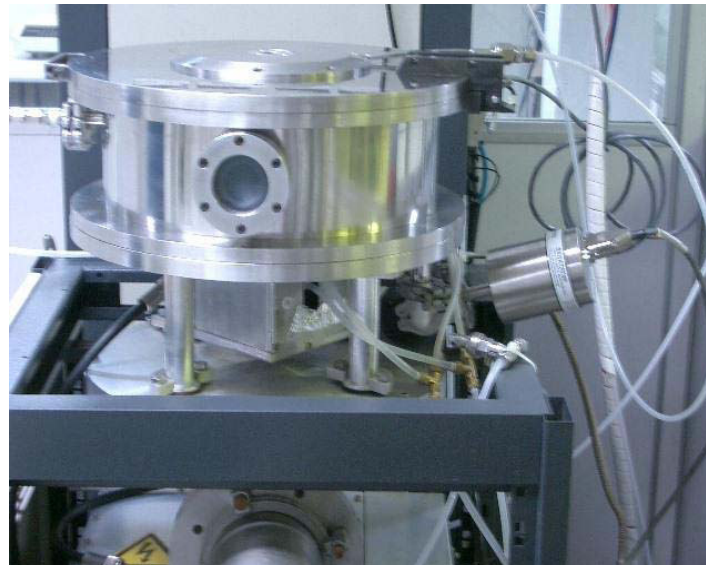


Figura 31 – Câmara do sistema de plasma com acoplamento capacitivo modo *Reactive Ion Etching* (RIE).



Figura 32 – Placa de Petri sobre o eletrodo (cátodo) no interior da câmara do sistema de plasma com acoplamento capacitivo modo *Reactive Ion Etching* (RIE).

As distintas etapas do processo de esterilização podem ser visualizadas na Figura 33, onde: (a) reator contendo os eletrodos (ânodo e cátodo) posicionados na parte superior e inferior, respectivamente; gerador de radiofrequência (círculo abaixo do cátodo) e região de vácuo; (b), (c) e (d) abertura, inserção da amostra a ser processada e fechamento da câmara, respectivamente e (e) fase plasma evidenciada pela cor lilás, quando aplicada potência de radiofrequência sobre o gás peróxido de hidrogênio.

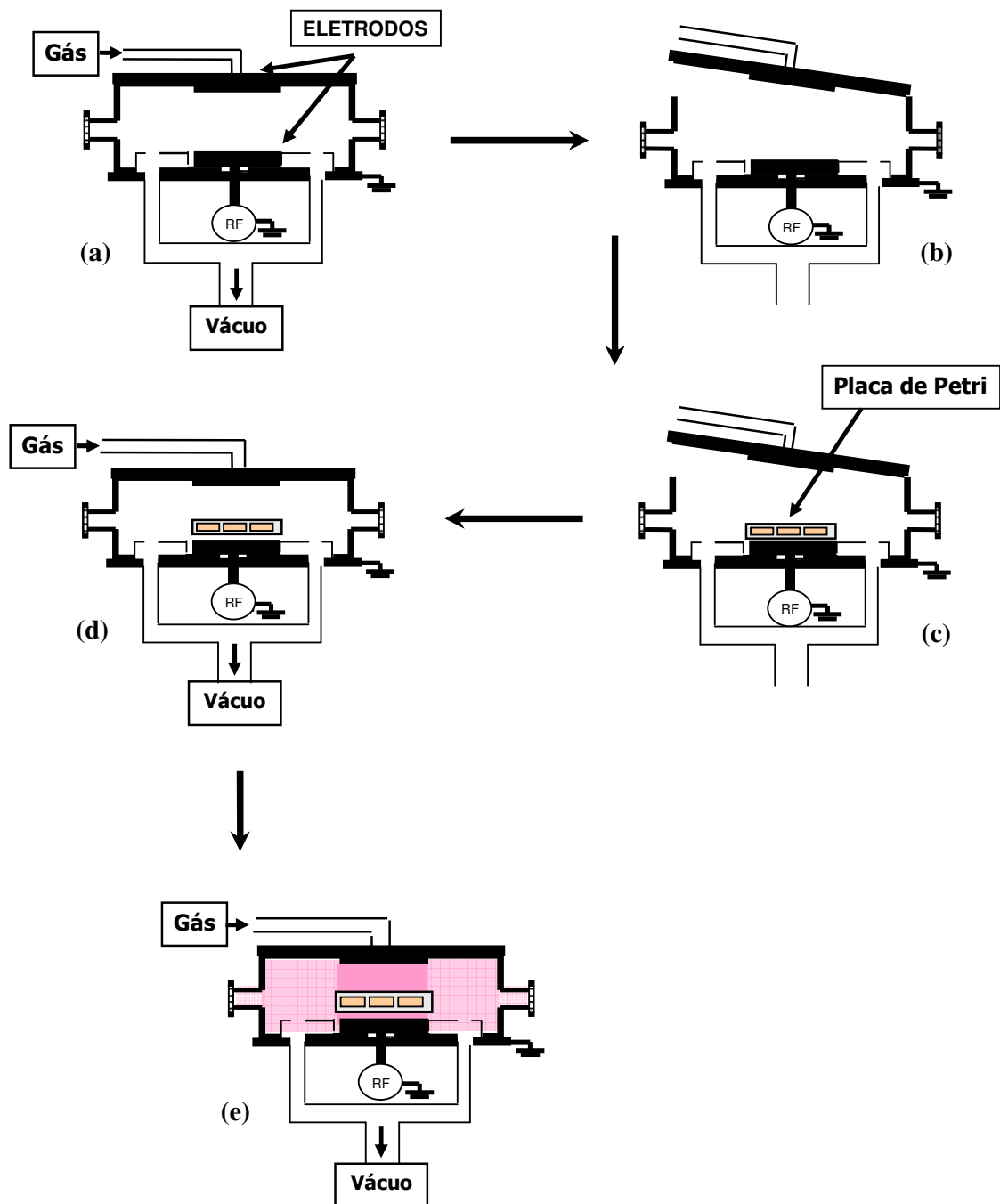


Figura 33 – Desenho esquemático representando as etapas do processo de esterilização por plasma empregando o sistema *Reactive Ion Etching*.

As amostras acondicionadas em placas de Petri (sem tampa), conforme Figura 28 (item 5.1.6) foram dispostas sobre o eletrodo (cátodo) para propiciar maior contato entre os microrganismos e as espécies reativas do plasma (Figura 32). A pressão do sistema foi reduzida até 0,02 torr (T1) (Figura 34) e o sistema de

circulação de água de refrigeração do eletrodo regulado para a temperatura de 5°C. Após a redução da pressão, os gases foram injetados no interior do reator por meio de controladores de fluxo de massa (*mass flow controllers* MKS®) (MKS, Massachusetts). O processo de esterilização ocorreu entre os tempos T2 e T3 (0,1 torr), sendo que após a interrupção de aplicação de RF (final do processo – T3), a pressão foi novamente reduzida a 0,02 torr (T4) e, posteriormente, injetado gás nitrogênio para abertura da câmara a uma pressão de 760 torr (1 atm) no sistema.

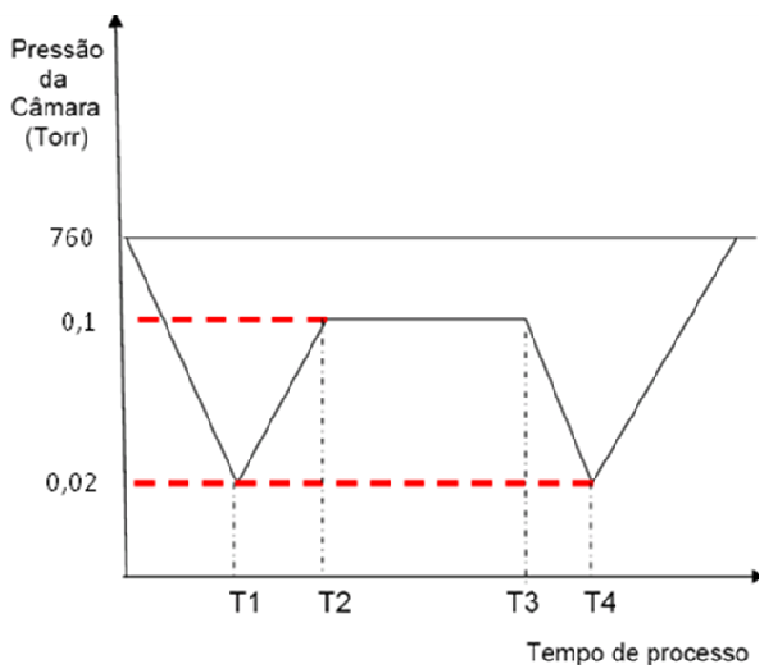


Figura 34 – Desenho esquemático das variações de pressão aplicadas durante os processos de plasma.

### 5.2.9.2 *Inductively Coupled Plasma* (ICP)

Os processos de plasma empregando reator *Inductively Coupled Plasma* se constituem de sistema híbrido, *High Density Plasma* (HDP), utilizando um sistema capacitivo (RIE) e outro indutivo (ICP), onde se pode aplicar a potência de RF, tanto nos eletrodos (RIE) quanto na bobina (ICP) ou em ambos, simultaneamente (Figuras 35, 36 e 37).

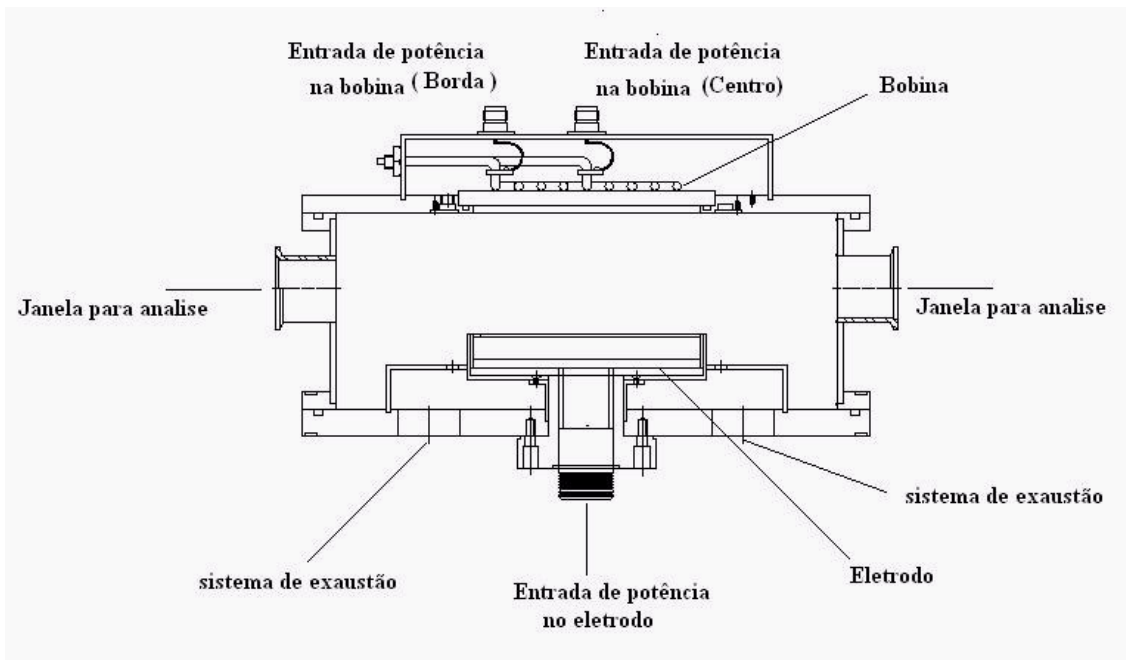


Figura 35 – Sistema de plasma de alta densidade com acoplamento indutivo modo *Inductively Coupled Plasma* (ICP).



Figura 36 – Vista interna do dispositivo de acoplamento indutivo (posição da bobina).



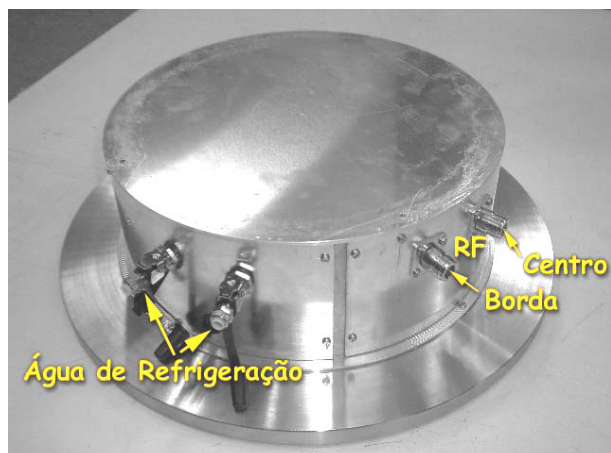


Figura 37 – Vista lateral do dispositivo, conexões de água de refrigeração e radiofrequência.

Todos os ciclos de esterilização foram realizados de forma semelhante ao descrito no item anterior (5.2.9.1) e Figura 33, para o sistema RIE. Variações dos parâmetros de processo mostrados na Tabela 11 foram determinadas em análises que antecederam a realização deste trabalho, de forma que se constituíssem em fatores de maior letalidade para diferentes microrganismos inoculados em suportes vítreos.

## 5.2.10 Avaliação da Compatibilidade das Amostras dos Polímeros com o Processo Esterilizante por Plasma

### 5.2.10.1 Espectroscopia Fotoacústica no Infravermelho com Transformadas de *Fourier*

As análises das amostras por Espectroscopia Fotoacústica no Infravermelho com Transformadas de *Fourier* foram realizadas no Laboratório de Espectroscopia Molecular do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, empregando o equipamento BOMEM modelo DA 3.16, equipado com acessório fotoacústico da MTEC modelo 200.

As vinte e cinco chapas (vinte amostras expostas e cinco não expostas ao plasma) foram cortadas em fragmentos de aproximadamente 2mm x 2mm e posicionadas de forma a preencher todo o fundo do porta-amostra (célula

---

fotoacústica). Posteriormente, admitiu-se gás hélio, sob fluxo constante por cerca de dois minutos no interior da célula. Esta etapa teve por objetivo a remoção de moléculas de vapor de água e CO<sub>2</sub>, bem como proporcionar atmosfera de hélio à amostra. Após selagem e vácuo, a varredura foi iniciada com um composto de carvão ativo e borracha, empregados como referências para calibração do equipamento. Desta forma, as análises das diferentes amostras poliméricas foram armazenadas em programa computacional BOMEM PCDA.

Os espectros das amostras foram obtidos de acordo com os seguintes parâmetros estabelecidos:

- Amplificador: ganho 4
- Resolução: 4 cm<sup>-1</sup>
- Profundidade de Penetração da Radiação Infravermelha (IV): cerca de 10µm
- Número de Varreduras: 64
- Apodização: *hamming*
- Faixa Espectral: 400 – 4.000 cm<sup>-1</sup> (número de ondas)
- Abertura: 10 mm
- Velocidade do Espelho Móvel: 0,05 cm<sup>-1</sup>

#### **5.2.10.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

As alterações morfológicas possivelmente encontradas na superfície dos suportes poliméricos foram avaliadas empregando Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) modelo JEOL 6460LV localizado no Departamento de Física Aplicada do Instituto de Física da Universidade de São Paulo (Figura 38).

As vinte e cinco chapas (vinte amostras expostas e cinco não expostas ao plasma) foram fragmentadas em dimensões irregulares de aproximadamente 10mm x 10mm (Figura 39). Após a deposição de ouro, empregando equipamento marca Edwards, modelo “*sputter coater 5150B*” (Figura 40), as amostras foram posicionadas sobre o porta-amostras (Figura 39), permanecendo no interior do equipamento em região abaixo da coluna de vácuo, como mostra a Figura 41.

---



Figura 38 – Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) JEOL 6460LV.



Figura 39 – Polímeros fragmentados em cerca de 10mm x 10mm posicionados sobre o porta-amostras (vinte e cinco fragmentos).



Figura 40 – Equipamento de deposição de ouro marca Edwards, modelo “*sputter coater 5150B*”.

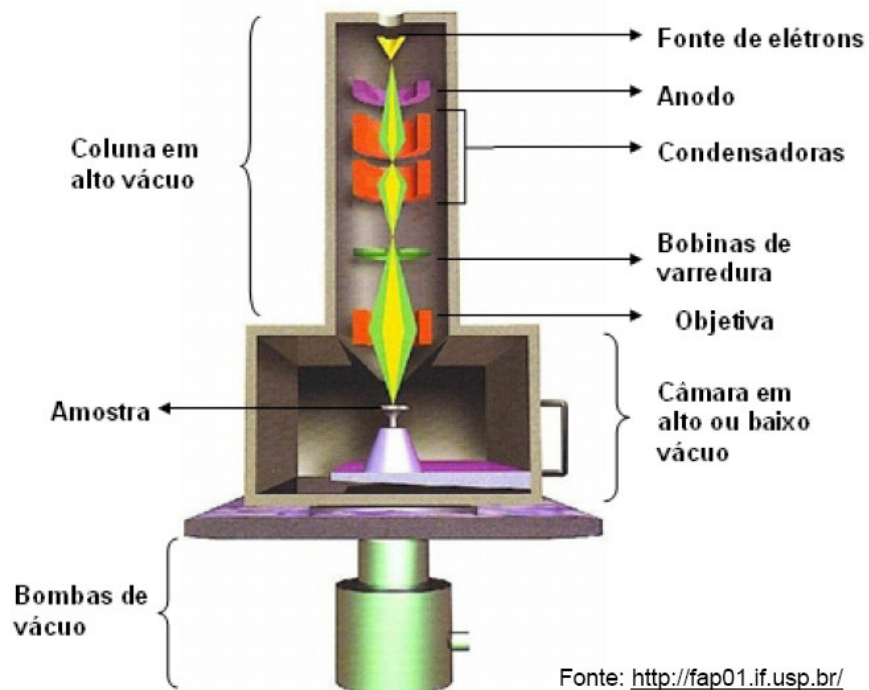


Figura 41 – Desenho esquemático da coluna de alto vácuo do Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) JEOL 6460LV.

---

Os procedimentos de aplicação de corrente elétrica e aceleração dos elétrons por diferença de potencial entre eletrodos foram realizados após o fechamento do compartimento da coluna e empregaram filamento de tungstênio na varredura das amostras. Seguem, abaixo, os parâmetros ajustados para as análises.

- Aumento: de 1.000 a 37.000 vezes (variável para cada foto)
- Profundidade de Incidência do Feixe de Elétrons: 0,5 $\mu$ m
- Perímetro da Varredura: 10 $\mu$ m
- Diferença de Potencial Aplicado: 12 keV
- Detector: elétrons retroespalhados

Adicionalmente, ao passar por lentes condensadoras, o feixe gerado reduz o seu diâmetro e após percorrer seu trajeto através uma lente objetiva, o mesmo foi focalizado sobre a amostra. A varredura da amostra pelo feixe de elétrons, por sua vez, só é possível pela existência de dois estágios de bobinas eletromagnéticas localizadas acima da lente objetiva (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2006).

### 5.2.10.3 Perfilometria

As análises das amostras por perfilometria foram realizadas no Laboratório de Sistemas Integráveis da Escola Politécnica da USP, empregando o equipamento Perfilômetro DEKTAK 3030 (*Sloan Technology Corporation*).

As vinte amostras expostas e cinco não expostas ao plasma, dimensionadas em aproximadamente 50mm x 50mm, foram posicionadas no interior do porta-amostra, sob as lentes de aumento. A especificação da ponta da agulha utilizada compreende: 25 $\mu$ m de diâmetro (12,5 $\mu$ m de raio de curvatura da ponta ( $r$ )), extensão da varredura de 1mm e força da agulha de 0,2 N.

Cada amostra foi posicionada de forma a permanecer em ângulo de 90° em relação à agulha (sensor). O procedimento iniciou-se com o ajuste do equipamento para medir rugosidade de material desconhecido. A agulha foi avançada verticalmente em direção à amostra até obter-se o contato sendo, posteriormente,

---

acionado o comando para a realização da varredura de 1mm. Ao final desta etapa, a agulha separou-se automaticamente da amostra, retrocedendo a sua posição inicial.

Os valores obtidos para a rugosidade da amostra representam a relação entre a altura medida ( $h$ ) e a distância entre o ponto mais baixo da ponta da agulha e o degrau da trincheira ( $y$ ), como mostra a Figura 42 (VERDONCK, 1998).

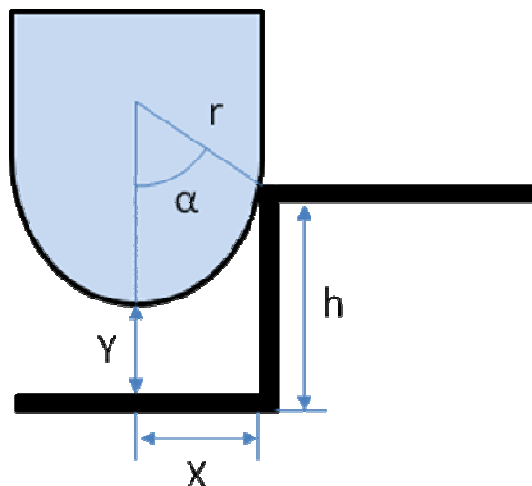


Figura 42 – Relação entre a altura medida ( $h$ ) e a distância entre o ponto mais baixo da ponta da agulha e o degrau da trincheira ( $y$ ).

#### 5.2.10.4 Microanálise em Sistema *Energy Dispersive Spectroscopy* (EDS)

Análises das amostras por sistema *Energy Dispersive Spectroscopy* também foram realizadas pelo Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) JEOL 6460LV (Figura 38). Este recurso do MEV teve por finalidade a realização da identificação semi-quantitativa dos elementos químicos que constituem as amostras.

As vinte amostras expostas e cinco não expostas ao plasma, fragmentadas em aproximadamente 10mm x 10mm, foram submetidas à deposição de ouro por tempo de 1 minuto em sistema de *sputtering* Edwards DC. As amostras foram dispostas sobre o porta-amostras (Figura 39), abaixo da coluna de vácuo (Figura 41).

O equipamento foi operado de modo similar à obtenção das fotomicrografias, sendo que os parâmetros adotados encontram-se descritos a seguir:

- 
- Profundidade de Incidência do Feixe de Elétrons: 0,5µm
  - Perímetro da Varredura: 500µm
  - Diferença de Potencial Aplicado: 15 keV
  - Detector: elétrons retroespalhados

#### **5.2.10.5 Citotoxicidade “*in vitro*” pelo Método Biológico de Difusão em Ágar**

As análises de citotoxicidade “*in vitro*” foram realizadas na Seção de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo), segundo o método de Difusão em Ágar empregando culturas celulares.

##### **5.2.10.5.1 Cultura Celular**

A linhagem celular empregada neste teste foi NCTC clone 929 (ATCC-CCL 1), células de tecido conjuntivo de camundongo, sendo que em todo o trabalho foram utilizados materiais estéreis e realizadas técnicas assépticas.

O cultivo e a manutenção da linhagem foram realizados em Meio Mínimo de Eagle (MEM), sendo preparado e suplementado com 0,1 mM de aminoácidos não essenciais, 1,0 mM de piruvato de sódio e 10% de soro fetal bovino, sem antibiótico (MEM c/ 10% SFB) a 36°C, em garrafas de 75cm<sup>2</sup> ou 250 mL com repiques a intervalos médios de 72h. A dispersão da monocamada celular foi efetuada utilizando uma associação de tripsina 0,2% e versene 0,02% (ATV).

Após a dispersão, as células foram novamente suspensas no seu respectivo meio de cultura e distribuídas, tanto nas garrafas destinadas a manutenção como em placas de Petri utilizadas durante a realização dos ensaios (FRESHNEY, 1987; CRUZ, 2003; AZEVEDO, 2004).

---

#### 5.2.10.5.2 Método de Difusão em Ágar

As células foram semeadas em volumes de 5 mL em placas de Petri (60mm x 15mm), na concentração de  $3,0 \times 10^5$  células/mL. A incubação foi realizada por 48h a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período, com a monocamada de células já formadas, o meio de cultura foi desprezado e adicionado volume de 5 mL de meio *overlay*, em cada placa de Petri. Este meio é composto de partes iguais de MEM duas vezes concentrado e ágar (BBL BD, Estados Unidos da América) a 1,8% contendo 0,01% de vermelho neutro (Merck, Estados Unidos da América), como corante vital. No momento do uso, o ágar foi fundido e misturado com o MEM duas vezes concentrado, ambos à temperatura de  $44 \pm 1$  °C.

Para a avaliação das chapas de polímeros em PVC, PEAD, PP, PUR e PC, as vinte amostras expostas e as cinco não expostas ao plasma foram fragmentadas com bisturi estéril em tamanhos aproximados de 5mm x 5mm e, posteriormente, depositadas sobre a camada de ágar, antes de sua solidificação completa. As placas de Petri (60mm x 15mm) foram incubadas novamente em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C por 24h (GUESS et al., 1965; ISO, 1999; USP 29, 2006).

As amostras foram avaliadas, em triplicata, empregando como controle positivo fragmentos de látex e controle negativo discos de papel de filtro, com dimensões iguais àqueles estabelecidos para as amostras.

Após a análise das placas, macroscópica e microscopicamente, a citotoxicidade foi constatada pela presença de halo claro sob ou ao redor das amostras testadas. Estes halos, quando presentes, foram cuidadosamente medidos empregando paquímetro calibrado. A graduação da citotoxicidade foi realizada conforme preconização da *United States Pharmacopeia* 29ª edição (2006), sendo consideradas tóxicas, para polímeros, as amostras que apresentarem IZ > 2. Esta farmacopeia também descreve os diferentes índices de zona (IZ), a saber:



- IZ=0: ausência de efeito sob a amostra
- IZ=1: alguma alteração ou degeneração celular sob a amostra
- IZ=2: halo claro limitado somente sob a amostra
- IZ=3: halo entre 0,5 e 1,0 cm ao redor da amostra
- IZ=4: halo claro maior que 1,0 cm ao redor da amostra

As fotomicrografias foram realizadas em microscópio óptico marca ZEISS modelo Axioskop, com máquina fotográfica acoplada e filme Kodacolor 100 ASA (Kodac).

---

---

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Teste de Promoção de Crescimento dos Meios de Cultura

Diferentemente de protocolos de testes de eficácia de desinfetante e/ou recomendações de fabricantes de meios de cultura para o cultivo de certos microrganismos, a comprovação da recuperação dos mesmos deve ser devidamente demonstrada (USP, 2008). A composição dos meios de recuperação pode influenciar a contagem de células expostas aos componentes dos agentes de desinfecção/esterilização (RUSSELL et al., 2004). Adicionalmente, a validação de meios de cultura que necessitam de suplementos nutricionais também se torna fundamental, tendo em vista a natureza do isolamento dos espécimes estudados (infecções e fonte ambiental).

Todos os meios de cultura empregados para a avaliação da eficácia de desinfetantes demonstraram condições satisfatórias para a promoção de crescimento dos microrganismos estudados. De semelhante forma, os respectivos meios de cultura também possibilitaram a recuperação dos microrganismos, preservando as características de colônia, mesmo após os testes envolvendo desafios sub-letais, conforme apresentados a seguir.

### 6.2 Avaliação da Eficácia Micobactericida de Desinfetantes (SUTTON et al., 2002; *Environment Protection Agency*, 2006)

Previamente aos testes de verificação de eficácia micobactericida e tuberculocida, é indispensável a avaliação dos agentes neutralizantes, tendo em vista a possibilidade de apresentarem efeito tóxico frente aos microrganismos estudados e/ou de não inativarem devidamente os agentes químicos de desinfecção. Para isto, os agentes neutralizantes empregados nos testes de Suspensão, Presuntivo e Confirmatório foram: Caldo D/E, Sulfito de Sódio (Glutaraldeído, Ácido Peracético e Peróxido de Hidrogênio); Polissorbato–Lecitina (Solução Alcoólica de Digluconato de Clorexidina, Solução Aquosa de Clorexidina e Compostos de Amônio Quaternário) e Polissorbato (Iodo e Fenol). De forma específica, para o Teste

---

---

Confirmatório (com cilindros), foi avaliado o agente neutralizante composto de Soro de Cavalo sem *Mycoplasma* frente a todos os desinfetantes.

Apesar do amplo emprego destes agentes neutralizantes e desinfetantes, destaca-se a originalidade destes estudos e, conseqüentemente, os resultados obtidos para os isolados clínicos do surto e ambulatorial (Belém – PA) e de fonte ambiental (Vitória – ES).

### 6.2.1 Teste de Toxicidade do Agente Neutralizante

Potencial dificuldade encontrada no estudo envolvendo a neutralização química de agentes biocidas é a avaliação da toxicidade. Muitos desses agentes apresentam-se naturalmente tóxicos a alguns microrganismos, sendo os efeitos mais caracteristicamente demonstrados: Biosulfato (bactérias não formadoras de esporos), Glicina (crescimento microbiano), Tioglicolato (*Staphylococcus* spp. e esporos) e Tiosulfato (*Staphylococcus* spp.) (SUTTON et al., 2002). Desta forma, a análise da toxicidade ao agente neutralizante torna-se imprescindível na medida em que a recuperação dos microrganismos se caracteriza como a principal forma de avaliação da eficácia de agentes desinfetantes.

Um neutralizante não deve ser tóxico aos microrganismos e os produtos resultantes da neutralização devem ser comumente não-tóxicos (RUSSELL et al., 2004), sendo que a inocuidade destes agentes devem ser comprovada evitando-se resultados falso-negativos. O critério para aceitação adotado fundamenta-se na porcentagem de recuperação igual ou superior a 70%, requisito imprescindível para a aprovação do agente neutralizante no processo de validação. (BOU-CHACRA; OHARA, 2003; USP 30, 2008).

Neste trabalho, todas as cepas de *Mycobacterium* spp. estudadas se apresentaram robustas ao contato em diferentes tempos de exposição com os diversos agentes neutralizantes, não sendo afetadas de forma significativa pela natureza química dos compostos, conforme demonstrado abaixo. Reduções na contagem final dos microrganismos recuperados estão atreladas à própria limitação e variabilidade da técnica empregada. Em adição, nenhum dos agentes neutralizantes apresentou-se com maior ou menor efeito tóxico e/ou eficácia de

---

neutralização, sendo todos admitidos como agentes seguros e eficazes para serem empregados nos testes de avaliação desinfetante.

#### **6.2.1.1 Caldo Dey/Engley**

Formulado em 1970 pelos cientistas Engley e Dey, este meio de cultura é amplamente empregado para a neutralização de substâncias antissépticas e desinfetantes, principalmente quando amostras ambientais estão envolvidas, sendo recomendado pelo *Compendium for the Microbiological Examination of Foods (American Public Health Association – APHA)*. Apresenta-se com amplo espectro sobre agentes químicos desinfetantes e antissépticos como: mercuriais, iodo, preparações a base de cloro, compostos de amônio quaternário, fenóis, aldeídos etc. (Becton & Dickinson, 2006).

Os resultados apresentados na Tabela 12 apresentam a alta compatibilidade deste agente neutralizante com as cepas de micobactérias submetidas ao desafio, não demonstrando nenhuma redução significativa na contagem dos microrganismos recuperados. Ademais, o fato dos agentes neutralizantes serem amplamente empregados nas indústrias farmacêuticas e cosméticas, não implica que os mesmos se apresentem compatíveis com todas as células microbianas, sendo necessário este tipo de avaliação.

Variavelmente, como para todos os agentes neutralizantes, não houve resultado uniforme na recuperação dos microrganismos quanto à condição de maior ou menor tempo de exposição. Os resultados se apresentaram como acima do limite mínimo preconizado de 70%, em todos os testes, inclusive na avaliação da atividade neutralizante (item 6.2.2).

---

Tabela 12 – Contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias de cepas de *Mycobacterium* spp. antes e após a exposição ao Caldo Dey/Engley por 5, 10, 15 e 20 minutos.

Cepas	Tempos de Exposição (min.)	UFC/mL Inicial	UFC/mL Final
mc <sup>2</sup> 155	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
CCUG 48898	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
MG3-6	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
B67	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
B31	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
INCQS 594	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>

Média de triplicata de amostras.

**Legenda:** mc<sup>2</sup> 155: *Mycobacterium smegmatis* (FIOCRUZ – RJ)  
 CCUG 48898: *Culture Collection University of Göteborg*  
 MG3-6: *M. abscessus* subsp. *bolletii* (Vitória – ES)

### 6.2.1.2 Sulfito de Sódio 0,1%

Este agente, juntamente, com outros sulfitos (Sulfito de Potássio, Sulfito de Amônio, Biosulfito de Sódio, Bissulfito de Amônio, Metabissulfito de Sódio e Metabissulfito de Potássio) são amplamente recomendados pela *Food and Drug Administration* (FDA) para serem empregados em formulações cosméticas. Em testes “*in vivo*” empregando cobaios (camundongos, ratos, hamsters e coelhos) não foram evidenciados efeitos tóxicos ou reações de irritação e sensibilização em testes clínicos para os agentes apresentados acima (NAIR; ELMORE, 2003).

A Tabela 13 apresenta o número de microrganismos recuperados após o contato com este agente neutralizante em diferentes tempos de exposição. Os resultados encontrados para este teste não são compatíveis com a demonstração de toxicidade do agente que poderia ser visualizado com baixa viabilidade/recuperação das células microbianas.

---

Tabela 13 – Contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias de cepas de *Mycobacterium* spp. antes e após a exposição ao Sulfito de Sódio 0,1% por 5, 10, 15 e 20 minutos.

Cepas	Tempos de Exposição (min.)	UFC/mL Inicial	UFC/mL Final
mc <sup>2</sup> 155	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
CCUG 48898	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
MG3-6	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
B67	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
B31	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
INCQS 594	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>

Média de triplicata de amostras.

**Legenda:** mc<sup>2</sup> 155: *Mycobacterium smegmatis* (FIOCRUZ – RJ)  
 CCUG 48898: *Culture Collection University of Göteborg*  
 MG3-6: *M. abscessus* subsp. *bolletii* (Vitória – ES)

**6.2.1.3 Polissorbato 80 0,5% – Lecitina 0,07%**

A combinação entre as substâncias neutralizantes Polissorbato e Lecitina constitui-se um dos sistemas de neutralização de agentes químicos mais empregados na indústria de produtos farmacêuticos e cosméticos, considerando a compatibilidade com vasta gama de microrganismos, quer sejam bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas. Entretanto, em estudo realizado por Sutton e colaboradores (2002), foi demonstrado considerável efeito tóxico da combinação destes agentes frente a cepa de *Escherichia coli* ATCC 11229.

A Tabela 14 apresenta os resultados referentes ao contato entre o agente neutralizante e as cepas de *Mycobacterium* spp., não influenciando a perda/redução da recuperação destas.

---



Tabela 14 – Contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias de cepas de *Mycobacterium* spp. antes e após a exposição ao Polissorbato 80 0,5% – Lecitina 0,07% por 5, 10, 15 e 20 minutos.

Cepas	Tempos de Exposição (min.)	UFC/mL Inicial	UFC/mL Final
mc <sup>2</sup> 155	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
CCUG 48898	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
MG3-6	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
B67	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
B31	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
INCQS 594	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>

Média de triplicata de amostras.

**Legenda:** mc<sup>2</sup> 155: *Mycobacterium smegmatis* (FIOCRUZ – RJ)  
 CCUG 48898: *Culture Collection University of Göteborg*  
 MG3-6: *M. abscessus* subsp. *bolletii* (Vitória – ES)

### 6.2.1.4 Polissorbato 80 0,5%

De semelhante forma ao item anterior, com o emprego de apenas Polissorbato como agente neutralizador também não foi demonstrada nenhuma perda da viabilidade celular das cepas estudadas (Tabela 15).

Tabela 15 – Contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias de cepas de *Mycobacterium* spp. antes e após a exposição ao Polissorbato 80 0,5% por 5, 10, 15 e 20 minutos.

Cepas	Tempos de Exposição (min.)	UFC/mL Inicial	UFC/mL Final
mc <sup>2</sup> 155	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
CCUG 48898	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
MG3-6	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
B67	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
B31	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
INCQS 594	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>

Média de triplicata de amostras.

**Legenda:** mc<sup>2</sup> 155: *Mycobacterium smegmatis* (FIOCRUZ – RJ)  
 CCUG 48898: *Culture Collection University of Göteborg*  
 MG3-6: *M. abscessus* subsp. *bolletii* (Vitória – ES)

**6.2.1.5 Soro de Cavallo**

O emprego de matéria orgânica nos testes envolvendo a eficácia de agentes desinfetantes na dependência da quantidade utilizada, pode se constituir em fator de dificuldade para a avaliação da eficácia dos biocidas estudados, simulando uma situação de pior caso. Entretanto, estes agentes neutralizantes apresentam grande compatibilidade com inúmeros tipos de células e em nossos estudos não apresentou nenhum efeito que se constituísse em redução da viabilidade das cepas de *Mycobacterium* spp., isoladas ou não de surto, conforme apresentadas na Tabela 16.

---

Tabela 16 – Contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias de cepas de *Mycobacterium* spp. antes e após a exposição ao Soro de Cavalo por 5, 10, 15 e 20 minutos.

Cepas	Tempos de Exposição (min.)	UFC/mL Inicial	UFC/mL Final
mc <sup>2</sup> 155	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
CCUG 48898	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
MG3-6	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
B67	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
B31	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
INCQS 594	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>

Média de triplicata de amostras.

**Legenda:** mc<sup>2</sup> 155: *Mycobacterium smegmatis* (FIOCRUZ – RJ)  
 CCUG 48898: *Culture Collection University of Göteborg*  
 MG3-6: *M. abscessus* subsp. *bolletii* (Vitória – ES)

### **6.2.2 Avaliação da Eficácia do Agente Neutralizante**

Como um componente essencial de cada teste para avaliação da eficácia de desinfetantes, a validação da remoção ou neutralização de qualquer resíduo de agente químico torna-se consideravelmente significativa (HUGO; RUSSELL, 2004). Eliminando-se o efeito residual, resultados falso-positivos podem ser evitados. Desta forma, permite-se que, em etapas posteriores, os microrganismos possam ser recuperados devidamente.

Conforme o método descrito por Sutton e colaboradores (2002), a eficácia dos agentes neutralizantes deve ser realizada em diferentes tempos de exposição, de forma semelhante ao estudo de toxicidade. A realização deste teste é recomendada para qualquer agente desinfetante/esterilizante.

Os resultados de eficácia do agente neutralizante Caldo Dey/Engley frente à solução de Glutaraldeído 2%, Ácido Peracético 0,2% e Peróxido de Hidrogênio 35% são apresentados a seguir, nas Tabelas 17, 18 e 19, respectivamente.

---

## 6.2.2.1 Caldo Dey/Engley

## – Glutaraldeído 2%:

Tabela 17 – Contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias de cepas de *Mycobacterium* spp. antes e após a exposição ao Caldo D/E e Glutaraldeído 2% por 5, 10, 15 e 20 minutos.

Cepas	Tempos de Exposição (min.)	UFC/mL Inicial	UFC/mL Final
mc <sup>2</sup> 155	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
CCUG 48898	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
MG3-6	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
B67	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
B31	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
INCQS 594	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>

Média de triplicata de amostras.

**Legenda:** mc<sup>2</sup> 155: *Mycobacterium smegmatis* (FIOCRUZ – RJ)  
 CCUG 48898: *Culture Collection University of Göteborg*  
 MG3-6: *M. abscessus* subsp. *bolletii* (Vitória – ES)

## – Ácido Peracético 0,2%:

Tabela 18 – Contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias de cepas de *Mycobacterium* spp. antes e após a exposição ao Caldo D/E e Ácido Peracético 0,2% por 5, 10, 15 e 20 minutos.

Cepas	Tempos de Exposição (min.)	UFC/mL Inicial	UFC/mL Final
mc <sup>2</sup> 155	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
CCUG 48898	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
MG3-6	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
B67	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
B31	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
INCQS 594	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>

Média de triplicata de amostras.

**Legenda:** mc<sup>2</sup> 155: *Mycobacterium smegmatis* (FIOCRUZ – RJ)  
 CCUG 48898: *Culture Collection University of Göteborg*  
 MG3-6: *M. abscessus* subsp. *bolletii* (Vitória – ES)

## – Peróxido de Hidrogênio 35%:

Tabela 19 – Contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias de cepas de *Mycobacterium* spp. antes e após a exposição ao Caldo D/E e Peróxido de Hidrogênio 35% por 5, 10, 15 e 20 minutos.

Cepas	Tempos de Exposição (min.)	UFC/mL Inicial	UFC/mL Final
mc <sup>2</sup> 155	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
CCUG 48898	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
MG3-6	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
B67	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
B31	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
INCQS 594	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>

Média de triplicata de amostras.

**Legenda:** mc<sup>2</sup> 155: *Mycobacterium smegmatis* (FIOCRUZ – RJ)  
 CCUG 48898: *Culture Collection University of Göteborg*  
 MG3-6: *M. abscessus* subsp. *bolletii* (Vitória – ES)



Estudo realizado por Sutton e colaboradores (2002), demonstrou que a atividade de neutralização do Caldo D/E sobre aldeídos, compostos de amônio quaternário, álcoois, fenóis e compostos a base de cloro foi superior a outros neutralizantes como Caldo AOAC, Caldo Letheen, Caldo de Tioglicolato, Caldo Peptona de Caseína com Polissorbato 20 e Caldo Peptona de Caseína com Polissorbato 80 e Lecitina.

Diante dos resultados apresentados nas Tabelas 17, 18 e 19 e dos obtidos nos estudos de toxicidade (item 6.2.1), o Caldo D/E se constituirá como agente neutralizante para os estudos de avaliação da eficácia de desinfetante (Glutaraldeído, Ácido Peracético e Peróxido de Hidrogênio) em suspensão, empregando estes microrganismos-teste.

---

### **6.2.2.2 Sulfito de Sódio 0,1%**

Anteriormente avaliado como substância não tóxica às cepas de *Mycobacterium* spp. empregadas neste trabalho, o agente constituído de Sulfito de Sódio demonstrou ação neutralizante compatível como os desinfetantes Glutaraldeído, Ácido Peracético e Peróxido de Hidrogênio, nas concentrações propostas pelos fabricantes. Os resultados podem ser observados nas Tabelas 20, 21 e 22, respectivamente.

O agente neutralizante demonstrou eficiente inativação, sendo que também nenhum produto gerado por esta reação inviabilizou a recuperação das células microbianas. O mesmo foi empregado no teste Presuntivo, constituindo-se em composto adicional ao meio de cultura Proskauer-Beck Modificado, envolvendo a inoculação das cepas microbianas em cilindros de porcelana.

---

## – Glutaraldeído 2%:

Tabela 20 – Contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias de cepas de *Mycobacterium* spp. antes e após a exposição ao Sulfito de Sódio 0,1% e Glutaraldeído 2% por 5, 10, 15 e 20 minutos.

Cepas	Tempos de Exposição (min.)	UFC/mL Inicial	UFC/mL Final
mc <sup>2</sup> 155	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
CCUG 48898	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
MG3-6	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
B67	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
B31	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
INCQS 594	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>

Média de triplicata de amostras.

**Legenda:** mc<sup>2</sup> 155: *Mycobacterium smegmatis* (FIOCRUZ – RJ)  
 CCUG 48898: Culture Collection University of Göteborg  
 MG3-6: *M. abscessus* subsp. *bolletii* (Vitória – ES)

## – Ácido Peracético 0,2%:

Tabela 21 – Contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias de cepas de *Mycobacterium* spp. antes e após a exposição ao Sulfito de Sódio 0,1% e Ácido Peracético 0,2% por 5, 10, 15 e 20 minutos.

Cepas	Tempos de Exposição (min.)	UFC/mL Inicial	UFC/mL Final
mc <sup>2</sup> 155	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
CCUG 48898	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
MG3-6	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
B67	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
B31	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
INCQS 594	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>

Média de triplicata de amostras.

**Legenda:** mc<sup>2</sup> 155: *Mycobacterium smegmatis* (FIOCRUZ – RJ)  
 CCUG 48898: *Culture Collection University of Göteborg*  
 MG3-6: *M. abscessus* subsp. *bolletii* (Vitória – ES)

## – Peróxido de Hidrogênio 35%:

Tabela 22 – Contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias de cepas de *Mycobacterium* spp. antes e após a exposição ao Sulfito de Sódio 0,1% e Peróxido de Hidrogênio 35% por 5, 10, 15 e 20 minutos.

Cepas	Tempos de Exposição (min.)	UFC/mL Inicial	UFC/mL Final
mc <sup>2</sup> 155	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
CCUG 48898	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
MG3-6	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
B67	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
B31	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
INCQS 594	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>

Média de triplicata de amostras.

**Legenda:** mc<sup>2</sup> 155: *Mycobacterium smegmatis* (FIOCRUZ – RJ)  
 CCUG 48898: Culture Collection University of Göteborg  
 MG3-6: *M. abscessus* subsp. *bolletii* (Vitória – ES)

A inexistência de agente neutralizante universal para os diferentes tipos e concentrações de desinfetantes, torna os testes de avaliação de eficácia microbida bastante oneroso e moroso. Ademais, falhas nos procedimentos envolvendo manipulação e manutenção da temperatura dos tubos pode possibilitar tanto o incremento de carga microbiana adicional (contaminação), quanto à exibição aumentada da ação microbida durante o teste, resultando na ineficácia do agente neutralizante.

### **6.2.2.3 Polissorbato 80 0,5% – Lecitina de Soja 0,07%**

Estes agentes estão presentes em meios de cultura recomendados para detecção e enumeração de microrganismos presentes em superfícies de importância sanitária. De semelhante forma, placas RODAC (*Replicate Organism Detection and Counting*) contendo estes agentes são empregadas para monitoramento de superfícies de áreas limpas, sistemas de Isoladores e outras áreas com controle ambiental. Quanto à função, estes agentes destinam-se à inativação de residuais de desinfetantes quando as amostras estão sendo coletadas.

Os resultados de eficácia do agente neutralizante frente à Solução Alcoólica de Digluconato de Clorexidina 0,5% são apresentados a seguir (Tabela 23). O Polissorbato apresentou eficácia neutralizante também para o álcool presente na formulação. Resultados semelhantes foram encontrados por Kampf e colaboradores (2005) ao avaliarem o efeito de agente neutralizante constituído de Polissorbato 20 4% e Lecitina 4%. Os resultados também demonstraram ausência de efeito tóxico sobre cepa padrão de *E. coli* (ACTT 11229).

---

Tabela 23 – Contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias de cepas de *Mycobacterium* spp. antes e após a exposição ao Polissorbato 80 0,5% – Lecitina 0,07% e Solução Alcoólica de Digluconato de Clorexidina 0,5% por 5, 10, 15 e 20 minutos.

Cepas	Tempos de Exposição (min.)	UFC/mL Inicial	UFC/mL Final
mc <sup>2</sup> 155	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
CCUG 48898	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
MG3-6	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
B67	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
B31	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
INCQS 594	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>

Média de triplicata de amostras.

**Legenda:** mc<sup>2</sup> 155: *Mycobacterium smegmatis* (FIOCRUZ – RJ)  
 CCUG 48898: *Culture Collection University of Göteborg*  
 MG3-6: *M. abscessus* subsp. *bolletii* (Vitória – ES)

De semelhante forma, a Tabela 24 apresenta a eficácia neutralizante de Solução Aquosa contendo Clorexidina 0,2%.

Tabela 24 – Contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias de cepas de *Mycobacterium* spp. antes e após a exposição ao Polissorbato 80 0,5% – Lecitina 0,07% e Solução Aquosa de Clorexidina 0,2% por 5, 10, 15 e 20 minutos.

Cepas	Tempos de Exposição (min.)	UFC/mL Inicial	UFC/mL Final
mc <sup>2</sup> 155	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
CCUG 48898	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
MG3-6	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
B67	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
B31	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
INCQS 594	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>

Média de triplicata de amostras.

**Legenda:** mc<sup>2</sup> 155: *Mycobacterium smegmatis* (FIOCRUZ – RJ)  
 CCUG 48898: *Culture Collection University of Göteborg*  
 MG3-6: *M. abscessus* subsp. *bolletii* (Vitória – ES)



Apesar de apresentar pouca ou nenhuma atividade sobre micobactérias, a solução contendo Compostos de Amônio Quaternário se constitui em fator comparativo para os demais desinfetantes químicos que podem apresentar alterações na atividade frente à cepas de isolados clínicos, por exemplo. Os resultados de eficácia do agente neutralizante (Polissorbato 80 0,5% – Lecitina 0,07%) frente à solução de Compostos de Amônio Quaternário são apresentados a seguir (Tabela 25). Weber e Black (1948) já recomendavam o uso de lecitina como agente neutralizante para este agente desinfetante (RUSSELL et al., 2004).

A busca por um agente neutralizante ideal (SUTTON et al., 2002), para os testes envolvendo suspensões, torna-se pertinente na medida em que a toxicidade inerente ao desinfetante é mais evidenciada do que nos testes empregando cilindros, sejam eles de vidro, metal ou porcelana.

---

Tabela 25 – Contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias de cepas de *Mycobacterium* spp. antes e após a exposição ao Polissorbato 80 0,5% – Lecitina 0,07% e Compostos de Amônio Quaternário 1,2% por 5, 10, 15 e 20 minutos.

Cepas	Tempos de Exposição (min.)	UFC/mL Inicial	UFC/mL Final
mc <sup>2</sup> 155	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
CCUG 48898	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
MG3-6	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
B67	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
B31	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
INCQS 594	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>

Média de triplicata de amostras.

**Legenda:** mc<sup>2</sup> 155: *Mycobacterium smegmatis* (FIOCRUZ – RJ)  
 CCUG 48898: *Culture Collection University of Göteborg*  
 MG3-6: *M. abscessus* subsp. *bolletii* (Vitória – ES)

**6.2.2.4 Polissorbato 80 0,5%**

A solução de Fenol apresenta alta atividade sobre diferentes microrganismos, inclusive as micobactérias, conforme apresentado no item 2.3. A possibilidade de efeito residual deste agente poderia se constituir em vantagem frente a aglomerados microbianos, uma vez que a resistência destes está relacionada à baixa penetração e manutenção dos agentes químicos de desinfecção/esterilização na organização física dos biofilmes.

Os resultados de eficácia do agente neutralizante frente à solução de Fenol 5% são apresentados a seguir (Tabela 26). A recuperação da população microbiana após o teste foi superior a 70%.

---

Tabela 26 – Contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias de cepas de *Mycobacterium* spp. antes e após a exposição ao Polissorbato 80 0,5% e Fenol 5% por 5, 10, 15 e 20 minutos.

Cepas	Tempos de Exposição (min.)	UFC/mL Inicial	UFC/mL Final
mc <sup>2</sup> 155	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
CCUG 48898	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
MG3-6	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
B67	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
B31	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
INCQS 594	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>

Média de triplicata de amostras.

**Legenda:** mc<sup>2</sup> 155: *Mycobacterium smegmatis* (FIOCRUZ – RJ)  
 CCUG 48898: *Culture Collection University of Göteborg*  
 MG3-6: *M. abscessus* subsp. *bolletii* (Vitória – ES)

Os resultados de eficácia do agente neutralizante frente à solução de lodo são apresentados a seguir (Tabela 27), onde foram evidenciadas completa inativação deste e, conseqüentemente, recuperação da população microbiana inicial dentro dos critérios preconizados para este teste.

Tabela 27 – Contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias de cepas de *Mycobacterium* spp. antes e após a exposição ao Polissorbato 80 0,5% e lodo 1% por 5, 10, 15 e 20 minutos.

Cepas	Tempos de Exposição (min.)	UFC/mL Inicial	UFC/mL Final
mc <sup>2</sup> 155	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
CCUG 48898	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
MG3-6	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
B67	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
B31	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
INCQS 594	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>

Média de triplicata de amostras.

**Legenda:** mc<sup>2</sup> 155: *Mycobacterium smegmatis* (FIOCRUZ – RJ)  
 CCUG 48898: *Culture Collection University of Göteborg*  
 MG3-6: *M. abscessus* subsp. *bolletii* (Vitória – ES)

Embora pouco empregada como agente desinfetante de artigos médico-hospitalares, esta substância possui ampla difusão e aplicabilidade na desinfecção de superfícies bióticas, principalmente, em procedimentos ambulatoriais e cirúrgicos.

#### **6.2.2.5 Soro de Cavalo**

Preconizado para ser empregado na inativação de diferentes agentes desinfetantes no Teste Confirmatório de Eficácia Tuberculocida, o Soro de Cavalo também poderia ser empregado no Teste Presuntivo de Eficácia Micobactericida, Teste de Eficácia Micobactericida em Suspensão e Teste de Eficácia Micobactericida frente a Biofilmes. Entretanto, este apresenta limitação de emprego devido ao seu alto custo e ampla probabilidade de contaminação.

Os dados apresentados nas Tabelas 28 a 35 apresentam a eficácia deste agente neutralizante, vista na recuperação das células microbianas estudadas.

---

Tabela 28 – Contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias de cepas de *Mycobacterium* spp. antes e após a exposição ao Soro de Cavalo e Glutaraldeído 2% por 5, 10, 15 e 20 minutos.

Cepas	Tempos de Exposição (min.)	UFC/mL Inicial	UFC/mL Final
mc <sup>2</sup> 155	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
CCUG 48898	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
MG3-6	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
B67	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
B31	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
INCQS 594	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>

Média de triplicata de amostras.

**Legenda:** mc<sup>2</sup> 155: *Mycobacterium smegmatis* (FIOCRUZ – RJ)  
 CCUG 48898: *Culture Collection University of Göteborg*  
 MG3-6: *M. abscessus* subsp. *bolletii* (Vitória – ES)

Poucos estudos referentes a testes de toxicidade e neutralização são encontrados em literaturas científicas. Muitos argumentos alegam o amplo e consolidado emprego dos mesmos. Entretanto, a necessidade de realização de tais estudos é suportada, principalmente, pela variabilidade: das células microbianas, mesmo sendo cepas da mesma espécie; inter-laboratorial, mesmo com o

cumprimento e atendimento a todas as variáveis e condições do processo; interpretação dos resultados, dentre outras (SUTTON et al., 2002).

Tabela 29 – Contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias de cepas de *Mycobacterium* spp. antes e após a exposição ao Soro de Cavalos e Ácido Peracético 0,2% por 5, 10, 15 e 20 minutos.

Cepas	Tempos de Exposição (min.)	UFC/mL Inicial	UFC/mL Final
mc <sup>2</sup> 155	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
CCUG 48898	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
MG3-6	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
B67	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
B31	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
INCQS 594	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>

Média de triplicata de amostras.

**Legenda:** mc<sup>2</sup> 155: *Mycobacterium smegmatis* (FIOCRUZ – RJ)  
 CCUG 48898: *Culture Collection University of Göteborg*  
 MG3-6: *M. abscessus* subsp. *bolletii* (Vitória – ES)



Tabela 30 – Contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias de cepas de *Mycobacterium* spp. antes e após a exposição ao Soro de Cavalo e Peróxido de Hidrogênio 35% por 5, 10, 15 e 20 minutos.

Cepas	Tempos de Exposição (min.)	UFC/mL Inicial	UFC/mL Final
mc <sup>2</sup> 155	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
CCUG 48898	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
MG3-6	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
B67	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
B31	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
INCQS 594	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>

Média de triplicata de amostras.

**Legenda:** mc<sup>2</sup> 155: *Mycobacterium smegmatis* (FIOCRUZ – RJ)  
 CCUG 48898: *Culture Collection University of Göteborg*  
 MG3-6: *M. abscessus* subsp. *bolletii* (Vitória – ES)

Tabela 31 – Contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias de cepas de *Mycobacterium* spp. antes e após a exposição ao Soro de Cavalos e Solução Alcoólica de Digluconato de Clorexidina 0,5% por 5, 10, 15 e 20 minutos.

Cepas	Tempos de Exposição (min.)	UFC/mL Inicial	UFC/mL Final
mc <sup>2</sup> 155	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
CCUG 48898	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
MG3-6	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
B67	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
B31	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
INCQS 594	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>

Média de triplicata de amostras.

**Legenda:** mc<sup>2</sup> 155: *Mycobacterium smegmatis* (FIOCRUZ – RJ)  
 CCUG 48898: *Culture Collection University of Göteborg*  
 MG3-6: *M. abscessus* subsp. *bolletii* (Vitória – ES)

Tabela 32 – Contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias de cepas de *Mycobacterium* spp. antes e após a exposição ao Soro de Cavalo e Solução Aquosa de Clorexidina 0,2% por 5, 10, 15 e 20 minutos.

Cepas	Tempos de Exposição (min.)	UFC/mL Inicial	UFC/mL Final
mc <sup>2</sup> 155	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
CCUG 48898	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
MG3-6	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
B67	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
B31	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
INCQS 594	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>

Média de triplicata de amostras.

**Legenda:** mc<sup>2</sup> 155: *Mycobacterium smegmatis* (FIOCRUZ – RJ)  
 CCUG 48898: *Culture Collection University of Göteborg*  
 MG3-6: *M. abscessus* subsp. *bolletii* (Vitória – ES)

Tabela 33 – Contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias de cepas de *Mycobacterium* spp. antes e após a exposição ao Soro de Cavalo e Compostos de Amônio Quaternário 1,2% por 5, 10, 15 e 20 minutos.

Cepas	Tempos de Exposição (min.)	UFC/mL Inicial	UFC/mL Final
mc <sup>2</sup> 155	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
CCUG 48898	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
MG3-6	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
B67	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
B31	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
INCQS 594	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>

Média de triplicata de amostras.

**Legenda:** mc<sup>2</sup> 155: *Mycobacterium smegmatis* (FIOCRUZ – RJ)  
 CCUG 48898: *Culture Collection University of Göteborg*  
 MG3-6: *M. abscessus* subsp. *bolletii* (Vitória – ES)

Tabela 34 – Contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias de cepas de *Mycobacterium* spp. antes e após a exposição ao Soro de Cavalos e lodo 1% por 5, 10, 15 e 20 minutos.

Cepas	Tempos de Exposição (min.)	UFC/mL Inicial	UFC/mL Final
mc <sup>2</sup> 155	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
CCUG 48898	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
MG3-6	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
B67	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
B31	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
INCQS 594	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>

Média de triplicata de amostras.

**Legenda:** mc<sup>2</sup> 155: *Mycobacterium smegmatis* (FIOCRUZ – RJ)  
 CCUG 48898: *Culture Collection University of Göteborg*  
 MG3-6: *M. abscessus* subsp. *bolletii* (Vitória – ES)

Tabela 35 – Contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias de cepas de *Mycobacterium* spp. antes e após a exposição ao Soro de Cavalos e Fenol 5% por 5, 10, 15 e 20 minutos.

Cepas	Tempos de Exposição (min.)	UFC/mL Inicial	UFC/mL Final
mc <sup>2</sup> 155	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
CCUG 48898	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
MG3-6	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
B67	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
B31	5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
INCQS 594	5	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>
	10	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	15	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
	20	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>

Média de triplicata de amostras.

**Legenda:** mc<sup>2</sup> 155: *Mycobacterium smegmatis* (FIOCRUZ – RJ)  
 CCUG 48898: *Culture Collection University of Göteborg*  
 MG3-6: *M. abscessus* subsp. *bolletii* (Vitória – ES)

Os resultados obtidos neste trabalho não evidenciaram quaisquer impedimentos, sejam em testes de toxicidade ou de eficácia neutralizante, para o emprego destas substâncias como agentes químicos de neutralização. Os testes de validação cumprem com os requisitos de Controle de Qualidade Laboratorial necessários para que os testes posteriores (Eficácia Micobactericida e Tuberculocida) apresentem resultados seguros e confiáveis.

### 6.2.3 Avaliação da Eficácia Micobactericida – Teste Quantitativo

A avaliação da susceptibilidade de cada uma das seis cepas estudadas, em suspensão, foi obtida através do Tempo de Redução Decimal (*Valor D*) (Enumeração Direta) frente aos oito agentes químicos (Glutaraldeído, Ácido Peracético, Peróxido de Hidrogênio, Digluconato de Clorexidina, Clorexidina, Compostos de Amônio Quaternário, Iodo e Fenol), tornando possíveis as comparações quanto à susceptibilidade frente a estes agentes (Tabela 36).

Apresentado em minutos, os resultados deste teste permitem inferir o tempo total de inativação dos microrganismos ao multiplicar o *valor D* encontrado (por exemplo: 0,30, 0,61 ou 0,90 minutos) pelo número de ciclos logarítmicos da população inicialmente ensaiada ( $1,2 \times 10^7 = 7$  ciclos log). Entretanto, apesar de muitos resultados apresentarem valor reduzido, não é possível determinar seguramente que o microrganismo será inativado no tempo total encontrado (2,10, 4,27 ou 6,3 minutos), uma vez que os organismos expostos a agentes letais não morrem todos simultaneamente – o seu número decresce exponencialmente com o tempo de exposição, sendo que a ausência total dos microrganismos viáveis somente ocorrerá em tempo infinito de exposição ao agente (PINTO et al., 2000).

---

Tabela 36 – Tempo de Redução Decimal, em minutos, das espécies de micobactérias isoladas de surto e fonte ambiental frente a desinfetantes químicos distintos.

Cepas	Agentes Químicos							
	GLT	APE	PEH	DCL	CLX	QAC	IOD	FEN
mc <sup>2</sup> 155	0,30	0,30	0,30	70,13	73,40	79,84	72, 11	0,30
CCUG 48898	1,01	0,30	0,30	72,72	79,34	85,62	77, 36	0,30
MG3-6	2,85	0,30	0,30	115,07	125,15	125,45	106, 43	0,30
B67	0,98	0,30	0,30	95,44	100,96	105, 06	99, 86	0,30
B31	5,49	0,61	0,90	119,38	133,73	163,73	111, 27	0,57
INCQS 594	5,26	0,61	0,92	122,21	163,53	159, 94	115, 69	0,55

**Legenda:** GLT: Glutaraldeído 2%  
 APE: Ácido Peracético 0,2%  
 PEH: Peróxido de Hidrogênio 35%  
 DCL: Digluconato de Clorexidina 0,5%  
 CLX: Clorexidina 0,2%  
 QAC: Compostos de Amônio Quaternário 1,2%  
 IOD: Iodo 1%  
 FEN: Fenol 5%  
 mc<sup>2</sup> 155: *M. smegmatis* (FIOCRUZ – RJ)  
 CCUG 48898: *Culture Collection University of Göteborg*  
 MG3-6: *M. abscessus* subsp. *bolletii* (Vitória – ES)

As cepas-padrão de referência *M. smegmatis* (mc<sup>2</sup> 155), *M. massiliense* (CCUG 48898) e cepa *M. abscessus* subsp. *bolletii* não-surto (B67) apresentaram-se mais susceptíveis aos agentes desinfetantes: Glutaraldeído, Ácido Peracético, Peróxido de Hidrogênio e Fenol. A ocorrência de mesma redução pode ser factível em tempos menores de exposição, tendo em vista o pequeno valor de redução decimal obtido (0,30 minutos). Quando considerado os demais agentes testados, estas cepas também demonstraram valores *D* menores que os demais. Quanto às cepas isoladas do surto ocorrido em Belém (B31 e INCQS 594) e de fonte ambiental (MG3-6), a análise dos dados obtidos frente a Glutaraldeído, Ácido Peracético, Peróxido de Hidrogênio e Fenol revelou que estas cepas também eram susceptíveis a estes agentes, mas com valores *D* superiores aos das cepas padrão e não surto, sendo que o Glutaraldeído demonstrou redução logarítmica acima de 2 minutos, sugerindo resistência intermediária e alta para a concentração desta solução, amplamente empregada na desinfecção de materiais médico-hospitalares. Este valor



---

poderá ser confrontado com os resultados obtidos para os testes empregando cilindros de porcelana como suporte (Presuntivo e Confirmatório), onde o Glutaraldeído apresentou-se ineficaz na eliminação destas cepas.

De semelhante forma, Best e colaboradores (1998) avaliaram a cepa *M. smegmatis* TCM 1515 veiculada em suporte de metal, vidro e polipropileno e em suspensão, frente a solução de Glutaraldeído 2% e este apresentou-se altamente eficaz, reduzindo a população microbiana em 6 ciclos logarítmicos (99,9999%), após um minuto de contato.

Apesar dos resultados encontrados, o Glutaraldeído, por sua vez, apresenta grande eficácia na inativação de espécies do gênero *Mycobacterium* (RUSSELL, 1982; FRAUD et al., 2001). Entretanto, a variação da resistência entre as cepas demonstra a diversidade de perfis de susceptibilidade frente a este desinfetante. Adicionalmente, a verificação da real resistência das cepas por este método só poderá ser demonstrada caso permaneçam viáveis frente a Teste de Eficácia Tuberculocida, quando realizados frente à *M. bovis* cepa BCG Moreau (AOAC, 1988).

Fraud e colaboradores (2001) avaliaram a resistência intrínseca de cepas de *M. chelonae* isoladas de recipientes para desinfecção de endoscópios contendo solução de Glutaraldeído 2%. A resistência aumentada foi obtida empregando Glutaraldeído 0,5% na presença de 3 g/L de Soro Bovino, quando não foram observadas reduções logarítmicas (< 1 redução) em 60 minutos de exposição ao agente.

Atividade biocida semelhante entre Glutaraldeído 2% (Cidex<sup>®</sup>) e Ácido Peracético 1,6% (Perasafe<sup>®</sup>) foi demonstrada por Vizcaino-Alcaide e colaboradores (2003) quando os desafiaram contra cepas-padrão de: *Mycobacterium fortuitum*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter anitratus*, *Candida albicans* e esporos de *Bacillus subtilis* em suspensão e inoculados em suporte metálico e em endoscópio. Entretanto, não foi avaliada a atividade biocida destes agentes frente a isolados clínicos.

Angelillo e colaboradores (1998) avaliaram o efeito biocida entre Glutaraldeído 2% (Asporin<sup>®</sup>) e Peróxido de Hidrogênio 1% (Virkon<sup>®</sup>) frente a *S. aureus* (ATCC

---

---

6538 e AB30), *P. aeruginosa* (ATCC 15442), *Serratia marcescens* (ATCC 8100) e *C. albicans* (ATCC 10231) inoculados em instrumentos odontológicos. Os resultados demonstraram atividade do Glutaraldeído em menos de 1 minuto de exposição, enquanto que para o Virkon® este tempo foi superior a 15 minutos.

Por outro lado, quando em sistemas de biofilme, em presença de matéria orgânica e/ou aderida em uma superfície, espera-se que inúmeras cepas de micobactérias se apresentem como formas bacterianas potencialmente resistentes a agentes desinfetantes. Considerando algumas características inerentes a esses microrganismos como, por exemplo, a constituição de parede e a capacidade de agregação celular que também são visualizadas em biofilmes, somados a questões que facilitam a sua disseminação, as micobactérias podem apresentar-se como agentes altamente infecciosos.

Considerando apenas a solução de Peróxido de Hidrogênio 32%, este mostrou-se efetivo na redução de teores de endotoxina de *E. coli* (despirogenização) inoculadas em substrato polimérico (policarbonato), simulando produtos destinados a área médico-hospitalar (PINTO, 1995).

Dentre os resultados que demonstraram ineficácia na inativação das cepas de *Mycobacterium*, destacam-se os altos valores *D* de Solução Alcoólica de Digluconato de Clorexidina, Solução Aquosa de Clorexidina, Compostos de Amônio Quaternário e Iodo frente às cepas do surto B31 (119,38 min., 159,94 min., 163,73 min. e 111,27 min.) e INCQS 594 (122,21 min., 163,53 min., 133,94 min. e 115,69 min.), respectivamente. Apesar de serem considerados agentes biocidas, Clorexidina e Compostos de Amônio Quaternário apresentam-se como micobacteriostáticos, mesmo quando empregados em altas concentrações (MCDONNELL; RUSSELL, 1999). O emprego destas substâncias constitui-se em risco elevado em qualquer procedimento que requer redução de carga microbiana de cepas de *Mycobacterium* spp.. Estes ativos podem se apresentar efetivos em concentrações superiores, entretanto, não recomendamos sua utilização nestas circunstâncias. Em estudo realizado por Tiwari e colaboradores (2003), foi demonstrado a ineficácia de cloreto de benzalcônio (Compostos de Amônio Quaternário) frente a cepa de *M. abscessus* isolada de 10 pacientes submetidos a terapia intra-articular e periarticular para artrite e artralgia. Mesmo sendo substituído pelo *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), em 1975, quatro anos após o primeiro caso, o uso frequente deste agente

---

ainda foi constatado pelos pesquisadores, o que possibilitou a ocorrência de novos surtos de infecção.

Experimentos realizados com as seis cepas em sistemas de biofilmes trazem informações adicionais, como visualizados no item 6.5. Estes, por sua vez, poderão fornecer maiores informações quanto à resistência desses microrganismos visto que, a maioria das espécies de bactérias se apresenta distribuída na natureza e contaminando materiais, superfícies etc. na forma de aglomerados celulares, interagindo com diferentes organismos e até mesmo com a matéria orgânica (RUSSELL, 1998).

Apesar da suspensão da esterilização química por imersão, utilizando agentes esterilizantes líquidos para o instrumental cirúrgico e produtos para saúde (RDC 8, 2009), em todo o país, não é possível avaliar a eficácia destas medidas quanto à redução do surto, uma vez que, não foram divulgadas informações sobre o número de pacientes infectados no ano de 2009. Adicionalmente, também não foram divulgados os dados referentes ao estudo validado de eficácia do glutaraldeído na esterilização de instrumentos hospitalares, especificamente em relação a *M. abscessus* subsp. *bolletii* encomendada à Fundação Ezequiel Dias (BH), pela ANVISA, o que poderia suplementar as medidas para o controle de surtos envolvendo o processamento de matérias médico-hospitalares.

Após dois anos do surto de infecções por Micobactérias de Crescimento Rápido (2006-2008), foram registrados pela ANVISA 78 novos casos suspeitos de contaminação após procedimentos de videoscopia, sendo estes nos estados do Amazonas e Rio Grande do Sul. Embora careça de maiores informações, esta situação sugere a falta de cumprimento às normas para processamento de materiais médico-hospitalares (limpeza, desinfecção, esterilização, acondicionamento e distribuição) e expõe a deficiência de um sistema para controle de surtos e infecções adversas no país (O Estado de São Paulo, 2010).

Após a emissão de medidas para contenção do surto, realizadas pela Anvisa, evidências de limitações no funcionamento dos Centros de Material e Esterilização puderam ser observadas. O descumprimento das normas de uso dos produtos desinfetantes/esterilizantes, atrelado à falta de registros e validações dos processos de limpeza, desinfecção e esterilização dos instrumentais cirúrgicos pode, de fato,

---

ter contribuído para o aumento no número de casos. Apesar da obrigatoriedade de uma Comissão de Controle de Infecção, em cada unidade hospitalar, aquelas de natureza privada ainda detêm a maior aderência e cumprimento às determinações governamentais, embora muitos dos casos de infecção por MCR tenham ocorrido em clínicas particulares.

### **6.3 Método Presuntivo para Avaliação da Atividade Micobactericida de Desinfetantes (AOAC, 1988)**

#### **6.3.1 Avaliação da Eficácia Micobactericida**

Conforme legislação vigente (BRASIL, 1988a), para ser comercializado, o desinfetante deverá apresentar eficácia de inativação microbiana nos 20 cilindros utilizados no teste. Triplicatas de amostras (60 cilindros) foram realizadas, a fim de aumentar a confiabilidade dos resultados do teste, tendo em vista a complexidade e abrangência das infecções envolvendo estas bactérias na promoção de surtos infecciosos, em todo o Brasil.

Segundo a norma supracitada, a exibição de crescimento microbiano derivado de apenas um (01) cilindro reprova o desinfetante no teste e, conseqüentemente, seu registro e comercialização são restringidos no país para a inativação de determinados microrganismos. Desta forma, agravantes podem surgir quando há suspeita de contaminação por *M. abscessus* subsp. *bolletii* ou outras MCR, principalmente, se considerarmos aquelas cuja resistência à desinfetantes químicos se assemelha às cepas isoladas do surto ocorrido em Belém (B31 e INCQS 594). Neste caso, não se recomenda o emprego destes desinfetantes.

Os resultados obtidos para o teste empregando as seis cepas microbianas aderidas a suporte de porcelana são apresentados na Tabela 37, onde foram realizados testes com 60 cilindros. O fornecimento de dados que comprovem a eficácia do desinfetante quando os microrganismos se apresentam aderidos a uma superfície permite inferir que, uma vez sob condições reais de uso, em ambientes hospitalares, Ácido Peracético 0,2%, Peróxido de Hidrogênio 35% e Fenol 5%

---

podem se apresentar eficazes na inativação destes microrganismos. Entretanto, nesta situação, o emprego do Fenol não é factível.

Tabela 37 – Teste Presuntivo de Eficácia Micobactericida frente a espécies de micobactérias isoladas de surto e fonte ambiental.

Cepas	Agentes Químicos							
	GLT	APE	PEH	DCL	CLX	QAC	IOD	FEN
mc <sup>2</sup> 155	0/60	0/60	0/60	56/60	60/60	60/60	58/60	0/60
CCUG 48898	0/60	0/60	0/60	58/60	60/60	60/60	60/60	0/60
MG3-6	58/60	0/60	0/60	58/60	58/60	60/60	58/60	0/60
B67	0/60	0/60	0/60	58/60	60/60	60/60	60/60	0/60
B31	60/60	0/60	0/60	60/60	60/60	60/60	60/60	0/60
INCQS 594	60/60	0/60	0/60	60/60	60/60	60/60	60/60	0/60

**Legenda:** GLT: glutaraldeído 2%  
 APE: ácido peracético 0,2%  
 PEH: peróxido de hidrogênio 35%  
 DCL: digluconato de clorexidina 0,5%  
 CLX: clorexidina 0,2%  
 QAC: compostos de amônio quaternário 1,2%  
 IOD: iodo 1%  
 FEN: fenol 5%  
 mc<sup>2</sup> 155: *M. smegmatis* (FIOCRUZ – RJ)  
 CCUG: *Culture Collection University of Göteborg*  
 MG3-6: *M. abscessus* subsp. *bolletii* (Vitória – ES)

Preocupações concernentes ao envolvimento do Glutaraldeído 2% e das cepas isoladas nos surtos de infecções no país (B31 e INCQS 594), podem encontrar certas explicações nesses resultados. Embora, muitas falhas possam ser aventadas a este método de avaliação de eficácia bactericida, sendo que muitas alterações já foram sugeridas às autoridades competentes para sua reformulação/adequação, ainda assim permanece como aquele preconizado e aceito por instituições sanitárias.

Embora amplamente empregado na desinfecção de artigos médico-hospitalares, a ineficácia do agente à base de Glutaraldeído foi nitidamente encontrada para as cepas isoladas do surto e de fonte ambiental. A atividade do Glutaraldeído assemelhou-se àquelas obtidas pelos desinfetantes com atividade

---

micobacteriostática (Clorexidina e Compostos de Amônio Quaternário), ou seja, as cepas apresentaram-se altamente resistentes a sua exposição.

A proibição do uso do Glutaraldeído em caráter cautelar e, posteriormente emergencial, não permitiu que alternativas fossem estudadas, senão a substituição imediata pelo Ácido Peracético, embora também não houvesse qualquer teste que comprovasse sua eficácia frente às cepas do surto, na ocasião.

Apesar destas e outras medidas, a continuidade da ocorrência de surtos de infecção torna-se bastante factível, tendo em vista que o processo de diagnóstico da doença e a notificação compulsória apresentam-se como variáveis limitantes em um Sistema de Saúde ainda carente de medidas efetivas de controle.

Os testes apresentados a seguir (item 6.4) confirmam a ausência de atividade do Glutaraldeído 2%, sendo que agora o termo tuberculocida apresenta-se como norteador da caracterização da eficácia dos agentes desinfetantes.

#### **6.4 Método Confirmatório para Avaliação da Atividade Tuberculocida de Desinfetantes (AOAC, 1988)**

##### **6.4.1 Avaliação da Eficácia Tuberculocida**

Para a demonstração de eficácia tuberculocida, o agente desinfetante foi submetido a teste confirmatório empregando *M. bovis* cepa BCG Moreau, como padrão de referência em 10 cilindros de porcelana, conforme item 5.2.7. De forma semelhante ao Teste Presuntivo, também foram realizadas triplicatas de amostras, totalizando 30 cilindros para cada cepa e cada desinfetante. A eficácia deverá ser demonstrada com a inativação de toda a carga do microrganismo presente e nenhum tubo deverá exibir crescimento.

Após o período de incubação de 60 dias, não foi evidenciado nenhum crescimento para os tubos-teste contendo *M. bovis* cepa BCG Moreau (Tabela 38), quando empregados os desinfetantes Glutaraldeído, Ácido Peracético, Peróxido de Hidrogênio e Fenol, podendo ser considerados agentes tuberculocidas. Entretanto, a exibição de crescimento desta cepa pode ser visualizada para os demais agentes

---

desinfetantes, não sendo recomendado seu emprego onde existe a necessidade de inativação de *M. tuberculosis* (BELLO-GONZALEZ et al., 2008).

Tabela 38 – Teste Confirmatório de Eficácia Tuberculocida frente a espécies de micobactérias isoladas de surto e fonte ambiental.

Cepas	Agentes Químicos							
	GLT	APE	PEH	DCL	CLX	QAC	IOD	FEN
BGC Moreau	0/30	0/30	0/30	30/30	30/30	30/30	30/30	0/30
mc <sup>2</sup> 155	0/30	0/30	0/30	28/30	30/30	30/30	30/30	0/30
CCUG 48898	0/30	0/30	0/30	30/30	30/30	30/30	30/30	0/30
MG3-6	30/30	0/30	0/30	30/30	30/30	30/30	30/30	0/30
B67	0/30	0/30	0/30	30/30	30/30	30/30	30/30	0/30
B31	30/30	0/30	0/30	30/30	30/30	30/30	30/30	0/30
INCQS 594	30/30	0/30	0/30	30/30	30/30	30/30	30/30	0/30

**Legenda:** GLT: glutaraldeído 2%  
 APE: ácido peracético 0,2%  
 PEH: peróxido de hidrogênio 35%  
 DCL: digluconato de clorexidina 0,5%  
 CLX: clorexidina 0,2%  
 QAC: composto de amônio quaternário 1,2%  
 IOD: iodo 1%  
 FEN: fenol 5%  
 BCG: *Bacillus Calmette-Guerin*  
 mc<sup>2</sup> 155: *M. smegmatis* (FIOCRUZ – RJ)  
 CCUG 48898: *Culture Collection University of Göteborg*  
 MG3-6: *M. abscessus* subsp. *bolletii* (Vitória – ES)

Apesar da solução de Glutaraldeído 2% demonstrar inativação de *M. bovis* cepa BCG Moreau, o que lhe confere, normativamente, o caráter tuberculocida, o mesmo não pode ser caracterizado como agente micobactericida, tendo em vista o resultado de eficácia frente às cepas isoladas do surto (B31 e INCQS 594) e fonte ambiental (MG3-6).

Outro impasse encontrado para o surto de MCR, especificamente envolvendo cepas de *M. abscessus* subsp. *bolletii*, no Brasil, foi o mecanismo de aquisição da infecção pelos pacientes atrelada à amplitude de disseminação em diferentes

---

hospitais do país. Muitas hipóteses foram aventadas e dentre as principais, destacam-se: desinfetantes contaminados, ineficácia inerente ao Glutaraldeído, erros de manipulação do Glutaraldeído, erros na desinfecção dos artigos médico-hospitalares, reutilização de material de uso único etc. Estas, por sua vez, apresentam-se com ampla probabilidade de comprovação. Entretanto, quanto à disseminação desses microrganismos outras hipótese foram sugeridas, porém carecem de dados e ferramentas para qualquer comprovação conclusiva.

A Polícia Civil do Estado do Espírito Santo, no dia 22 de julho deste ano, indiciou seis médicos, dois diretores e uma enfermeira de dois hospitais do Estado por crimes contra a Saúde Pública e lesão corporal grave, devido ao surto de micobactérias, no período entre abril e julho de 2007. A acusação criminal por um surto de infecções hospitalares a profissionais de saúde é inédita no país. Segundo os inquéritos, os 106 casos confirmados de infecção por MCR ocorreram em cirurgias por videolaparoscopia. Ainda outros nove inquéritos devem investigar outros 86 casos adquiridos, no mesmo período, em outros nove hospitais da região metropolitana de Vitória. Segundo os inquéritos, as infecções foram causadas por “descaso na organização do centro cirúrgico, que houve falha no reprocessamento de material, excesso de cirurgias em um mesmo dia, desinfecção insuficiente e reutilização de material descartável” (O Estado de São Paulo, 2010).

Embora necessitem de avaliações e julgamentos, erros em procedimentos médico-hospitalares são comuns em todo o mundo. Segundo Mello e colaboradores (2007), além dos prejuízos causados aos pacientes, os erros médicos apresentam-se onerosos. Segundo o Instituto de Medicina dos EUA, estima-se que estes erros custem entre US\$ 17 a 29 bilhões por ano. O estudo também revelou que muitos desses custos são transferidos aos contribuintes e que não há incentivos econômicos para a melhoria da segurança dos pacientes. Tais custos poderiam ser reduzidos se as organizações de cuidados à saúde investissem práticas mais seguras, sendo o retorno financeiro colhido na forma de redução dos custos de mal-práticas e outras despesas. Também foi constatado que os hospitais absorveram cerca de dois terços dos custos adicionais associados com eventos adversos e a *Medicare* (Sistema de Seguro de Saúde dos Estados Unidos da América), o outro terço. Esta análise considera apenas os custos associados com hospitalizações iniciais. Mello e colaboradores, ao projetarem seus estudos, consideraram todos os

---



---

custos que os hospitais poderiam ser obrigados a suportar através do sistema de responsabilidade civil extracontratual, consulta ambulatorial, hospitalar e despesas de assistência. Os pesquisadores basearam-se em dados de 14.732 registros de 24 hospitais de Utah e Colorado, em 1992. Os registros mostraram que 465 eventos adversos, dos quais 127 foram atribuídos à negligência e o custo total estimado foi de cerca de US\$ 439 milhões. O custo médio por lesão foi de US\$ 58.766 para todos os eventos adversos e US\$ 113.280 para os ferimentos por negligência (MELLO et al., 2007).

Em detrimento do número de casos de infecções hospitalares, são poucos os pacientes infectados que procuram, na Justiça, a reparação dos danos sofridos. A relação entre o paciente e o hospital é caracterizada pela maioria dos tribunais de justiça como uma prestação de serviços médicos, fundamentando-se no Código de Defesa do Consumidor (CDC) (Lei nº 8.078/90).

O Art. 6º, VIII, do CDC reconhece o paciente, aqui denominado consumidor, como hipossuficiente e transfere aos hospitais a incumbência de provar que o fato gerador do ilícito não foi de sua responsabilidade. Como descrito anteriormente, a própria definição de infecção hospitalar é a de que “o paciente não apresentava, no momento de sua internação, quaisquer formas e sintomas de infecção”. Adicionalmente, o Art. 14º *caput*, tratando da responsabilidade objetiva do hospital quando da prestação de serviços, afasta a necessidade de prova de imperícia, imprudência ou negligência. Neste sentido, a instituição prestadora do serviço responde pelo ocorrido, sendo seus profissionais isentos de responsabilidades no fato. Com a implementação da Teoria da Responsabilidade Objetiva ou Teoria do Risco, também pelo novo Código Civil (Lei 10.406/2002), o consumidor brasileiro passou a combater e defender seus direitos, independentemente do poder econômico daquele que o tenha ofendido, fato que pode ser considerado um avanço nos mecanismos de relações entre pessoas.

---

### 6.5 Avaliação da Atividade Micobactericida de Desinfetantes frente a Biofilmes em Suspensão

Aspecto importante envolvendo a natureza do surto, constituiu-se na capacidade microbiana de desenvolvimento e sobrevivência em sistemas de biofilmes. Conforme descrito no item 5.2.8, a Figura 43 apresenta diferentes culturas microbianas que resultaram na massa celular (biofilmes) destinada aos Testes de Eficácia Micobactericida empregando cilindros de porcelana.

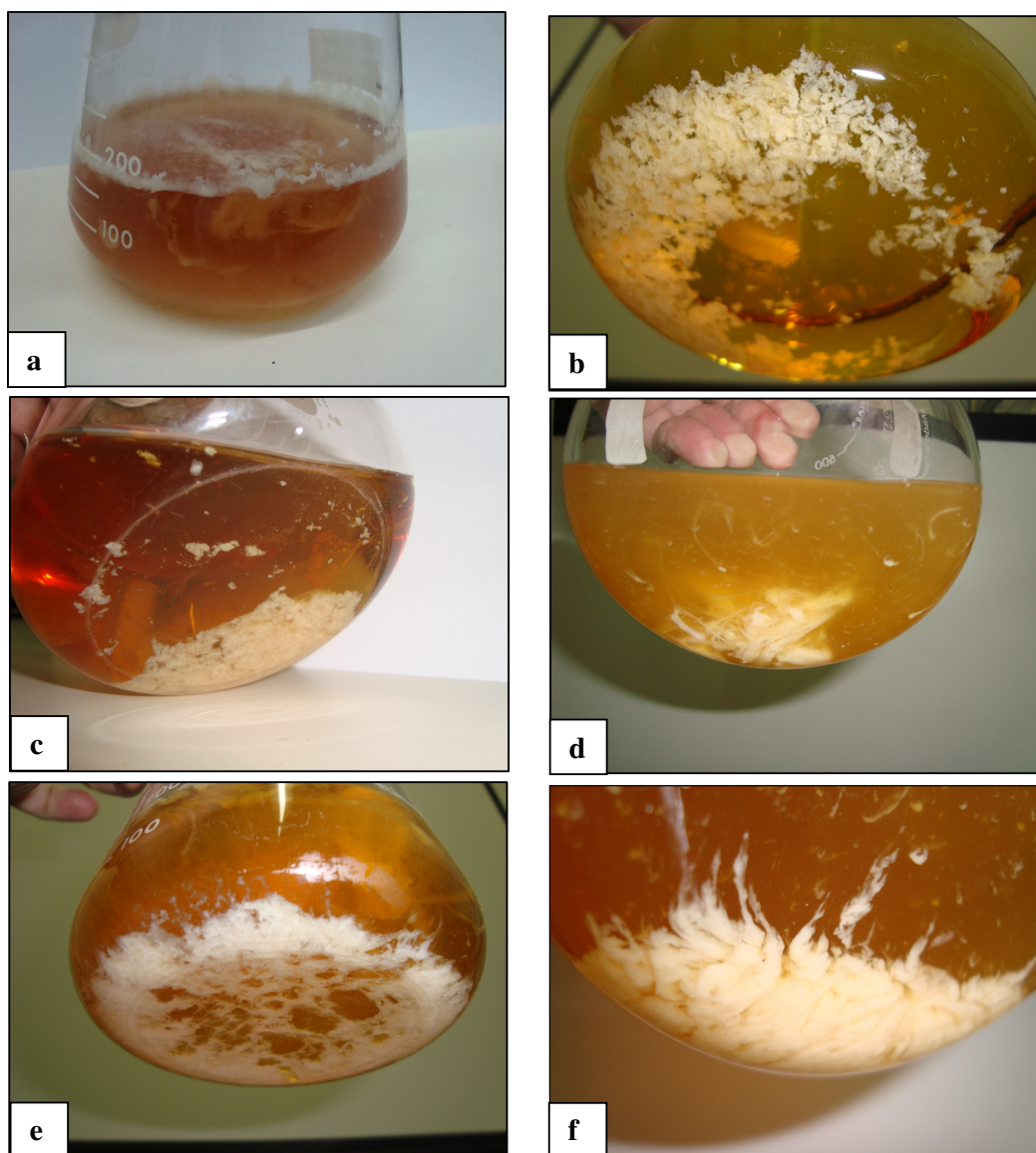


Figura 43 – Sistemas de Biofilmes: (a) *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155; (b) *M. massiliense* CCUG 48898; (c) *M. abscessus* subsp. *bolletii* (MG3-6); (d) *M. abscessus* subsp. *bolletii* (B67); (e) *M. abscessus* subsp. *bolletii* (B31) e (f) *M. abscessus* subsp. *bolletii* (INCQS 594).

---

Falkinhan, em 2007, demonstrou o crescimento de biofilmes de *M. avium* em superfícies de cateteres de poli(cloreto de vinil) plastificado com triocil trimelitato, crilonitrila-butadieno-estireno, policarbonato e silicone, com diâmetro interno de 0,1cm. Fatores como aderência e baixa taxa de crescimento na superfície dos cateteres contribuíram para que os microrganismos isolados do biofilme apresentassem resistência aumentada a claritromicina (100µg) e rifamicina (100µg), se comparados àqueles isolados de biofilmes em suspensão. Embora tenhamos adaptado o Teste de Eficácia Micobactericida empregando cilindros de porcelana para o teste de eficácia de desinfetantes frente a biofilmes, comprovamos que mesmo exibindo crescimento em suspensão, os microrganismos quando aderidos apresentam fator de proteção adicional àqueles do consórcio, independente da natureza do isolado (Tabela 39). A organização física dos sistemas de biofilme, apesar de apresentarem crescimento lento pela diminuição do aporte nutricional, possibilita a formação de camadas de microrganismos e/ou lacunas e proporciona dificuldades de penetração aos agentes antimicrobianos e, conseqüentemente, diferenças em sua resistência (SIMÕES et al., 2009).

Os resultados apresentados na Tabela 39 apresentam total ausência de atividade biocida dos desinfetantes sobre as cepas de *Mycobacterium* spp. estudadas. A formação em biofilme foi capaz de fornecer proteção também às cepas consideradas padrão (mc<sup>2</sup> 155 e CCUG). A capacidade limitada dos agentes desinfetantes sobre determinados microrganismos pode explicar, de certa forma, o ocorrido no surto de Belém e até mesmo em outros surtos no país. A agregação celular atrelada à falta de atividade biocida sobre microrganismos constituem-se em fator predisponível à aquisição de resistência, sendo que falhas na manipulação e utilização destes agentes também podem propiciar e/ou agravar este processo.

---

Tabela 39 – Teste de Eficácia Micobactericida frente a biofilmes de espécies de micobactérias isoladas de surto e fonte ambiental.

Cepas	Agentes Químicos							
	GLT	APE	PEH	DCL	CLX	QAC	IOD	FEN
mc <sup>2</sup> 155	60/60	60/60	60/60	60/60	60/60	60/60	60/60	60/60
CCUG 48898	60/60	60/60	60/60	60/60	60/60	60/60	60/60	60/60
MG3-6	60/60	60/60	60/60	60/60	60/60	60/60	60/60	60/60
B67	60/60	60/60	60/60	60/60	60/60	60/60	60/60	60/60
B31	60/60	60/60	60/60	60/60	60/60	60/60	60/60	60/60
INCQS 594	60/60	60/60	60/60	60/60	60/60	60/60	60/60	60/60

**Legenda:** GLT: glutaraldeído 2%  
 APE: ácido peracético 0,2%  
 PEH: peróxido de hidrogênio 35%  
 DCL: digluconato de clorexidina 0,5%  
 CLX: clorexidina 0,2%  
 QAC: compostos de amônio quaternário 1,2%  
 IOD: iodo 1%  
 FEN: fenol 5%  
 mc<sup>2</sup> 155: *M. smegmatis* (FIOCRUZ – RJ)  
 CCUG 48898: *Culture Collection University of Göteborg*  
 MG3-6: *M. abscessus* subsp. *bolletii* (Vitória – ES)

A capacidade de cepas de *Mycobacterium* spp. formarem agregados celulares e biofilmes está diretamente relacionada à constituição do ambiente (sistemas de tratamentos de água, aquários, tecidos e órgãos humanos, biomateriais, polímeros etc.), de forças de interação em interface sólido-líquido (forças de atração van der Waals e repulsão eletrostática) (RIJNAARTS et al., 1999), produção de substância polimérica extracelular (EPS) (ERBEL; SUDARSAN, 2008) etc. Nos testes de eficácia micobactericida/tuberculocida são empregados cilindros de porcelana, diferentemente de outros métodos que utilizam metal, vidro e até mesmo fios de sutura, no caso dos esporos. Este fato relaciona-se intimamente às irregularidades de superfície e natureza do material que possibilitam maior aderência a estes microrganismos (AOAC, 1988).

Apesar dos compostos contendo Ácido Peracético apresentarem-se como alternativas aos aldeídos para a desinfecção de Alto Nível pela sua limitada toxicidade e eficácia antimicrobiana, algumas considerações devem ser avaliadas. Loukili e colaboradores (2004) avaliariam o efeito de dois desinfetantes à base de

aldeído (Cidex<sup>®</sup> e Endosporine<sup>®</sup>) e quatro à base de ácido peracético (Nu Cidex<sup>®</sup>, Anioxyde 1000<sup>®</sup>, Hydraseptic<sup>®</sup>, Peralkan<sup>®</sup>) sobre biofilmes de cepa padrão de *E. coli* CIP 54127 aderidos à superfície vítrea. Os resultados demonstraram ausência de atividade antimicrobiana dos derivados de aldeídos, Nu Cidex<sup>®</sup> e Anioxyde 1000<sup>®</sup>, sendo que a atividade detergente destes foi considerada fixadora do biofilme. Hydraseptic<sup>®</sup> e Peralkan<sup>®</sup> exibiram atividade semelhante à água estéril empregada como controle.

Segundo Costerton e colaboradores (1999), microrganismos em comunidades de biofilmes são naturalmente resistentes a agentes antimicrobianos, podendo ser considerado fator de preocupação adicional à natureza patogênica dos microrganismos. Esta estrutura comunitária complexa, onde as células permanecem unidas por uma matriz extracelular, pode conter exopolissacarídeos (EPS), proteínas e até mesmo ácido nucleico (HALL-STOODLEY et al., 2004).

Infecções desenvolvidas por biofilmes compartilham características clínicas semelhantes. Biofilmes se desenvolvem preferencialmente em superfícies inertes, em tecidos mortos ou vivos (endocardites) e em itens médicos implantáveis. Esta conformação se desenvolve e produz sintomas de forma lenta. Bactérias sésseis liberam antígenos que estimulam a produção de anticorpos, mas estes não são efetivos contra as bactérias do interior do biofilme e podem causar danos ao complexo imunológico ao redor do tecido (Figura 44) (COSTERTON et al., 1999).

Outro importante fator a ser considerado é a possibilidade dos microrganismos, em biofilme, apresentarem a capacidade de comunicação entre as células, também denominada de *quorum sensing* (QS). Estudos comprovam que a expressão de genes cujos produtos estão envolvidos na síntese da matriz celular é regulada por *quorum sensing* (LI et al., 2002; JUHAS et al., 2005; SPOERING; GILMORE, 2006, SAKURAGI; KOLTER, 2007; PUMBWE et al., 2008).

O papel do *quorum sensing* na resistência biocida ainda não está relativamente claro (MAH; O'TOOLE, 2001). Trabalhos realizados por Davies e colaboradores (1998) demonstraram que o sistema de *quorum sensing* de um mutante de *P. aeruginosa* foi capaz de formar biofilmes com estrutura normal. No entanto, estudos realizados por Brooun e colaboradores mostraram que mutantes

defeituosos no sistema QS não foram afetados, em sua resistência, pelos antimicrobianos (BROOUN et al., 2000).

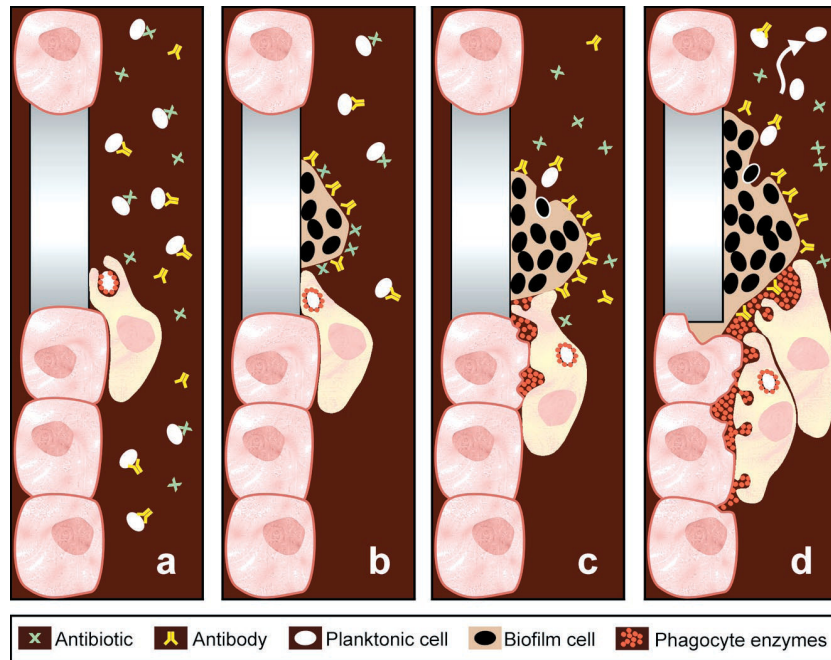


Figura 44 – Biofilme: a) Bactéria planctônica pode ser removida por anticorpos, fagócito e são susceptíveis a antimicrobianos; b) Células bacterianas aderidas formando biofilmes em superfícies inertes e comunidades sésseis são resistentes a anticorpos, fagócitos e antimicrobianos; c) Fagócitos são atraídos para o biofilme; d) Enzimas fagocíticas danificam tecidos em torno do biofilme e as bactérias planctônicas são liberadas do biofilme. Esta liberação pode causar disseminação e infecção aguda na vizinhança do tecido.

A resistência a antibióticos também se apresenta como uma constante na terapêutica contra esse tipo de infecção (BARRY, 1996). A variabilidade da resistência microbiana permanece como um fator ainda a se desvendar. Inúmeras alterações nos tipos e concentrações de antibióticos são testadas até serem encontradas combinações que sejam eficazes na eliminação da infecção e restabelecimento da saúde do paciente. Infecções adquiridas em ambiente hospitalar, após procedimentos médico-cirúrgicos podem agravar ainda mais o prognóstico. A diversidade e quantidade de microrganismos existentes nestes locais demonstram a fragilidade dos sistemas de saúde, onde o paciente se adentra com uma patologia e adquire outra, ao longo de sua internação.

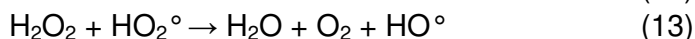
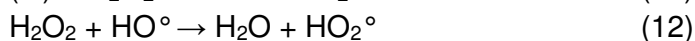
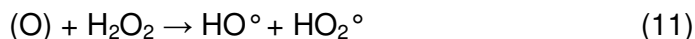
### **6.6 Avaliação da Compatibilidade dos Polímeros com os Processos de Esterilização por Plasma**

Em adição às questões envolvendo eficácia esterilizante e presença de microrganismos em materiais poliméricos de uso na saúde, a compatibilidade térmica desses materiais abrange a preservação de suas características físicas e químicas. Desta forma, possíveis alterações são passíveis de ocorrência, podendo limitar ou impedir sua utilização. Ademais, certas alterações, como o aumento da rugosidade superficial, podem favorecer a aderência microbiana e, conseqüentemente, a formação de biofilmes e aquisição de doenças (COSTERTON et al., 1999).

Alterações estruturais em polímeros envolvendo esterilização por radiação ionizante foram amplamente estudadas na década de 90 (CLOUGH; SHALABY, 1996; PRUITT; RANGANATHAN, 1997; SHEN et al., 1999; YUE-E et al., 1999), bem como elétron acelerado (RAVAT et al., 2000; RAVAT et al., 2001). Neste sentido, tornou-se fundamental a necessidade de investigação de métodos alternativos, dentre eles o plasma, sendo este a principal fonte de esterilização envolvendo, principalmente, as possíveis alterações físicas e químicas destes materiais.

O emprego de dois sistemas de plasma (RIE e ICP) utilizando os gases oxigênio e peróxido de hidrogênio, neste trabalho, nos permite comentar sobre as principais características de ambos, principalmente, no que diz respeito à geração de entidades reativas e de como atuam quando em contato com os polímeros. Alguns autores descrevem hipóteses que podem elucidar melhor essa questão (LEROUGE et al., 2000c; SOLOSHENKO et al., 2002).

Os experimentos de Soloshenko e colaboradores (2002) apresentaram diversidades possíveis de estados de dissociação das moléculas para os sistemas de plasma que empregam tanto oxigênio quanto peróxido de hidrogênio. Desta forma, foram relatadas as energias necessárias para o rompimento de ligações, inclusive envolvendo participação, função e distribuição eletrônica destes sistemas, sendo que para o plasma de  $H_2O_2$  a densidade eletrônica é, consideravelmente, superior. Assim, as principais reações químicas envolvidas podem ser resumidas como segue:



A importância do papel das espécies reativas contendo oxigênio também foi minuciosamente estudada por Gaunt e colaboradores (2006) que ressaltaram os radicais hidroxila ( $HO^\circ$ ) como fundamentais na promoção de dano extenso às ligações químicas. Alguns dados coletados sugerem oxidação e corrosão (*etching*) em nível estritamente superficial provocadas por espécies reativas contendo  $O_2$  (LEROUGE et al., 2000a; LEROUGE et al., 2002). Por outro lado, alterações no interior do polímero, ou seja, em sua massa interna (*bulk*) parecem não ocorrer. Entretanto, ainda não há consenso sobre a aplicabilidade benéfica do plasma abrangendo os diversos polímeros utilizados na confecção de produtos médico-hospitalares (GOGOLEWSKI et al., 1996; GOLDMAN; PRUITT, 1998; LEROUGE et al., 2002).

Após intensos estudos, vários autores concordam que o comportamento das primeiras camadas superficiais pode interferir em aspectos que envolvam a biocompatibilidade, rugosidade, espessura, hidroflicidade e lipoflicidade do polímero. Entretanto, o comportamento da massa interna se relaciona diretamente com as propriedades físicas e mecânicas do mesmo, sendo que alterações nesse nível podem englobar aspectos como o rearranjo das cadeias poliméricas (rompimento de cadeias, formação de ligações cruzadas), alterações relacionadas aos aditivos (degradação), amarelamento e outros (GOGOLEWSKI et al., 1996; STUART, 1996; GOLDMAN; PRUITT, 1998; MANO; MENDES, 1999; RABELLO, 2000; LEROUGE et al., 2000a; KLAPPERICH et al., 2001; SIDOUNI et al., 2001; KACZMAREK et al., 2002; LEROUGE et al., 2002; AOUINTI et al., 2003; CANEVAROLO Jr, 2004; BORCIA et al., 2004; BORCIA et al., 2004a; TAJIMA; KOMVOPOULOS, 2006; SVORCIK et al., 2006).

Assim, decisão acerca da abrangência de polímeros estudada foi baseada em relatos de literatura envolvendo a sensibilidade dos mesmos ao método esterilizante por radiação ionizante (CLOUGH; SHALABY, 1996; PRUITT et al., 1997; SHEN et al., 1999; YUE-E et al., 1999) e feixe de elétrons acelerado (RAVAT et al., 2000; RAVAT et al., 2001). Desta forma, foram selecionados o poli(cloreto de vinila) (PVC), polietileno de alta densidade (PEAD), polipropileno (PP), poliuretano (PUR) e o



---

policarbonato (PC), cujas fórmulas estruturais e/ou principais rotas de síntese estão apresentadas nas Figuras 23 a 27. Os polímeros utilizados no presente estudo são polímeros termoplásticos comumente utilizados na fabricação de produtos médico-hospitalares de uso único.

Optou-se por utilizar chapas “*in natura*” dos principais polímeros utilizados na confecção de produtos médico-hospitalares, ao invés das próprias peças. A razão está atrelada ao fato de que a maioria das peças possui configuração tubular e/ou irregular. Desta forma, haveria impedimento do emprego como amostra para alguns dos métodos analíticos utilizados que requerem superfícies lisas e aderentes aos porta-amostras, além de cumprir também com a padronização da espessura de todas as chapas, que foi de 1mm.

Adicionalmente, a incorporação de diferentes aditivos (plastificantes, lubrificantes, estabilizantes, pigmentos, cargas, espumantes, antiestáticos, retardantes de chama, nucleantes, modificadores de impacto, entre outros) ao processo produtivo de produtos médico-hospitalares, bem como produção de polímeros para aplicações distintas agregam determinadas características físicas e mecânicas às peças confeccionadas (RABELLO, 2000; LEROUGE et al., 2000a). Estas, por sua vez, constituem-se em substâncias químicas de naturezas diversas que proporcionariam interferência adicional aos métodos analíticos físico-químicos escolhidos.

É preciso ressaltar que a aquisição e o uso de amostras comerciais resultaram na falta absoluta de informações com relação à síntese de tais polímeros e sua composição final por parte dos produtores – fato ocorrido na execução do presente trabalho.

Na investigação do comportamento dos polímeros frente aos processos empregando plasma, foi necessária a utilização de técnicas analíticas de caracterização destes materiais em distintos níveis de profundidade, uma vez que possíveis modificações podem afetar tanto suas camadas superficiais como seu *bulk*. Adicionalmente, os processos podem desencadear alterações, de forma que comprometam o emprego dos polímeros. Dentre as técnicas adequadas para tal estudo, citam-se: métodos espectroscópicos, microscópicos, termodinâmicos e outros complementares como métodos biológicos (MERRET et al., 2002;

---

---

CANEVAROLO Jr, 2004; USP 29, 2006). No presente trabalho, foram utilizados os seguintes métodos: Espectroscopia Fotoacústica no Infravermelho com Transformadas de *Fourier* (PAS-FTIR), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Perfilometria, microanálise em sistema *Energy Dispersive Spectroscopy* (EDS) e Citotoxicidade “*in vitro*” pelo método de Difusão em Ágar.

As técnicas de espectroscopia vibracional são úteis para o estudo de alterações estruturais em muitos materiais, pois relacionam a interação da radiação eletromagnética com a matéria. A energia ou o comprimento de onda da radiação incidente determina o tipo de transição ou interação que ocorre entre a radiação e a matéria, sendo basicamente três processos distintos: Absorção (no infravermelho-IR), Emissão (fluorescência) e Espalhamento (Raman) (STUART, 1996; STUART, 1997; KAWANO, 2004).

As moléculas apresentam movimento vibracional definido denominado de vibração normal. Radiações incidentes com números de onda na faixa de 12.800 a 4.000  $\text{cm}^{-1}$  (Infravermelho Próximo – NIR) e 4.000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  (Infravermelho Médio – MIR) proporcionam interações que envolvem vibrações moleculares do tipo estiramento de ligação, deformação angular e torção. As vibrações de estiramento ainda podem ser do tipo simétrico, antisimétrico, degenerado, em fase, fora de fase e pulsação de anel (STUART, 1996; STUART, 1997; KAWANO, 2004).

As frequências vibracionais de uma molécula dependem da natureza do movimento, massa dos átomos, geometria da molécula, natureza das ligações químicas e ambiente químico/físico. Assim, a espectroscopia vibracional torna-se ferramenta de grande influência na identificação de grupos funcionais, conformação e estrutura de macromoléculas, permitindo a obtenção do espectro vibracional completo da molécula (STUART, 1996; STUART, 1997; KAWANO, 2004).

Informações acerca de alterações poliméricas de diferentes naturezas ocorridas em polímeros distintos puderam ser esclarecidas através de espectroscopia vibracional no IR. Oxidação em implantes de polietileno de ultra alto peso molecular (UHMWPE) (CHEN et al., 1999), hidrólise enzimática em polímeros biodegradáveis (PAMULA et al., 2001), bem como rompimento de cadeias e formação de ligações cruzadas em compósitos de colágeno e polipropileno (TYAN et

---

al., 2003) puderam ser visualizadas através de ferramentas analíticas de caracterização polimérica.

### **6.7 Espectroscopia Fotoacústica no Infravermelho com Transformadas de Fourier (PAS-FTIR)**

Para o presente estudo, foi utilizada a Espectroscopia Fotoacústica no Infravermelho com Transformadas de *Fourier* (PAS-FTIR), sendo considerado método indireto de obtenção de espectro vibracional IR da molécula. Equipamentos modernos agregam fonte de luz, interferômetro de Michelson e célula de amostragem com microfone embutido.

Os espectros obtidos na região do infravermelho médio podem apresentar várias bandas, embora cada banda possa ser considerada uma vibração particular de ligações ou grupamentos químicos. Desta forma, o espectro constitui-se na impressão digital da molécula onde, de acordo com cada estrutura, podem ocorrer bandas em diversas regiões (STUART, 1996; STUART, 1997).

Exemplificando, cita-se a região do estiramento X-H ( $4.000$  e  $2.500\text{ cm}^{-1}$ ), onde as bandas do estiramento C-H ocorrem na região do espectro entre  $2.970$  e  $2.850\text{ cm}^{-1}$  (entre  $2.965$  e  $2.880\text{ cm}^{-1}$  para grupamentos  $\text{CH}_3$  e entre  $2.930$  e  $2.860\text{ cm}^{-1}$  para grupamentos  $\text{CH}_2$ ), sendo possível verificar estiramentos simétricos e antisimétricos para tais ligações. Para o estiramento N-H de amidas, as bandas ocorrem na região de  $3.400$  a  $3.300\text{ cm}^{-1}$ , enquanto que para grupamento O-H as bandas ocorrem entre  $3.700$  e  $3.600\text{ cm}^{-1}$ . O estiramento C-H de compostos aromáticos podem ocorrer na região  $3.100$  e  $3.000\text{ cm}^{-1}$  (STUART, 1996; STUART, 1997).

Citam-se ainda as bandas na região do estiramento das ligações triplas ( $2.500$  a  $2.000\text{ cm}^{-1}$ ) e ligações duplas ( $2.000$  a  $1.500\text{ cm}^{-1}$ ), principalmente, a banda do grupo carbonila (C=O) que é muito forte e facilmente reconhecida no espectro infravermelho. Dependendo do tipo de ligação adjacente, esta pode se localizar na região entre  $1.830$  e  $1.650\text{ cm}^{-1}$ . A banda do estiramento C=C é mais fraca e ocorre em cerca de  $1.650\text{ cm}^{-1}$ , sendo que aquela referente à ligação C=N também ocorre nesta região e é mais forte que a anterior (STUART, 1996; STUART, 1997).

As bandas observadas entre 1.500 e 400  $\text{cm}^{-1}$  representam a maior parte das frequências vibracionais fundamentais, sendo denominadas de “região de impressão digital” rica em informação para todas as moléculas. Nesta região, a banda referente ao grupamento C-Cl ocorre em 700  $\text{cm}^{-1}$  (KAWANO, 2004; STUART, 1996; STUART, 1997).

As bandas anteriormente descritas constituíram-se no ponto de partida para análise dos espectros obtidos, os quais foram comparados entre si e também com outros encontrados na literatura (SADTLER, 1985; STUART, 1996; STUART, 1997). No caso dos polímeros estudados, os espectros obtidos em cerca de 10 $\mu\text{m}$  de profundidade para as cinco amostras não expostas e as vinte e cinco expostas ao plasma sob diferentes combinações de parâmetros podem ser visualizadas nas Figuras de 45 a 49, sendo agrupadas por tipo de polímero.

---

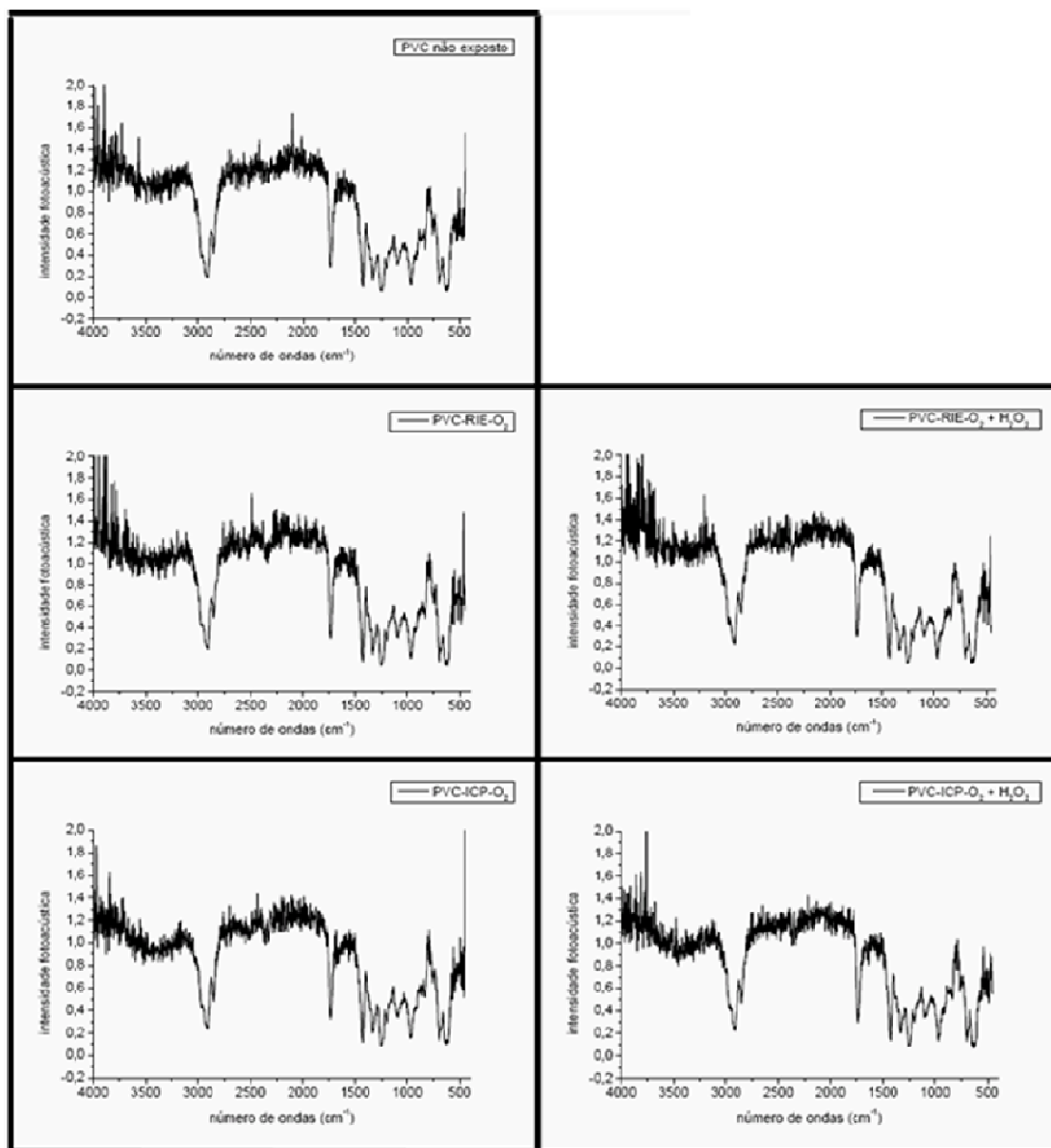


Figura 45 – Espectros de Radiação Infravermelha obtidos em equipamento BOMEM PCDA para cinco amostras de PVC (uma não exposta e quatro expostas) sob quatro combinações de parâmetros (RIE-O<sub>2</sub>; RIE-O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; ICP-O<sub>2</sub>; ICP-O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Ao se analisar o espectro obtido para a amostra do PVC (Figura 45) não exposto ao plasma (MEV) (Figura 50a), verificam-se bandas que foram atribuídas aos seguintes grupamentos: (1) ombro atribuído ao estiramento C-H de composto aromático em 3.020 cm<sup>-1</sup>; (2) estiramento CH<sub>2</sub> antisimétrico entre 2.916 e 2.842 cm<sup>-1</sup>; (3) estiramento C=O em frequência de 1.732 cm<sup>-1</sup>; (4) estiramento C-O-C em frequência de 1.099 cm<sup>-1</sup> e (5) estiramento C-Cl entre 699 e 617 cm<sup>-1</sup>; (STUART,

1996; STUART, 1997). O ombro das duas últimas bandas não faz parte do espectro do PVC original (SADTLER, 1985) e poderiam ser atribuídos à moléculas químicas adicionadas no processamento como aditivo. O PVC é um polímero que pode receber diferentes tipos de aditivos e em grandes quantidades, principalmente, plastificantes que aumentam amplamente sua flexibilidade. Dentre os compostos químicos utilizados têm-se os ftalatos, sendo o mais usado o di-2-etil-hexil-ftalato ou dioctilftalato (DOP) (RABELLO, 2000). Outros autores descrevem ainda que mesmo polímeros não submetidos a qualquer processo de esterilização podem conter certo grau de oxidação atribuído principalmente a condições de processamento evidenciando, portanto, tais ligações contendo oxigênio (LEROUGE et al., 2000a).

É interessante notar que ao se analisar o espectro do PVC não exposto com os expostos, em nenhuma das condições foram observadas mudanças significativas nas posições e nas intensidades relativas das bandas, sugerindo insignificantes ou ausência de alterações a uma profundidade de cerca de 10 $\mu$ m. Ainda para o PVC, buscou-se a presença de bandas referentes a outros grupos oxidados como o estiramento O-H em frequência de 3.640 a 3.400  $\text{cm}^{-1}$ , não tendo sido observadas (STUART, 1996; STUART, 1997).

Kaczmarek e colaboradores (2002) utilizaram plasma de pressão atmosférica e compararam sua influência sobre filmes de PVC purificados frente à exposição dos mesmos à radiação ultravioleta (UV). Os autores puderam constatar que o plasma promoveu ampla oxidação, sendo restrita apenas às primeiras camadas superficiais do polímero, alterando sua propriedade hidrofílica. Neste estudo, as camadas mais profundas também foram afetadas devido não ao plasma, mas sim pela vasta oxidação resultante da radiação UV. Em ambos os casos, os fenômenos puderam ser comprovados por diferentes técnicas, inclusive espectroscopia vibracional.

Para as bandas atribuídas ao espectro IR do PEAD (Figura 46) não exposto ao processo por plasma (Figura 51a) pode-se destacar: (1) estiramento  $\text{CH}_2$  antisimétrico e simétrico, respectivamente, em 2.927 e 2.857  $\text{cm}^{-1}$ ; (2) deformação angular  $\text{CH}_2$  em 1.476  $\text{cm}^{-1}$  e (3) balanço *rocking* do grupo  $\text{CH}_2$  em 726  $\text{cm}^{-1}$  (STUART, 1996; STUART, 1997). Estas bandas apresentam-se similares àquelas encontradas para as chapas de PEAD expostas sob as quatro condições, pressupondo imperceptíveis ou ausentes modificações, em profundidade de cerca de 10 $\mu$ m, decorrentes do processo. Adicionalmente, não foram encontradas bandas

---

referentes a grupos oxidados como estiramento C=O em frequência de 1.830 a 1.650  $\text{cm}^{-1}$  e estiramento O-H (3.640 a 3.400  $\text{cm}^{-1}$ ) (STUART, 1996; STUART, 1997), inferindo a não ocorrência de oxidação decorrente do processo por plasma e ausência de aditivos contendo grupamentos com ligações com oxigênio.

---

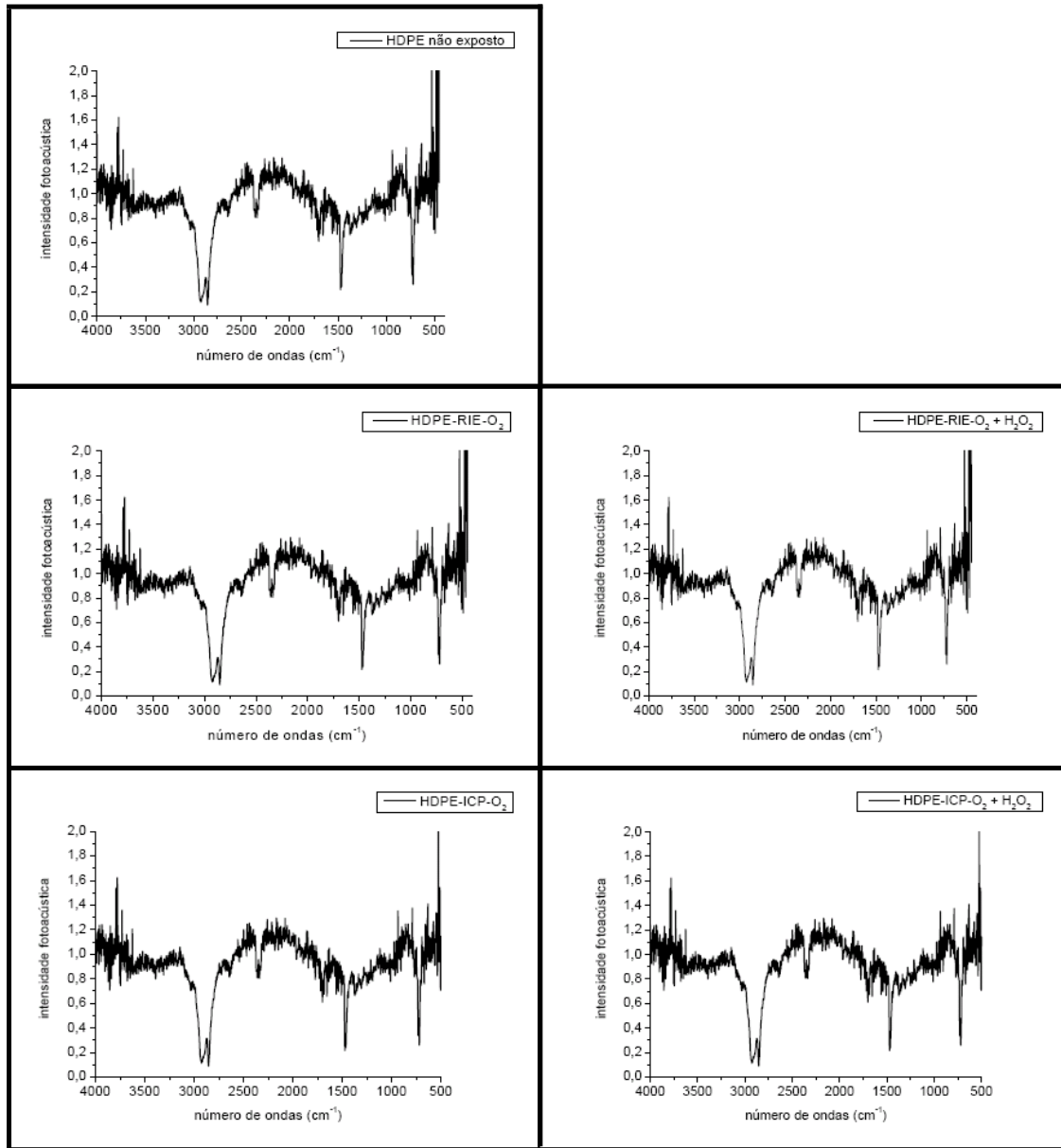


Figura 46 – Espectros de Radiação Infravermelha obtidos em equipamento BOMEM PCDA para cinco amostras de PEAD (uma não exposta e quatro expostas) sob quatro combinações de parâmetros (RIE-O<sub>2</sub>; RIE-O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; ICP-O<sub>2</sub>; ICP-O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).



Klapperich e colaboradores (2001), trabalhando com exposição de polietileno de ultra alto peso molecular (UHMWPE) sob plasma de Ar, C<sub>3</sub>F<sub>6</sub>, CH<sub>4</sub> e NH<sub>4</sub> observaram modificações que incluíram formação de ligações CF<sub>3</sub> e CF<sub>2</sub>. Entretanto, tal modificação se manteve apenas na superfície dos cupons de 2,5mm de espessura, evidenciando que o *bulk* do polímero não foi afetado. Esses resultados suportaram achados de Borcia e colaboradores (2004), que observaram oxidações e formação de ligação C-O em polímeros que normalmente não têm oxigênio (PEAD) ao serem submetidos a plasma de pressão atmosférica e Descarga por Barreira Dielétrica (DBD), sendo que a oxidação foi verificada somente em nível superficial.

A presença de grupos oxidados (C=O, C-O, O-C=O) também foi encontrada em amostras de LDPE expostas à plasma indutivo utilizando gás Ar, sendo que mais uma vez, tais modificações se restringiram à superfície dos *pellets* expostos e tiveram sua magnitude aumentada com a proximidade das amostras da fonte geradora de plasma (TAJIMA; KOMVOPOULOS, 2006).

Grupos oxidados como peróxido, éster, carbonila, hidroxila, amida e grande número de ligações duplas foram encontrados também para PEAD expostos em plasma de Ar, sendo que sua concentração máxima não ultrapassou o patamar superficial de 25nm (SVORCIK et al., 2006).

As bandas atribuídas ao PP (Figura 47) não exposto ao processo por plasma (Figura 52a) se constituíram de: (1) estiramento CH<sub>3</sub> antisimétrico e simétrico entre 2.975 e 2.880 cm<sup>-1</sup> e (2) entre 2.930 e 2.860 cm<sup>-1</sup> para grupamentos CH<sub>2</sub>; (3) deformação CH<sub>3</sub> assimétrica em 1.457 cm<sup>-1</sup> (PAINTER et al., 1977); (4) deformação CH<sub>3</sub> simétrica em 1.377 cm<sup>-1</sup>, sendo um singleto; (5) *twisting* do grupo CH<sub>2</sub> em 1.161 cm<sup>-1</sup> (STUART, 1996; STUART, 1997); (6) estiramento simétrico C-O-C em 1.000 cm<sup>-1</sup> e (7) deformação angular fora do plano do grupo C-H de benzeno em 972 cm<sup>-1</sup> (McCARTHY et al., 1997). As duas últimas bandas não fazem parte da molécula do PP, aparecendo também no espectro do PP não exposto, pressupondo a presença de aditivo contendo tais ligações ou algum nível de oxidação durante o processo como reportado anteriormente (LEROUGE, 2000a). Visualizou-se ainda a banda em 838 cm<sup>-1</sup> que se refere ao balanço *rocking* do grupo CH<sub>2</sub> (PAINTER et al., 1977). Ao se comparar tais bandas com aquelas atribuídas às chapas de PP que foram submetidas ao plasma sob as quatro condições de parâmetros estabelecidas, fica evidente a semelhança de suas intensidades e posições, levando ao

estabelecimento de modificações indetectáveis ou ausentes, em profundidade de cerca de 10 $\mu$ m, decorrentes do processo por plasma. Não foram detectadas bandas referentes a grupos oxidados como estiramento C=O em frequência de 1.830 a 1.650  $\text{cm}^{-1}$  e estiramento O-H (3.640 a 3.400  $\text{cm}^{-1}$ ) (STUART, 1996; STUART, 1997), indicando ausência de oxidação, decorrente do processo por plasma e, de aditivos contendo grupamentos com ligações com oxigênio.

---

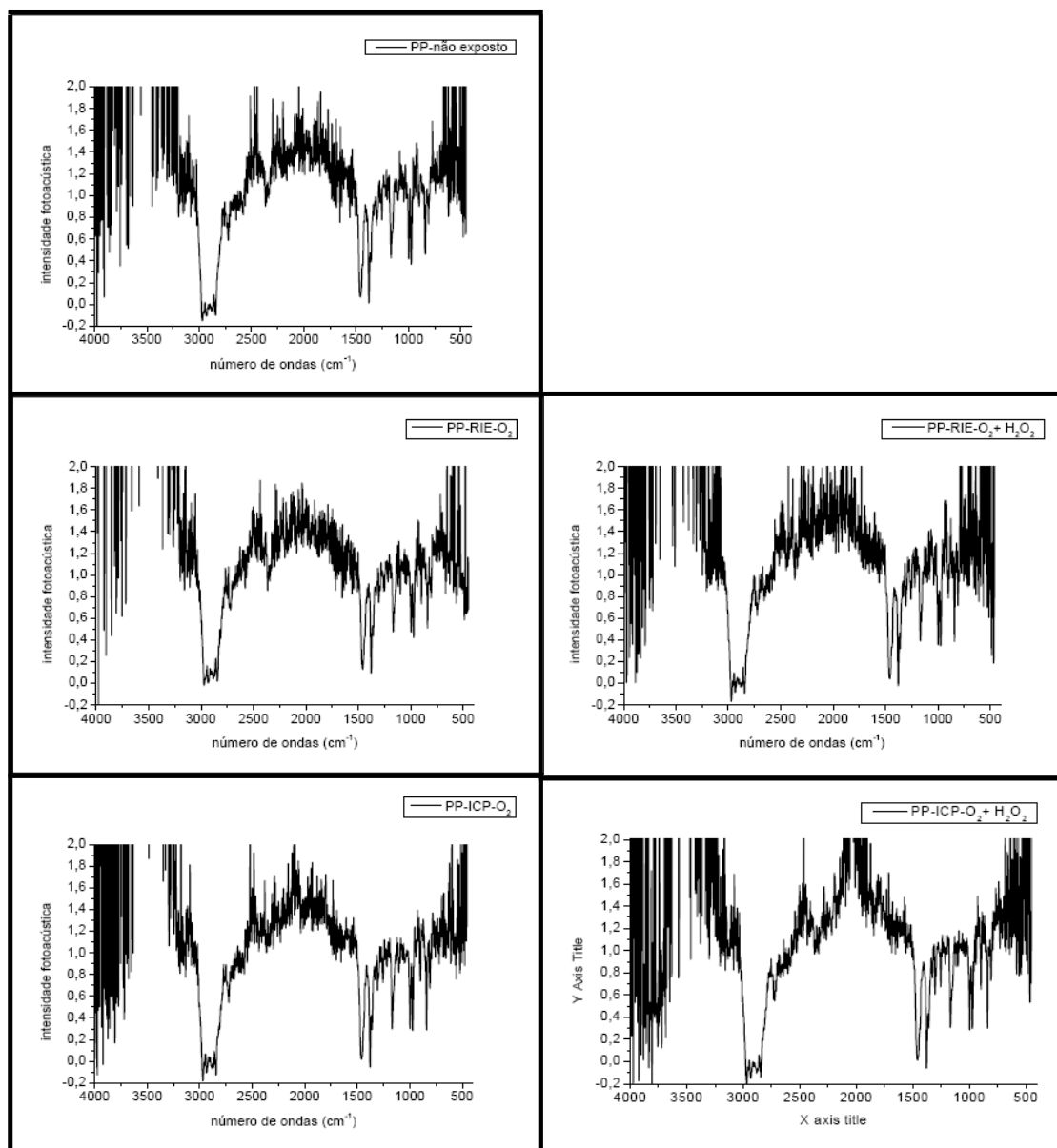


Figura 47 – Espectros de Radiação Infravermelha obtidos em equipamento BOMEM PCDA para cinco amostras de PP (uma não exposta e quatro expostas) sob quatro combinações de parâmetros (RIE-O<sub>2</sub>; RIE-O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; ICP-O<sub>2</sub>; ICP-O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Semelhantemente a estudos de alguns autores (SVORCIK et al., 2006; TAJIMA; KOMVOPOULOS, 2006) que trabalharam com polietileno, Strobel e colaboradores investigaram polipropilenos expostos a diferentes condições de plasma de pressão atmosférica e UV/Ozônio. O estudo constatou a presença de grupos oxidados (C=O, C-O, O-C=O), sendo que as modificações apresentaram-se rápidas e se restringiram à superfície dos filmes de 0,4mm de espessura.

Adicionalmente, sua concentração máxima detectada não ultrapassou o patamar superficial de 4nm (STROBEL et al., 1995). Ainda, à semelhança de Kaczmarek e colaboradores que trabalharam com PVC exposto a plasma e radiação UV (KACZMAREK et al., 2002), os resultados de Strobel e colaboradores apontam para oxidação menos intensa quando o PP também foi exposto à radiação UV. Entretanto, foram atingidas as camadas mais internas, ou seja, o *bulk* do PP (STROBEL et al., 1995). Em concordância, filmes de PP de 100µm foram submetidos a plasma de CO<sub>2</sub>, tendo sido verificada a oxidação superficial em profundidade de 10nm, provocada por fragmentos do gás, principalmente, monóxido de carbono, oxigênio atômico e molecular decorrente de recombinação (AQUINTI et al., 2003).

No caso das chapas de PUR (Figura 48 e 53a), o espectro IR obtido em profundidade de cerca de 10µm forneceu as seguintes bandas para o polímero não exposto: para o estiramento N-H de amidas, a banda ocorreu na frequência de 3.290 cm<sup>-1</sup>; estiramento C-H de composto aromático em 3.019 cm<sup>-1</sup>; (1) estiramento CH<sub>2</sub> antisimétrico e simétrico entre 2.939 e 2.866 cm<sup>-1</sup>; (2) estiramento C=O em frequência de 1.731 cm<sup>-1</sup> (STUART, 1996; STUART, 1997; ANDERSON et al., 1998); (3) deformação angular do grupo N-H + estiramento C-N em 1.533 cm<sup>-1</sup>; (4) *wagging* de grupos CH<sub>2</sub> alifáticos em 1.370 cm<sup>-1</sup>; (5) estiramento CN em 1.231 cm<sup>-1</sup> (McCARTHY et al., 1997); (6) estiramento C-O-C em frequência de 1.107 cm<sup>-1</sup> (LEROUGE et al., 2000a) e (7) deformação angular fora do plano de grupo C-H em 928 cm<sup>-1</sup>. Estas frequências são compatíveis com dados de literatura para a molécula de PUR original (SADTLER, 1985). Ao se analisar o padrão com o obtido para o PUR exposto sob as quatro condições definidas, mais uma vez observa-se a semelhança de suas intensidades e posições, levando ao estabelecimento de sutis ou mesmo ausentes modificações decorrentes do processo por plasma. Outras bandas contendo grupos ligados ao oxigênio como O-H (3.640 a 3.400 cm<sup>-1</sup>) que evidenciariam possível oxidação não foram encontradas.

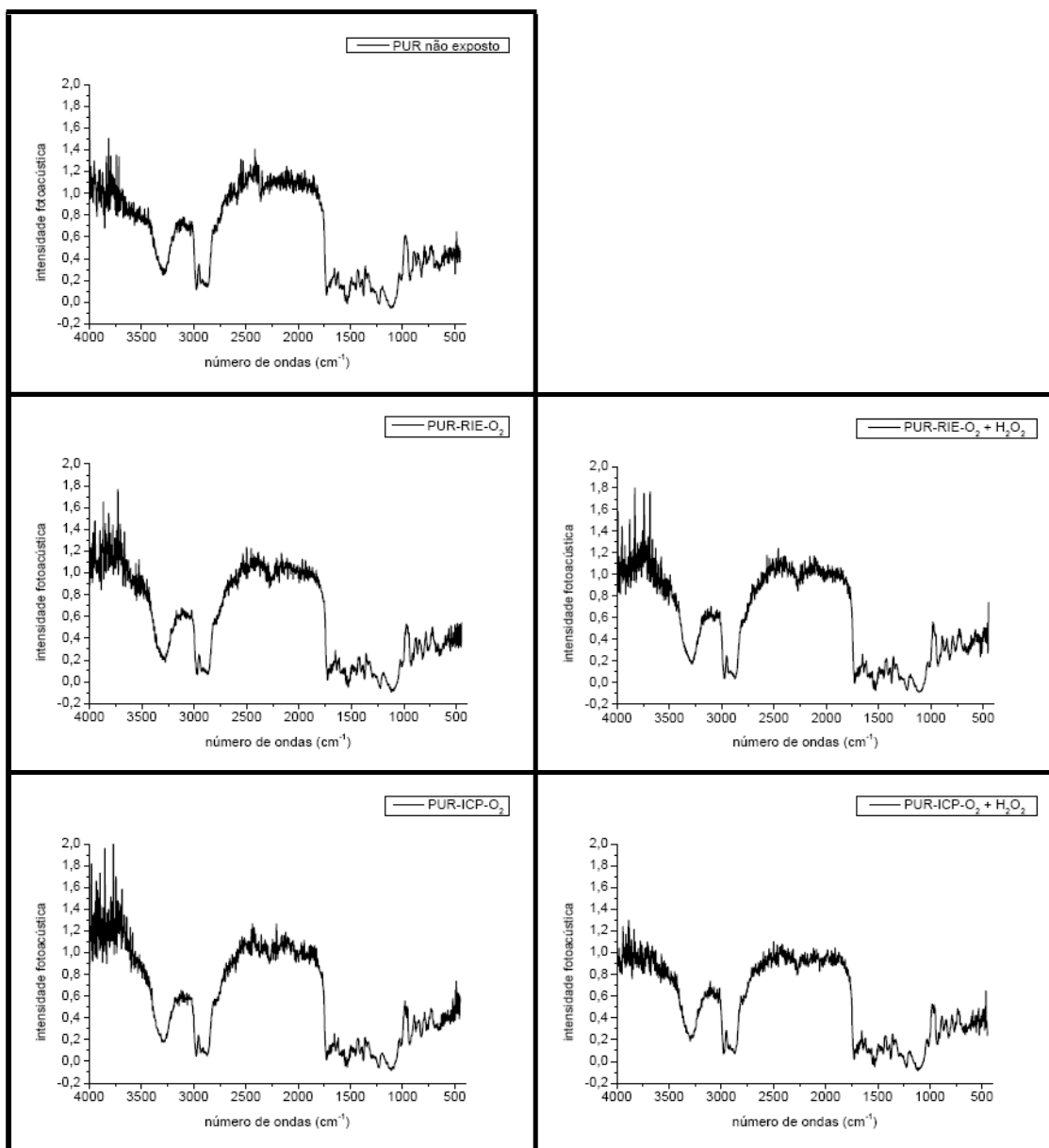


Figura 48 – Espectros de Radiação Infravermelha obtidos em equipamento BOMEM PCDA para cinco amostras de PUR (uma não exposta e quatro expostas) sob quatro combinações de parâmetros (RIE-O<sub>2</sub>; RIE-O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; ICP-O<sub>2</sub>; ICP-O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Lerouge e colaboradores (2000a) relataram diferentes resultados com cateteres em PUR submetidos a plasma de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Foi encontrado certo grau de oxidação na superfície polimérica empregando espectroscopia fotoeletrônica de raios X (XPS). O resultado não foi evidenciado quando utilizado outro método – espectroscopia no infravermelho com transformadas de *Fourier* (FTIR) e reflectância total atenuada (ATR-FTIR). Segundo os autores, isso pode ser explicado devido aos

diferentes graus de profundidade de penetração das duas técnicas analíticas: O XPS atinge cerca de 10nm, limitando-se à superfície polimérica onde as alterações puderam ser detectadas, enquanto o ATR-FTIR atinge a profundidade de 1 a 5 $\mu$ m, portanto, penetra mais profundamente no polímero, sendo este não alterado por processos empregando plasma (LEROUGE et al., 2000a; LEROUGE et al., 2002).

Comparativamente, alto nível de oxidação com formação de grupos –OH e rompimento de cadeias, mesmo sob vácuo, de amostras de PUR termoplástico foram evidenciados por espectroscopia vibracional (estiramento à 3.500  $\text{cm}^{-1}$ ) em profundidades atingindo cerca de 150 a 250 $\mu$ m (*bulk*). Entretanto, estas mudanças foram ocasionadas por exposição em equipamento com feixe de elétrons e foram tanto mais intensas quanto maior foi a energia incidente, chegando a atingir 500 $\mu$ m (RAVAT et al., 2000). Posteriormente, estudo adicional evidenciou através da mesma técnica taxa de oxidação maior com o aumento gradual do fluxo de elétrons, atingindo profundidades de cerca de 200 $\mu$ m, padrão que não se repetiu com o aumento da temperatura, tendo ocasionado o decréscimo da taxa de oxidação do PUR termoplástico estudado (RAVAT et al., 2001).

Finalizando a análise dos polímeros por espectroscopia fotoacústica no infravermelho com transformadas de *Fourier* (PAS-FTIR) em profundidade de cerca de 10 $\mu$ m, para as chapas de PC (Figura 49) foram atribuídas as seguintes bandas (Figura 54a): (1) estiramento C-H de grupo aromático em 3.046  $\text{cm}^{-1}$ ; (2) estiramento CH<sub>3</sub> antisimétrico e simétrico, respectivamente, em 2.969 e 2.878  $\text{cm}^{-1}$ ; (3) estiramento C=O em frequência de 1.785  $\text{cm}^{-1}$ ; (4) estiramento de anel em 1.505 $\text{cm}^{-1}$  (STUART, 1996; STUART, 1997); (5) estiramento C-O-C na região entre 1.084 e 1.020  $\text{cm}^{-1}$  (LEROUGE et al., 2000a) e (6) deformação angular fora do plano do grupo C-H em 838  $\text{cm}^{-1}$  (McCARTHY et al., 1997). Foram comparadas as bandas obtidas para o PC não exposto com as obtidas para as chapas expostas sob as quatro condições definidas, e, novamente, observa-se semelhante padrão de intensidades e posições, levando a informações relacionadas a insignificantes ou mesmo ausentes modificações decorrentes do processo por plasma. Outras bandas contendo grupos ligados ao oxigênio como O-H (3.640 a 3.400  $\text{cm}^{-1}$ ) que indicariam possível oxidação não foram novamente encontradas.

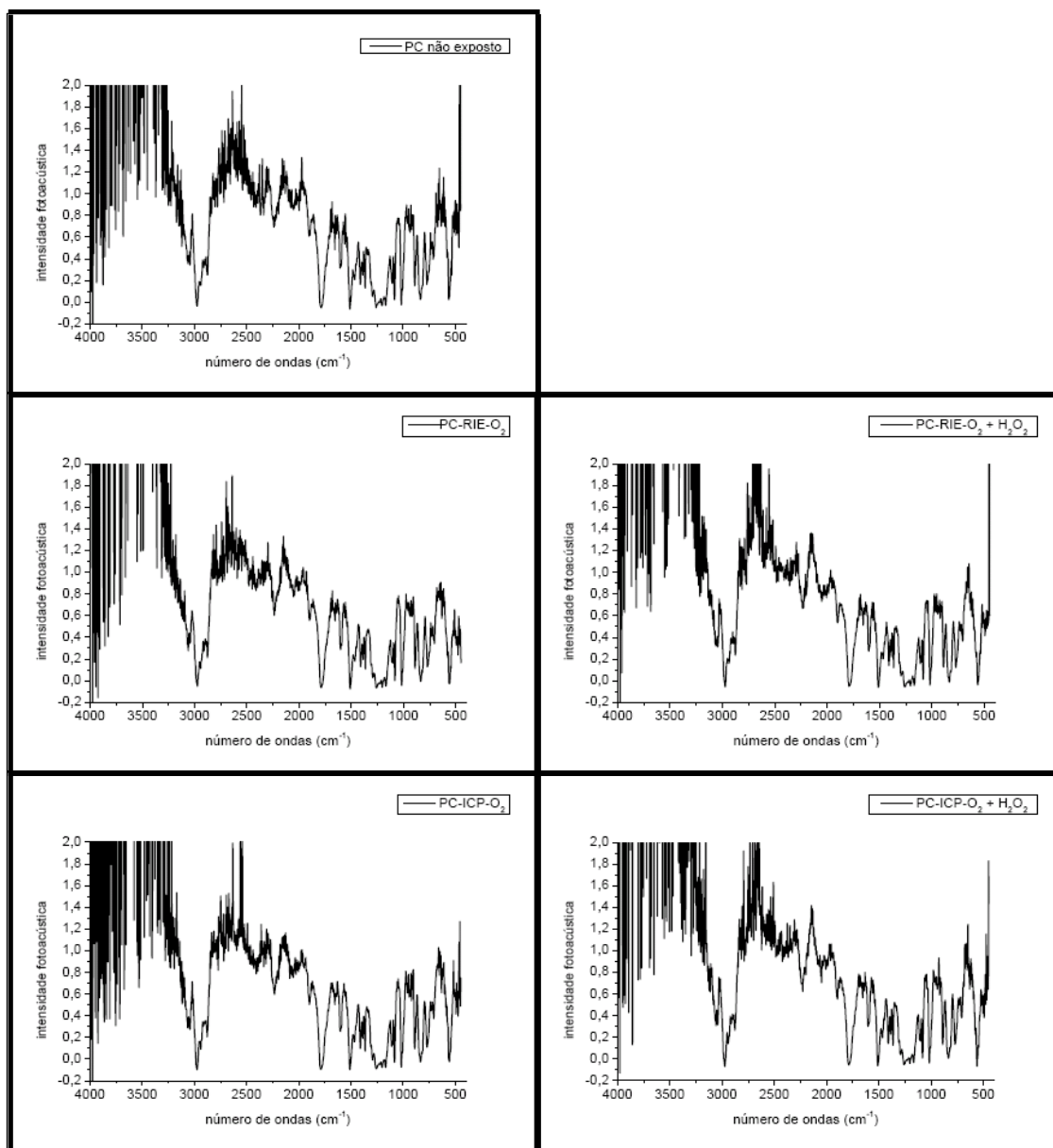


Figura 49 – Espectros de Radiação Infravermelha obtidos em equipamento BOMEM PCDA para cinco amostras de PC (uma não exposta e quatro expostas) sob quatro combinações de parâmetros (RIE-O<sub>2</sub>; RIE-O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; ICP-O<sub>2</sub>; ICP-O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Achados de Borcia e colaboradores (2004a) evidenciaram oxidação em PC e outros polímeros que possuem oxigênio na estrutura fundamental quando expostos a plasma de ar ambiente e descarga DBD, com consequente formação de ligações C-O, C=O e O-C-O. Entretanto, esta situação foi evidenciada somente na superfície dos polímeros estudados, sendo que a massa destes não foi afetada. Os dados são, portanto, complementares a estudo anterior dos mesmos autores quando

---

trabalharam com polímeros que não possuem oxigênio na estrutura fundamental como o PEAD (BORCIA et al., 2004).

Extrapolando para os perfis sem alterações significativas encontradas entre as amostras expostas e não expostas para os cinco polímeros estudados, a explicação é concordante com o achado de Lerouge e colaboradores (2000a; 2002). A profundidade alcançada pela técnica de PAS-FTIR utilizada no presente trabalho foi de cerca de 10 $\mu$ m, sendo esta atribuída à massa do polímero segundo alguns autores (SOWA et al., 1996; McCARTHY et al., 1997; YANG et al., 2001; AOUINTI et al., 2003). Assim, os resultados sugerem que ambos os sistemas de plasma e gases não promoveram alterações internamente ao polímero (*bulk*), levando-se em conta a profundidade de cerca de 10 $\mu$ m atingida pela análise, suportando grande número de pesquisas que mostraram que o plasma atua nas primeiras camadas superficiais de polímeros (em escala de nm) e outros materiais, seja provocando alterações intencionalmente planejadas para agregar finalidades específicas ou mesmo indesejáveis (KLAPPERICH et al., 2001; SIDOUNI et al., 2001; KACZMAREK et al., 2002; AOUINTI et al., 2003; BORCIA et al., 2004; BORCIA et al., 2004a; TAJIMA; KOMVOPOULOS, 2006; SVORCIK et al., 2006).

Dado importante acerca da profundidade de penetração do raio incidente reside no fato de que a mesma é dependente da velocidade do espelho móvel do interferômetro. Assim, é possível obter espectros IR a diferentes profundidades na mesma amostra, variando a velocidade de deslocamento do espelho, o que possibilita aplicação da técnica tendo em vista o estudo das primeiras camadas superficiais de materiais (CAHEN, 1980; CIURCZAK, 1999; KAWANO, 2004).

Tal situação foi confirmada por Yang e colaboradores (1987) que exploraram diferentes padrões de velocidade do espelho móvel *versus* nível de profundidade atingida pela radiação em amostras de algodão, fibra de vidro tratada, fibras de poli(tereftalato de etileno) (PET) e um compósito natural de PVC. Através desse padrão de variação, foi possível investigar inclusive o grau de penetração de certos aditivos nos polímeros escolhidos. O mesmo conceito foi utilizado em investigação acerca da profundidade de penetração e distribuição de aditivos, compostos sulfonados, em filmes de cerca de 88 $\mu$ m de espessura de polietileno de baixa densidade (LDPE) tratados com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para incrementar sua biocompatibilidade. Foram utilizadas diferentes velocidades do espelho do interferômetro, possibilitando

---



---

uma varredura superficial e em diferentes profundidades (SOWA et al., 1996). Filmes de 90 $\mu$ m de espessura de borracha de cloropreno foram submetidos à radiação gama para possibilitar inclusão de 2-hidroxi-etilmetacrilato, sendo avaliado o grau de penetração do composto usando diferentes velocidades de varredura (YUE-E et al., 1999). No âmbito alimentício, diferentes perfis de profundidade foram também demonstrados em estudo envolvendo caracterização de coberturas comestíveis e presença de microrganismos em superfícies de frutas, correlacionando com espectros bi-dimensionais (YANG et al., 2001).

Ao se atentar para os espectros obtidos para os cinco polímeros (Figuras 45 a 49), é possível visualizar interferências (ruídos), o que pode ter como causas variações na fonte, na purga da célula, no sinal óptico e no detector (KAWANO, 2004).

### **6.8 Microscopia Eletrônica de Varredura e Perfilometria**

A técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) tem sido muito utilizada em conjunto com outras técnicas de caracterização de polímeros e outros materiais. Ademais, fornecem informações valiosas a respeito da morfologia de inúmeros tipos de superfícies e subsídios na investigação do seu comportamento frente a situações das mais diferentes naturezas, como efeitos físicos e morfológicos decorrentes de diferenciados processos de tratamento de superfícies. Nos estudos envolvendo biofilmes microbianos, esta técnica permite avaliar a propensão à adesão microbiana devido a análise da rugosidade de superfícies e, paralelamente, a conformação de uma comunidade microbiana aderida.

A literatura relata algumas aplicações desta técnica como, por exemplo, na investigação de efeitos físicos ocasionados na superfície de PEAD e outros polímeros decorrentes da exposição a plasma de pressão atmosférica gerado por descarga DBD (BORCIA et al., 2004), investigação do nível de adesão celular em superfícies de poli(tereftalato de etileno) (PET) submetido a distintos tratamentos de superfície (WANG et al., 2005) e estudo de mudanças estruturais em folhas de 40 $\mu$ m de espessura decorrentes da exposição à plasma de argônio (SVORCIK et al., 2006).

---

---

Recentes avanços envolvendo MEV foram relatados por Clode (2006), onde foi desenvolvido sistema de microscopia utilizando diferentes pressões de vácuo. Os resultados elucidaram aspectos que melhoram significativamente a execução da técnica analítica e a condição dos dados gerados proporcionando, por exemplo, que a amostra analisada não precise ser recoberta por camada superficial de metal condutivo para possibilitar visualização das imagens, bem como melhorando aspectos relacionados à qualidade das imagens fornecidas pelo equipamento, como por exemplo, o contraste.

No presente trabalho, observa-se a existência de limitações para avaliação de sutis diferenças na rugosidade dos polímeros expostos ocasionadas por ambos os sistemas de plasma (RIE e ICP), bem como para ambos os gases ( $O_2$  e sua mistura com  $H_2O_2$ ) para a maioria das combinações, exceto para o PP e o PUR. Neste, por sua vez, pode ser observado claramente que o maior aumento da rugosidade foi relacionado ao sistema ICP quando utilizado a mistura gasosa  $O_2 + H_2O_2$  (Figuras 52 e 53).

As fotomicrografias denotam mudança visual na rugosidade de todos os polímeros expostos, em comparação com os polímeros não expostos. Este perfil padrão se repetiu nos valores numéricos relativos à Rugosidade média ( $R_a$ ) coletados por perfilometria para todas as combinações de parâmetros de plasma. (Tabela 40).

---

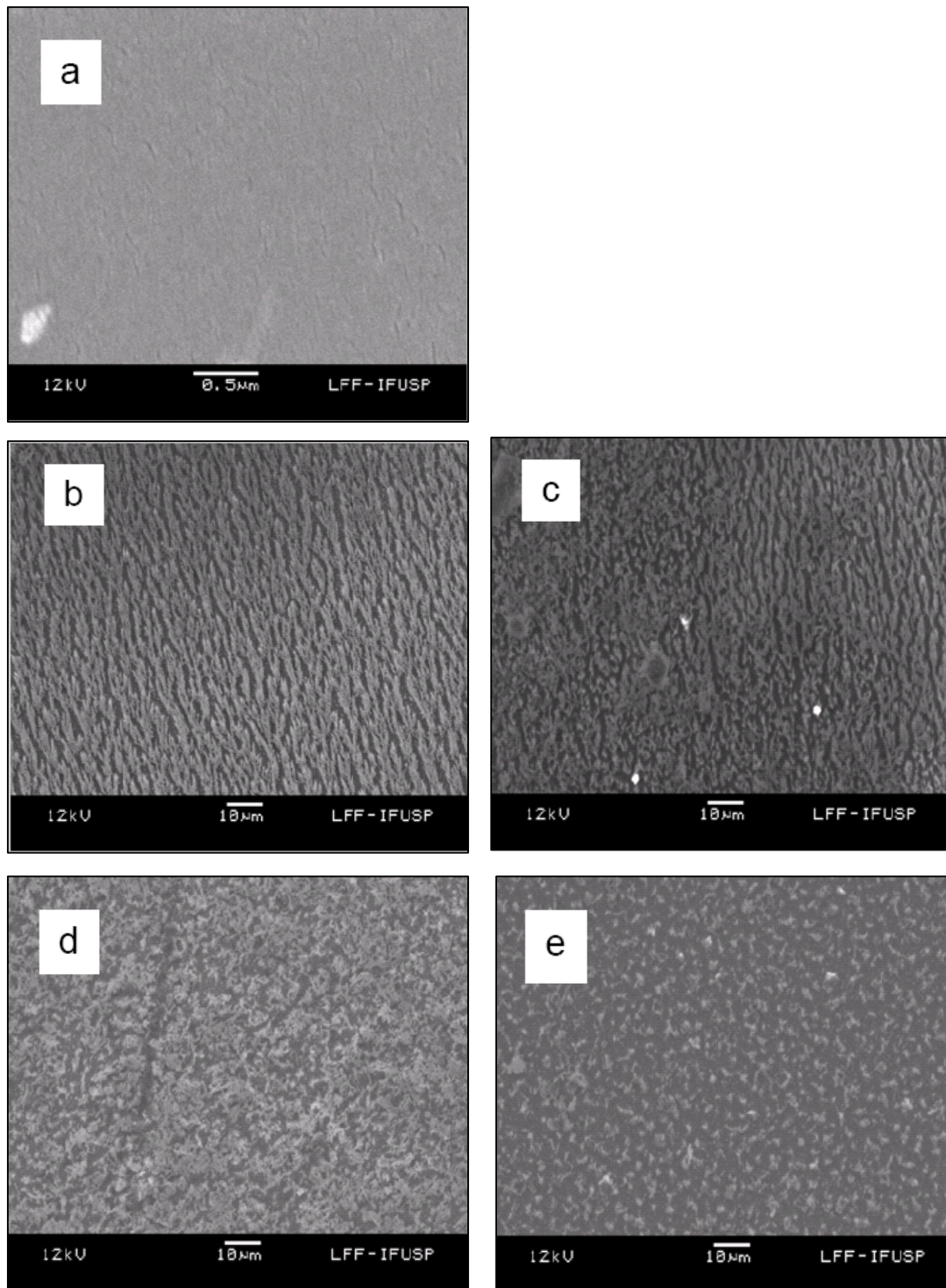


Figura 50 – Fotomicrografias do PVC obtidas por MEV. (a) Aumento de 37000 vezes; (b, c, d, e) aumento de 1000 vezes. a- PVC não exposto; b- PVC (RIE-O<sub>2</sub>); c- PVC (RIE-O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); d- PVC (ICP-O<sub>2</sub>); e- PVC (ICP-O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

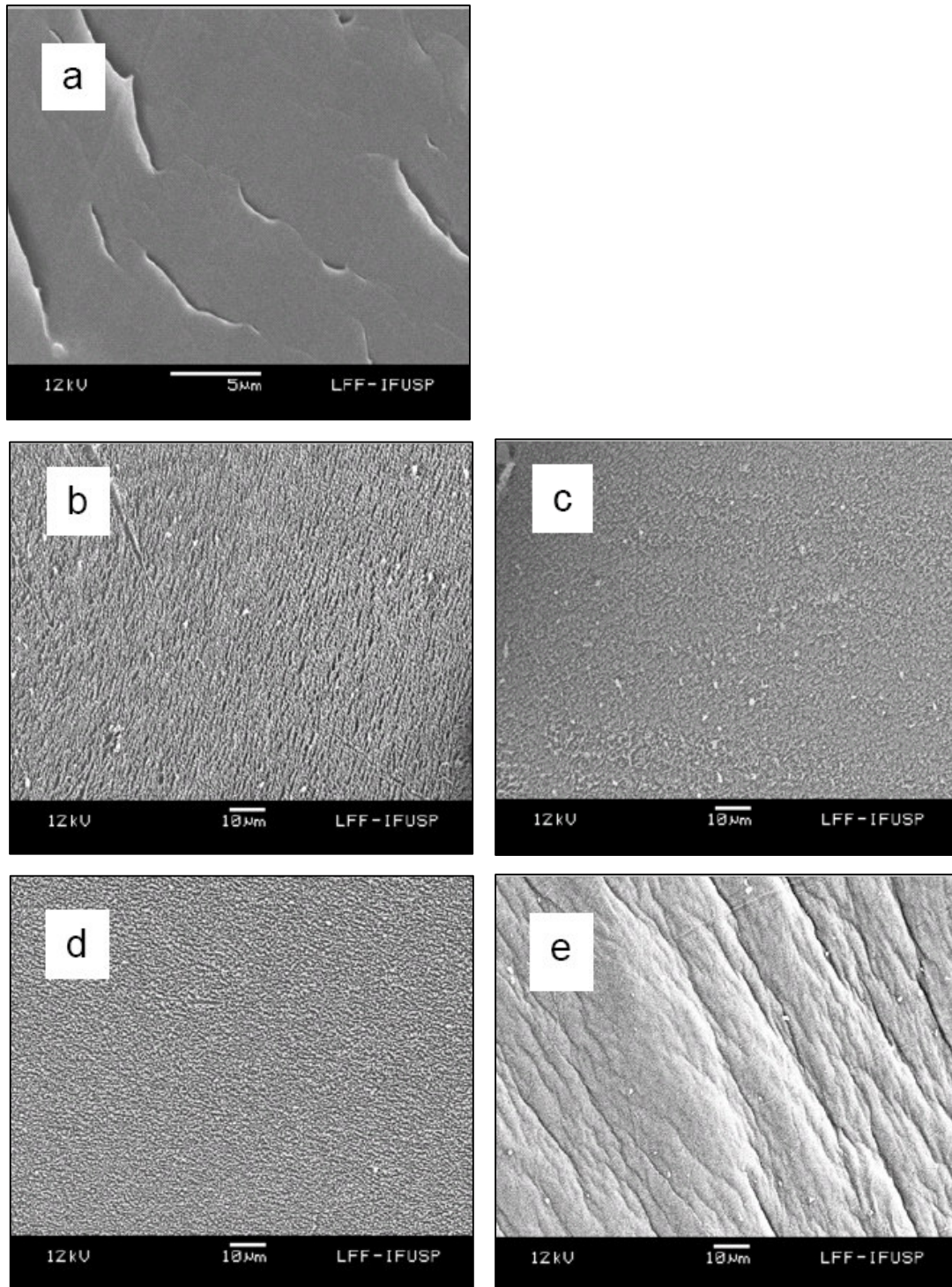


Figura 51 – Fotomicrografias do PEAD obtidas por MEV. (a) Aumento de 5000 vezes; (b, c, d, e) Aumento de 1000 vezes. a- PEAD não exposto; b- PEAD (RIE-O<sub>2</sub>); c- PEAD (RIE-O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); d- PEAD (ICP-O<sub>2</sub>); e- PEAD (ICP-O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

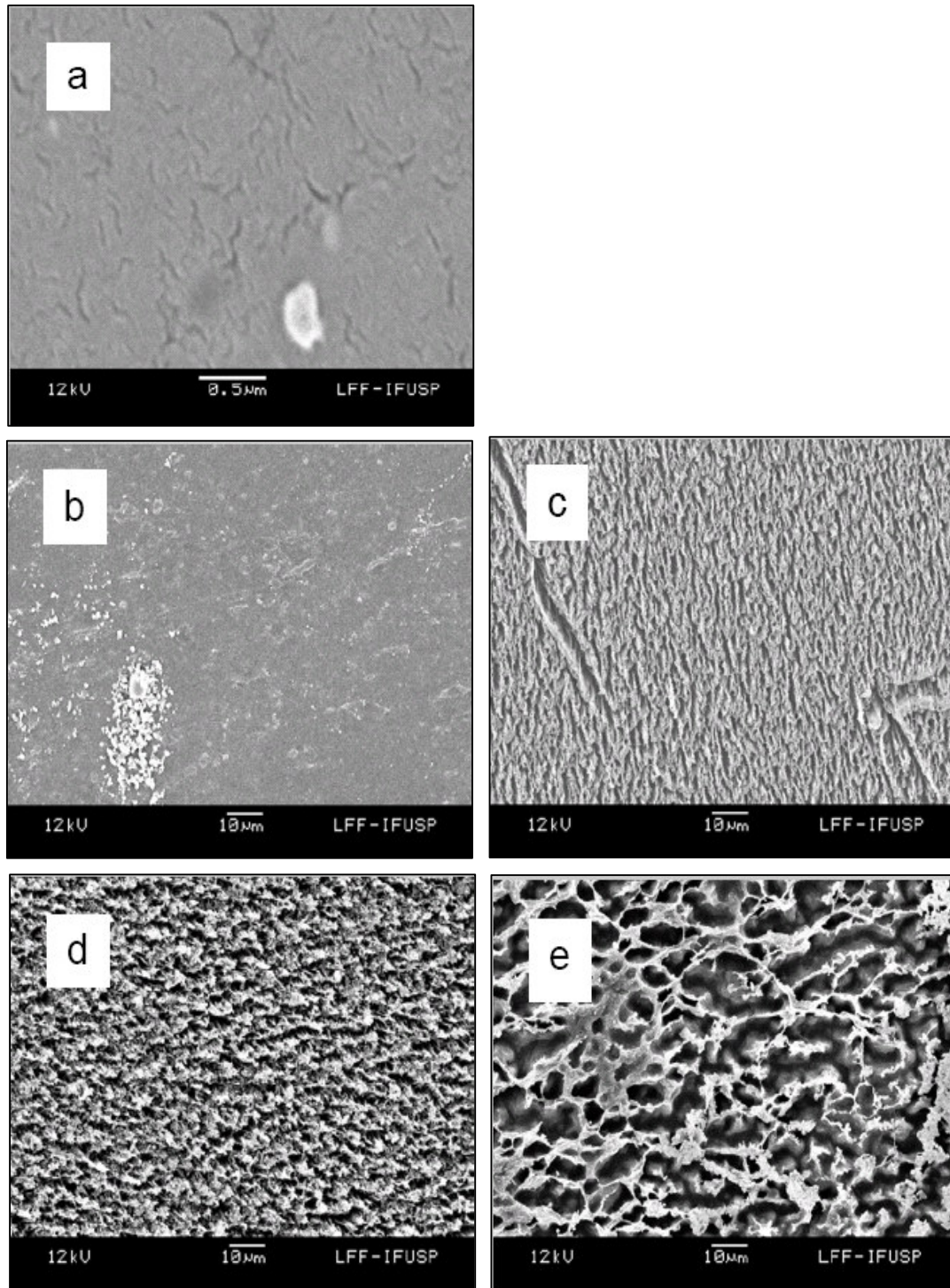


Figura 52 – Fotomicrografias do PP obtidas por MEV. (a) Aumento de 37000 vezes; (b, c, d, e) Aumento de 1000 vezes. a- PP não exposto; b- PP (RIE-O<sub>2</sub>); c- PP (RIE-O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); d- PP (ICP-O<sub>2</sub>); e- PP (ICP-O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

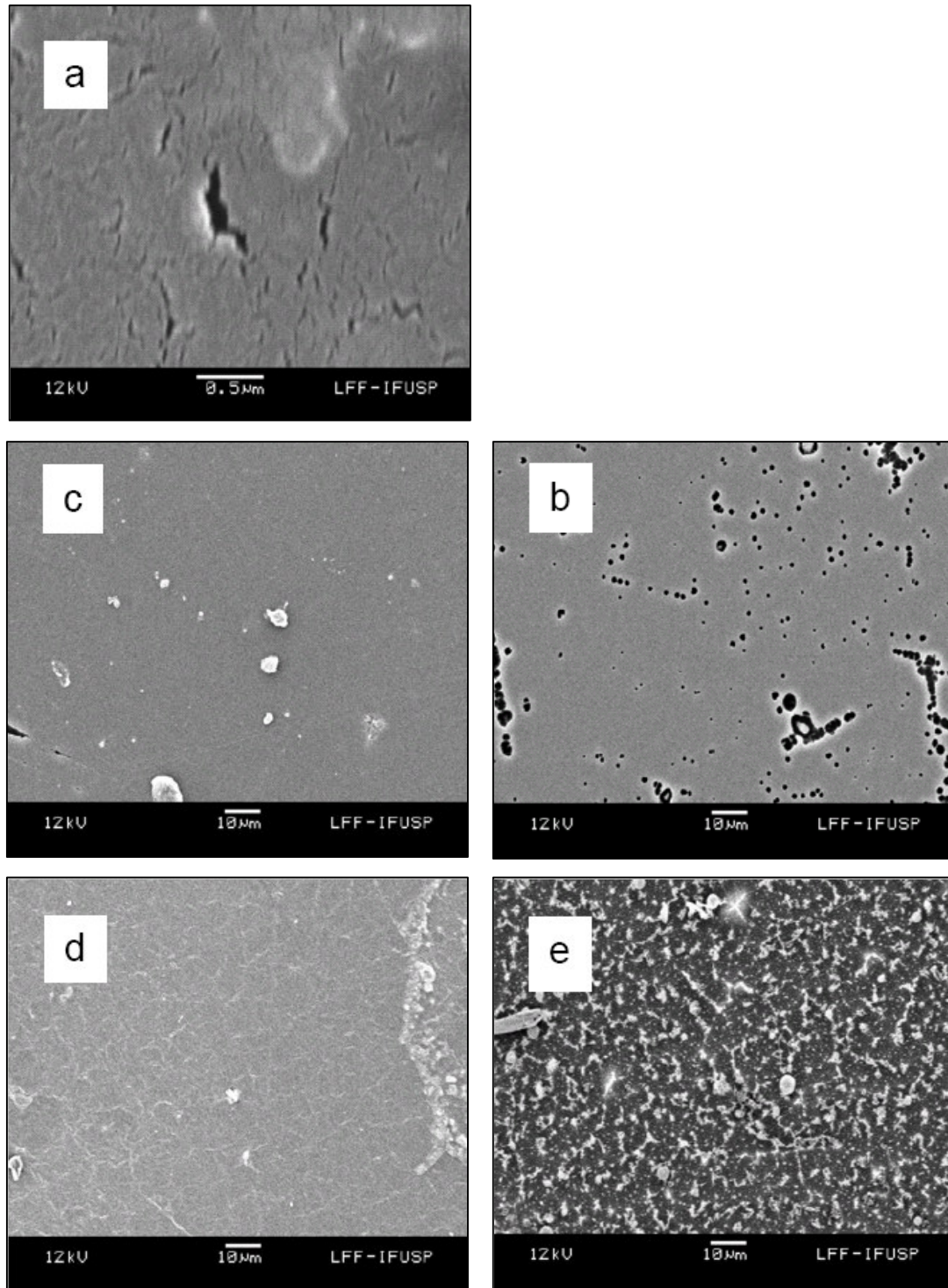


Figura 53 – Fotomicrografias do PUR obtidas por MEV. (a) Aumento de 37000 vezes; (b, c, d, e) Aumento de 1000 vezes. a- PUR não exposto; b- PUR (RIE-O<sub>2</sub>); c- PUR (RIE-O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); d- PUR (ICP-O<sub>2</sub>); e- PUR (ICP-O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

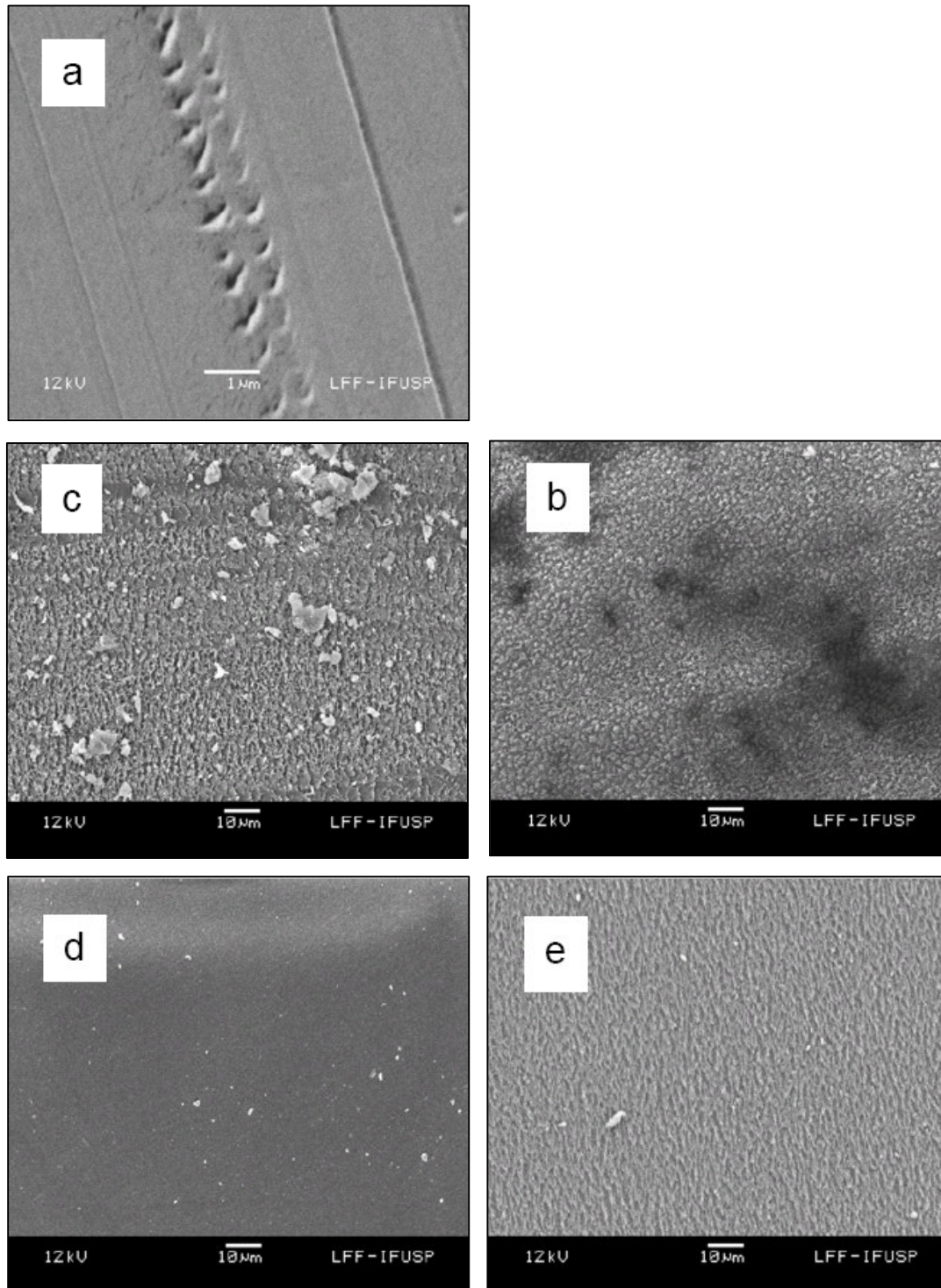


Figura 54 – Fotomicrografias do PC obtidas por MEV. (a, b, c, d, e) Aumento de 1000 vezes. a- PC não exposto; b- PC (RIE-O<sub>2</sub>); c- PC (RIE-O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); d- PC (ICP-O<sub>2</sub>); e- PC (ICP-O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Tabela 40 – Resultados relativos à Rugosidade média (Ra) em nanômetros (nm) e a rugosidade pico a pico (Rt) em nm obtidos para as vinte e cinco amostras dos distintos polímeros (cinco não expostos e vinte expostos) para as combinações de parâmetros usadas.

Polímeros	Condições	Rugosidade (nm) média (Ra)	Rugosidade (nm) pico a pico (Rt)
PVC	PVC não exposto	188	71
	PVC – RIE-O <sub>2</sub>	1236	1109
	PVC – RIE-O <sub>2</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1977	1623
	PVC – ICP-O <sub>2</sub>	1756	776
	PVC – ICP-O <sub>2</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2883	959
PEAD	PEAD não exposto	4437	2277
	PEAD – RIE-O <sub>2</sub>	346	593
	PEAD – RIE-O <sub>2</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	445	4640
	PEAD – ICP-O <sub>2</sub>	353	2256
	PEAD – ICP-O <sub>2</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	540	4048
PP	PP não exposto	1677	953
	PP – RIE-O <sub>2</sub>	1848	778
	PP – RIE-O <sub>2</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	4052	810
	PP – ICP-O <sub>2</sub>	3017	951
	PP – ICP-O <sub>2</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	5087	2694
PUR	PUR não exposto	1546	1987
	PUR – RIE-O <sub>2</sub>	3069	606
	PUR – RIE-O <sub>2</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3325	985
	PUR – ICP-O <sub>2</sub>	3380	1650
	PUR – ICP-O <sub>2</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	5846	928
PC	PC não exposto	364	104
	PC – RIE-O <sub>2</sub>	2448	683
	PC – RIE-O <sub>2</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2612	527
	PC – ICP-O <sub>2</sub>	2581	1702
	PC – ICP-O <sub>2</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2720	1525

**Legenda:** RIE-O<sub>2</sub> = plasma com acoplamento capacitivo usando gás O<sub>2</sub>

RIE-O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = plasma com acoplamento capacitivo usando mistura de gases O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

ICP-O<sub>2</sub> = plasma de alta densidade com acoplamento indutivo usando gás O<sub>2</sub>

ICP-O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = plasma de alta densidade com acoplamento indutivo usando mistura de gases O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

PVC = poli (cloreto de vinila)

PEAD = polietileno de alta densidade

PP = polipropileno

PUR = poliuretano

PC = policarbonato



---

Desta forma, buscou-se correlacionar os resultados numéricos obtidos pela perfilometria com o panorama visual da microscopia, a fim de se esclarecer a influência de ambos os sistemas de plasma (RIE e ICP), e aquela do O<sub>2</sub> puro e sua mistura utilizando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tendo sido então verificado um padrão definido para tais mudanças.

Na busca por métodos que aumentem a biocompatibilidade de próteses, a técnica de perfilometria mostrou-se ferramenta útil na avaliação da rugosidade de diferentes biocerâmicas utilizadas como substrato para o crescimento de células derivadas de ossos humanos, tendo sido verificada sua influência na biocompatibilidade das mesmas, juntamente com as características químicas de tais substratos (ZREIQAT et al., 1999).

Padrão diferenciado de rugosidade foi encontrado em experimentos de Gorna e Gogolewski, onde a técnica de perfilometria evidenciou situações de aumento e diminuição na Rugosidade média (Ra), variando conforme o tipo de gás utilizado na geração de plasma. Para alguns casos, o valor chegou a ser 200% maior do que a rugosidade inicial (polímeros não expostos). Entretanto, os motivos para tal variação foram duvidosos, levando os autores a sugerir estudos adicionais (GORNA; GOGOLEWSKI, 2003).

No presente estudo, ao se comparar a rugosidade média (Ra) das amostras expostas, pode-se verificar que, considerando ambos os sistemas de plasma, os maiores valores foram obtidos para o sistema ICP, para ambos os gases (Tabela 40). Este sistema utiliza duas fontes de geração de potência no interior do reator, uma superior indutiva (bobina) e outro inferior capacitivo (eletrodo), enquanto que o sistema RIE utiliza somente o eletrodo capacitivo. Este fato, por sua vez, possibilitou observar que a potência aplicada ao sistema ICP (300 W) quando comparada ao sistema RIE (150 W) pode ter causado maior magnitude de ataque das entidades reativas à superfície dos polímeros expostos ao plasma sistema ICP, alterando em maior nível a rugosidade dos polímeros. A influência do aumento da potência de RF também foi investigada por Soloshenko e colaboradores em estudos de eficácia esterilizante (SOLOSHENKO et al., 1999).

Por outro lado, quando se considera a influência de ambos os gases (O<sub>2</sub> puro e sua mistura utilizando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) verifica-se que a maior alteração da rugosidade foi

---

---

devida à mistura  $O_2 + H_2O_2$  para todos os polímeros expostos e considerando ambos os sistemas de plasma (Tabela 40). Provável explicação pode estar atrelada à potencialização do  $O_2$  pelo  $H_2O_2$ . Esta mistura pode ser capaz de gerar entidades muito mais reativas (principalmente  $HO^\ominus$  e  $HO_2^\ominus$ ) quando comparadas àquelas geradas somente por plasma de oxigênio, principalmente, (O), potencialização que também foi verificada em estudos de eficácia esterilizante efetuados por outros autores (LEROUGE et al., 2000c; SOLOSHENKO et al., 2002).

Em experimento com LDPE submetido à plasma em sistema ICP usando gás Ar, pressão de 0,5 Torr, potência de RF em 1200 W, fluxo de gás em 100 sccm e tempo de exposição de 15min foram obtidos padrões de aumento de rugosidade, através de Microscopia de Força Atômica (AFM), acompanhando a distância da amostra com relação à fonte de potência (0, 30 e 58 cm) (TAJIMA; KOMVOPOULOS, 2006).

Aumento do perfil de rugosidade também foi evidenciado para amostras de filmes de  $5\text{ cm}^2$  e  $100\ \mu\text{m}$  de espessura de PP expostas em sistema de plasma de micro-ondas usando gás  $CO_2$ , potência de 60 W e fluxo de gás de 20 sccm. Tais perfis foram diretamente proporcionais ao tempo de exposição que variou entre 30s e 9 min, tendo sido evidenciados por AFM (AQUINTI et al., 2003).

Foi interessante notar na Tabela 40 que o PEAD não exposto apresentou Rugosidade média (Ra) de 4.437, portanto, muito superior à rugosidade média dos polímeros expostos (valores entre 346 e 540), o que não aconteceu para os outros quatro polímeros, revelando situação um tanto incoerente num primeiro momento. Entretanto, quando se atenta para as fotomicrografias do PEAD não exposto e amostras expostas ao plasma, fica clara a alteração da rugosidade dos polímeros expostos frente ao não exposto, sendo que a fotomicrografia mostra ainda grandes fissuras no PEAD que não foi submetido ao processo. Desta forma, considera-se que podem ter havido limitações analíticas no momento do dimensionamento da Rugosidade média dessa amostra. A ocorrência de desvio da agulha ao atingir uma dessas grandes fissuras pode gerar, então, um valor que corresponderia à altura do degrau da fissura e não das imperfeições inerentes à rugosidade do material não exposto, sendo este valor de cerca de dez vezes maior quando comparado àqueles obtidos para os polímeros expostos (Tabela 40). Estas considerações podem ser

---

---

suportadas por Verdonck em trabalho de pesquisa utilizando perfilometria (VERDONCK, 1998).

Trabalho de Svorcik e colaboradores ajudou a elucidar a questão apresentada anteriormente. Folhas de PEAD foram expostas a plasma de Ar e avaliadas quanto à modificações químicas de superfície (oxidação), ablação, propriedades hidrofílicas e mudança no padrão de rugosidade. Após crescentes tempos de exposição variando entre zero e 400s e potência de 1,7W, ocorreu pronunciado aumento na rugosidade do polímero, proporcional aos tempos de exposição e evidenciado por técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Microscopia de Força Atômica (SVORCIK et al., 2006).

Investigando alterações superficiais intencionais a fim de melhorar características desejadas, diversos polímeros foram expostos a plasma de pressão atmosférica e descarga de barreira dielétrica (DBD). Mudanças intensas foram observadas para todas as amostras, especialmente o PEAD, que sofreu alteração em apenas 5s de exposição (evidenciada por MEV) (BORCIA et al., 2004).

Tais pesquisas suportam a tese de erro analítico, indicando que o PEAD sofre aumento no padrão de rugosidade após exposição ao processo por plasma.

Alterações na superfície dos polímeros, como o aumento da rugosidade, favorecem o processo de adesão microbiana. A propensão para que as bactérias colonizem superfícies é vantajoso do ponto de vista ecológico, pois os microorganismos especializados em locais específicos incentivam relações simbióticas. A inclinação para que as bactérias tornem-se vinculados à superfície é tão onipresente nos diversos ecossistemas que sugere uma forte sobrevivência e/ou vantagem seletiva para aqueles presentes em superfícies sobre o alcance de seus homólogos livres.

Pode haver uma explicação óbvia para a adesão bacteriana, pois os nutrientes em meio aquoso, tendem a concentrar-se junto a uma superfície sólida (ZOBELL, 1937). Muitas estruturas especializadas e complexas interações ligantes evoluíram nos microrganismos procariotas especificamente para o reconhecimento da superfície. A formação de biofilmes constitui-se em outro indício de apoio à importância da adesão microbiana (AN et al., 2000; BOLAND, et al., 2000). Do ponto de vista evolutivo, a vantagem seletiva de adesão bacteriana tem sido postulada a

---

---

favor da localização da superfície vinculada a populações bacterianas nutricionalmente favorável, não em ambientes hostis. Adicionalmente, fornecem algum nível de proteção contra a predação externa (COSTERTON; LAPPIN-SCOTT, 1995a).

É importante lembrar, entretanto, que o primeiro contato geralmente ocorre entre o organismo e a superfície condicionante e a hidrofobicidade deste pode variar muito dependendo das moléculas presentes no filme condicionante. Por exemplo, Wang e colaboradores (1993) demonstraram que a adesão primária de *Staphylococcus epidermidis*, em discos de polietileno, foi reforçada com a presença de superfícies ativas (rugosas) e redução de proteínas plasmáticas adsorvidas em relação ao polietileno não revestido. Usando polimetilmetacrilato como substrato, Herrmann e colaboradores (1998) demonstraram que a adesão de *Staphylococcus coagulase-negativo* foi reforçada quando a superfície foi revestida com várias proteínas plasmáticas, incluindo fibronectina. Dunne e Burd (1993), no entanto, forneceram provas de que a fibronectina e fragmentos proteolíticos de fibronectina produziram redução da adesão de *S. epidermidis* em superfícies revestidas de plásticos.

A repulsão líquida entre duas superfícies pode ser superada pelas interações moleculares específicas mediadas por adesinas localizadas em estruturas que se estendem desde a superfície da célula, como o pili (AN et al., 2000; BOLAND, et al., 2000). A longevidade da adesão primária depende da soma total de todas essas variáveis, entretanto, a química entre as superfícies empurra o equilíbrio em favor da adesão ao prever que as substâncias orgânicas em solução se concentrarão perto de uma superfície e que os microrganismos tendem a se reunir em ambientes ricos em nutrientes (ZOBELL, 1937; CARPENTIER; CERF, 1993; COSTERTON et al., 1995).

A segunda etapa da adesão é caracterizada pela fixação, sendo mediada molecularmente por adesinas específicas e superfície (AN et al., 2000). Neste ponto, os microrganismos não ligados completamente consolidam o processo de adesão ao produzirem um complexo de diferentes exopolímeros e/ou ligantes de receptores específicos localizados em pili, fímbrias, fibrilas, etc. Na conclusão da segunda fase, a adesão se torna irreversível na ausência de intervenção física ou química e o organismo permanece firmemente aderido à superfície. Além da teoria DLVO usada

---

---

para descrever a adesão microbiana através de interações atrativas (força de van der Waals) e repulsivas (eletrostática) (GARRET et al., 2008), outras teorias têm sido empregadas em termos de interações hidrofóbicas/hidrofílicas e osmótica (CHANG; CHANG, 2002) e, até mesmo, análise termodinâmica para descrever este fenômeno (GALLARDO-MORENO et al., 2002).

A composição heterogênea dos biofilmes, a formação de microambientes, e conseqüentemente, as expressões genéticas diferenciadas predisõem a dificuldades adicionais para sua eliminação (OJHA; HATFULL, 2007). Entretanto, Kolodkin-Gal e colaboradores (2010), demonstraram que antes da desagregação do biofilme de *Bacillus subtilis*, o próprio microrganismo produz um fator que previne a formação deste. O fator foi apresentado como sendo uma mistura de D-aminoácidos (D-leucina, D-metionina, D-tirosina e D-triptofano) que pode ser ativado em concentrações nanomolares. O tratamento com D-aminoácidos causa uma liberação de fibras amiloides que estão ligadas ao biofilme. Mutantes capazes de formar biofilmes na presença de D-aminoácidos contêm alterações na proteína (YqxM) necessária para a formação e fixação das fibras para a célula. Este fator também impediu a formação de biofilmes de *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Sendo produzidos por muitas bactérias, este fator pode se tornar uma importante ferramenta na eliminação de sistemas de biofilmes.

### **6.9 Microanálise em Sistema *Energy Dispersive Spectroscopy***

Informações sobre possíveis mudanças na distribuição atômica dos polímeros após submissão aos processos podem ser obtidas através de microanálise, representando também recurso adicional a fim de elucidar o grau de oxidação das primeiras camadas superficiais expostas, através da obtenção das concentrações elementares das amostras em percentagem e sua posterior razão atômica entre oxigênio e carbono (O/C) (STROBEL et al., 1995; LEROUGE et al., 2000a; SIDOUNI et al., 2001; AOUINTI et al., 2003; GORNA; GOGOLEWSKI, 2003; BORCIA et al., 2004; BORCIA et al., 2004a; VINOGRADOV; LUNK, 2005; WANG et al., 2005).

Para que isso fosse possível, foi utilizado mais uma vez o Microscópio Eletrônico de Varredura, dotado de sistema *Energy Dispersive Spectroscopy* que

---

---

possibilitou identificação e quantificação dos elementos químicos dos polímeros expostos e não expostos aos processos de plasma RIE e ICP. A profundidade do feixe de elétrons respeitou as primeiras camadas iniciais e se restringiu a 0,5 $\mu$ m.

Sistema similar EDS empregando raios X mostrou-se poderosa ferramenta na caracterização de ionômeros de polietileno-ácido metacrílico recristalizados contendo elementos como Na e Zn, bem como quantificação dos átomos de carbono dos agregados, tendo sido usada varredura superficial de 1nm de profundidade (TAUBERT; WINEY, 2002).

Os valores apresentados nas Tabelas 41 a 45 evidenciam aumento da razão O/C das chapas poliméricas expostas a todas as condições de plasma. Em todos os polímeros estudados (PVC, PEAD, PP, PUR e PC) foi demonstrada a atuação das entidades reativas do plasma (O, HO $^{\circ}$ , HO $_2^{\circ}$  e outros) na promoção de novas ligações químicas envolvendo átomos de oxigênio, bem como suportando os achados de vários pesquisadores quanto à promoção dessa oxidação polimérica abrangendo as primeiras camadas superficiais (KLAPPERICH et al., 2001; KACZMAREK et al., 2002; AOUINTI et al., 2003; BORCIA et al., 2004; BORCIA et al., 2004a; TAJIMA; KOMVOPOULOS, 2006; SVORCIK et al., 2006).

---

Tabela 41 – Resultados da avaliação semi-quantitativa dos elementos químicos, distribuição atômica em porcentagem (%) e razão entre o elemento oxigênio e o elemento carbono (O/C), para o PVC (SEM JEOL 6460L) exposto aos sistemas RIE e ICP.

Elemento Químico	Combinações de parâmetros (PVC e sistemas de plasma)				
	PVC	PVC	PVC	PVC	PVC
	Não exposto	RIE-O <sub>2</sub>	RIE-O <sub>2</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	ICP-O <sub>2</sub>	ICP-O <sub>2</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<b>C</b>	88,6	84,31	82,03	82,95	69,34
<b>N</b>	0	0	0	0	0,37
<b>O</b>	9,36	14,31	16,01	16,01	27,58
<b>F</b>	0	0,27	0	0	0
<b>Na</b>	0,25	0,28	0,31	0	0,41
<b>Al</b>	0,43	0,52	0	0,07	0,67
<b>Si</b>	0,22	0	0,14	0	0,32
<b>Cl</b>	1,14	0,22	1,05	1,04	1,17
<b>K</b>	0	0,1	0,08	0	0,14
<b>Ti</b>	0	0	0	0	0
<b>Br</b>	0	0	0	0	0
<b>Sn</b>	0	0	0	0	0
<b>Ca</b>	0	0	0	0	0
<b>Razão O/C</b>	0,1	0,17	0,2	0,19	0,4

**Legenda:** RIE-O<sub>2</sub> = plasma com acoplamento capacitivo usando gás O<sub>2</sub>

RIE-O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = plasma com acoplamento capacitivo usando gás O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

ICP-O<sub>2</sub> = plasma de alta densidade com acoplamento indutivo usando gás O<sub>2</sub>

ICP-O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = plasma de alta densidade com acoplamento indutivo usando mistura de gases O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Tabela 42– Resultados da avaliação semi-quantitativa dos elementos químicos, distribuição atômica em porcentagem (%) e razão entre o elemento oxigênio e o elemento carbono (O/C), para o PEAD (SEM JEOL 6460L) exposto aos sistemas RIE e ICP.

Elemento Químico	Combinações de parâmetros (PEAD e sistemas de plasma)				
	PEAD	PEAD	PEAD	PEAD	PEAD
	Não exposto	RIE-O <sub>2</sub>	RIE-O <sub>2</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	ICP-O <sub>2</sub>	ICP-O <sub>2</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<b>C</b>	92,8	71,35	65,38	67,6	62,65
<b>N</b>	3,43	0	0	0	0
<b>O</b>	2,22	26,05	33,4	32,1	37,35
<b>F</b>	0	0	0	0	0
<b>Na</b>	0,13	0,73	0,35	0	0
<b>Al</b>	0	0,72	0,48	0,3	0
<b>Si</b>	0,13	0	0	0	0
<b>Cl</b>	0,65	0,67	0,39	0	0
<b>K</b>	0	0	0	0	0
<b>Ti</b>	0	0	0	0	0
<b>Br</b>	0,63	0	0	0	0
<b>Sn</b>	0	0	0	0	0
<b>Ca</b>	0	0,48	0	0	0
<b>Razão O/C</b>	0,02	0,36	0,51	0,47	0,6

**Legenda:** RIE-O<sub>2</sub> = plasma com acoplamento capacitivo usando gás O<sub>2</sub>  
 RIE-O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = plasma com acoplamento capacitivo usando gás O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
 ICP-O<sub>2</sub> = plasma de alta densidade com acoplamento indutivo usando gás O<sub>2</sub>  
 ICP-O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = plasma de alta densidade com acoplamento indutivo usando mistura de gases O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



Tabela 43 – Resultados da avaliação semi-quantitativa dos elementos químicos, distribuição atômica em porcentagem (%) e razão entre o elemento oxigênio e o elemento carbono (O/C), para o PP (SEM JEOL 6460L) exposto aos sistemas RIE e ICP.

Elemento Químico	Combinações de parâmetros (PP e sistemas de plasma)				
	PP	PP	PP	PP	PP
	Não exposto	RIE-O <sub>2</sub>	RIE-O <sub>2</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	ICP-O <sub>2</sub>	ICP-O <sub>2</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<b>C</b>	91,77	76,08	74,16	75,72	71,05
<b>N</b>	0	0,65	0	0	0,13
<b>O</b>	7,03	20,55	25,5	23,85	26,47
<b>F</b>	0	0	0	0	0
<b>Na</b>	0,58	0	0,19	0	0,48
<b>Al</b>	0	0,76	0	0,43	0
<b>Si</b>	0,11	0	0	0	0,24
<b>Cl</b>	0	0,16	0,15	0	1,11
<b>K</b>	0,08	0	0	0	0
<b>Ti</b>	0	0,18	0	0	0,02
<b>Br</b>	0,43	0	0	0	0,51
<b>Sn</b>	0	1,6	0	0	0
<b>Ca</b>	0	0	0	0	0
<b>Razão O/C</b>	0,08	0,27	0,34	0,31	0,37

**Legenda:** RIE-O<sub>2</sub> = plasma com acoplamento capacitivo usando gás O<sub>2</sub>  
 RIE-O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = plasma com acoplamento capacitivo usando gás O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
 ICP-O<sub>2</sub> = plasma de alta densidade com acoplamento indutivo usando gás O<sub>2</sub>  
 ICP-O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = plasma de alta densidade com acoplamento indutivo usando mistura de gases O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Tabela 44 – Resultados da avaliação semi-quantitativa dos elementos químicos, distribuição atômica em porcentagem (%) e razão entre o elemento oxigênio e o elemento carbono (O/C), para o PUR (SEM JEOL 6460L) exposto aos sistemas RIE e ICP.

Elemento Químico	Combinações de parâmetros (PUR e sistemas de plasma)				
	PUR	PUR	PUR	PUR	PUR
	Não exposto	RIE-O <sub>2</sub>	RIE-O <sub>2</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	ICP-O <sub>2</sub>	ICP-O <sub>2</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<b>C</b>	78,56	76,15	61,63	71,79	58,46
<b>N</b>	3,67	4,31	13,12	6,6	7,35
<b>O</b>	16,62	18,81	22,86	20,4	32,66
<b>F</b>	0	0	0,49	0	0
<b>Na</b>	0	0,11	0,37	0,42	0,53
<b>Al</b>	0,09	0	0,47	0,28	0,08
<b>Si</b>	0,2	0	0	0	0
<b>Cl</b>	0,85	0,62	0,54	0,37	0,52
<b>K</b>	0	0	0	0,13	0,2
<b>Ti</b>	0	0	0	0	0
<b>Br</b>	0	0	0	0	0
<b>Sn</b>	0	0	0,46	0	0
<b>Ca</b>	0	0	0,07	0	0
<b>Razão O/C</b>	0,21	0,24	0,37	0,28	0,56

**Legenda:** RIE-O<sub>2</sub> = plasma com acoplamento capacitivo usando gás O<sub>2</sub>  
 RIE-O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = plasma com acoplamento capacitivo usando gás O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
 ICP-O<sub>2</sub> = plasma de alta densidade com acoplamento indutivo usando gás O<sub>2</sub>  
 ICP-O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = plasma de alta densidade com acoplamento indutivo usando mistura de gases O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Tabela 45 – Resultados da avaliação semi-quantitativa dos elementos químicos, distribuição atômica em porcentagem (%) e razão entre o elemento oxigênio e o elemento carbono (O/C), para o PC (SEM JEOL 6460L) exposto aos sistemas RIE e ICP.

Elemento Químico	Combinações de parâmetros (PC e sistemas de plasma)				
	PC	PC	PC	PC	PC
	Não exposto	RIE-O <sub>2</sub>	RIE-O <sub>2</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	ICP-O <sub>2</sub>	ICP-O <sub>2</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<b>C</b>	85,03	83,71	82,68	83,86	81,33
<b>N</b>	0	0	0	0	0
<b>O</b>	14,19	15,77	16,6	16	18,26
<b>F</b>	0	0	0	0	0
<b>Na</b>	0,19	0,19	0,18	0	0
<b>Al</b>	0,32	0,33	0,41	0	0,38
<b>Si</b>	0	0	0	0,14	0
<b>Cl</b>	0,17	0	0,13	0	0
<b>K</b>	0	0	0	0	0
<b>Ti</b>	0	0	0	0	0
<b>Br</b>	0	0	0	0	0
<b>Sn</b>	0	0	0	0	0
<b>Ca</b>	0,1	0	0	0	0
<b>Razão O/C</b>	0,17	0,19	0,37	0,19	0,22

**Legenda:** RIE-O<sub>2</sub> = plasma com acoplamento capacitivo usando gás O<sub>2</sub>  
 RIE-O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = plasma com acoplamento capacitivo usando gás O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
 ICP-O<sub>2</sub> = plasma de alta densidade com acoplamento indutivo usando gás O<sub>2</sub>  
 ICP-O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = plasma de alta densidade com acoplamento indutivo usando mistura de gases O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Adicionalmente, esses resultados são especialmente concordantes com distintas fases das pesquisas de Lerouge e colaboradores (2000a; 2002) que verificaram que uma varredura (usando espectroscopia vibracional) em camadas mais profundas não pode detectar oxidação por plasma nos polímeros estudados, mas tal fenômeno efetivamente ocorreu e pode ser detectado somente nas camadas mais superficiais usando a técnica de Espectroscopia Fotoeletrônica de Raios X (XPS).

Ao se atentar detalhadamente para os resultados da razão O/C no presente estudo, evidencia-se suporte aos dados gerados pela MEV e Perfilometria, onde os maiores graus de oxidação ocorreram a partir da exposição dos polímeros em sistema ICP, para ambos os gases. No sistema ICP, a utilização dos dois geradores de potência (bobina e eletrodo) resultando em maior potência aplicada (300W) levou a um aumento na magnitude de ataque das entidades reativas à superfície dos polímeros expostos ao plasma sistema ICP e acarretando maior nível de oxidação, ou seja, maior valor de razão atômica entre oxigênio e carbono (Tabelas 41 a 45). Soloshenko e colaboradores, em estudos de eficácia esterilizante, também evidenciaram que o aumento da potência de RF promoveu maior letalidade de microrganismos (SOLOSHENKO et al., 1999).

Em se considerando a influência de ambos os gases, O<sub>2</sub> puro e sua mistura utilizando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, verifica-se que o maior nível de oxidação foi devido à mistura O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para todos os polímeros expostos e considerando ambos os sistemas de plasma (Tabela 41 a 45). Mais uma vez, tal situação pode estar atrelada à potencialização do O<sub>2</sub> pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mistura esta capaz de gerar entidades muito mais reativas (principalmente HO<sup>o</sup> e HO<sub>2</sub><sup>o</sup>) quando comparadas àquelas geradas somente por plasma de oxigênio (principalmente (O)), potencialização que também foi verificada em estudos de eficácia esterilizante efetuados por outros autores (LEROUGE et al., 2000c; SOLOSHENKO et al., 2002).

Adicionalmente, os dados coletados pela técnica de micro análise (EDS) mostraram a presença de outros elementos distintos das estruturas originais dos polímeros estudados, como flúor, sódio, silício, alumínio, potássio, titânio, bromo, estanho e cálcio, em proporções variáveis. A razão pode estar atrelada à possível contaminação da câmara de plasma utilizada para o presente estudo, que se destina também a estudos de corrosão de outros materiais de natureza química diversa. Lerouge e colaboradores também obtiveram presença de silício na superfície dos cateteres de PUR estudados, fato atribuído a possível contaminação durante o processamento de tais peças (LEROUGE et al., 2000a).

A oxidação da superfície de polímeros tem sido amplamente relatada na literatura, tendo em vista trabalhos de pesquisa realizados por diversos autores, como sendo o efeito mais comum da exposição aos mais diversos tipos de sistemas de plasma (STROBEL et al., 1995; LEROUGE et al., 2000a; SIDOUNI et al., 2001;

---

LEROUGE et al., 2002; AOUINTI et al., 2003; BORCIA et al., 2004; BORCIA et al., 2004a; VINOGRADOV; LUNK, 2005; WANG et al., 2005).

Sistemas de plasma envolvendo descarga de barreira dielétrica, sistema de geração por chama e descarga de micro-ondas em ar ambiente foram testados em filmes de PP e PET e evidenciadas a rápida oxidação de ambas as superfícies, sendo obtidas razões O/C maiores do que 0,10 em apenas 0,5 segundo de exposição (STROBEL et al., 1995).

Polímeros que normalmente não contém oxigênio na estrutura original (PVC, PEAD, LDPE, PTFE, PS) (BORCIA et al., 2004) e outros providos dessa ligação (Nylon 6<sup>®</sup>, Nylon 6.6<sup>®</sup>, Nylon 12<sup>®</sup>, PET, PC) (BORCIA et al., 2004a) foram submetidos à tratamento em plasma de pressão atmosférica e descarga de barreira dielétrica (DBD). Todos demonstraram rápida oxidação de superfície (primeiro grupo) e oxidação adicional para o segundo grupo, mesmo sobre curtos tempos de exposição, com concentração de oxigênio notavelmente superior àquelas encontradas para os polímeros originais não expostos. Salienta-se que estes tratamentos usando plasma tiveram intenção de modificar as superfícies a fim de melhorar determinadas características, demonstrando aplicabilidade benéfica do processo.

Gorna e Gogolewski obtiveram resultados mostrando discrepância na taxa de oxidação de PUR biodegradáveis que aumentou quando as amostras foram submetidas a plasma de O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Entretanto, essa taxa sofreu decréscimo quando utilizando plasma de CO<sub>2</sub> e NH<sub>3</sub>. O caráter de ambos os padrões foi atribuído aos tipos de entidades reativas geradas a partir dos diferentes plasmas, bem como na estrutura química diferenciada dos compostos de PUR biodegradáveis (GORNA; GOGOLEWSKI et al., 2003).

### **6.10 Citotoxicidade “*in vitro*” pelo Método Biológico de Difusão em Ágar**

Os fragmentos dos polímeros diretamente expostos à camada confluenta de células foram analisados macro (Figura 55) e microscopicamente (Figura 56), não tendo sido constatada presença de halo claro sob ou ao redor de cada amostra testada em triplicata, portanto, IZ= zero e idênticas ao controle negativo do teste

---

(Figura 55b). Este fato ocorreu para todas as amostras de polímeros expostos e não expostos, evidenciando que o processo por plasma, em ambos os sistemas (RIE e ICP) e gases ( $O_2$  e  $O_2 + H_2O_2$ ), não ocasionou modificações químicas ou físicas que pudessem promover o desenvolvimento de citotoxicidade (resultados não fotografados).

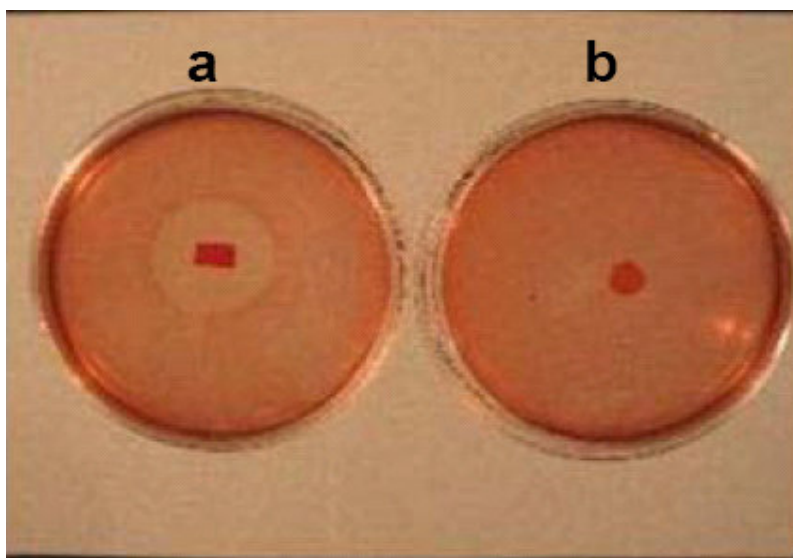


Figura 55 – Placas da linhagem celular NCTC clone 929 utilizada no Método de Difusão em Ágar – controle positivo (a) e controle negativo (b).

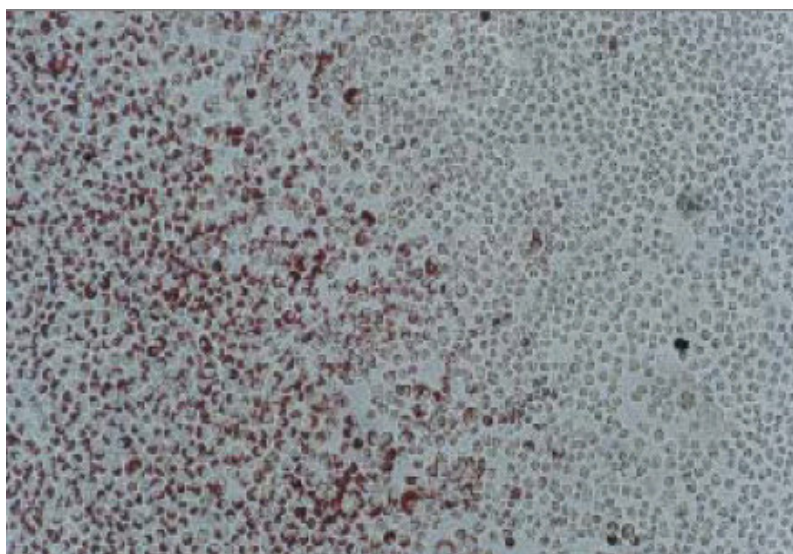


Figura 56 – Fotomicrografia da zona limítrofe entre o controle positivo (esquerda) e controle negativo (direita) – Aumento de 100 vezes.

---

A cultura de células, enquanto teste para avaliação de citotoxicidade de materiais, tem se mostrado vantajosa, reunindo características como: boa sensibilidade, reprodutibilidade, rapidez e ausência do uso de animais de laboratório. Dados da avaliação da citotoxicidade de cateteres urinários de látex frente a quatro ensaios biológicos foram comparados (citotoxicidade em cultura celular, injeção intracutânea dos extratos em coelhos, implante intramuscular dos fragmentos dos cateteres em coelhos e cateterização de ovelhas-teste de irritação de mucosa). Comparando principalmente sensibilidade e aplicabilidade prática, o teste de citotoxicidade em cultura celular com captura de vermelho neutro se mostrou adequado, cumprindo com as características descritas (GRAHAM et al., 1984).

Polímeros com aplicações biomédicas, expostos em sistemas de plasma com finalidades diversas, têm sido caracterizados química e fisicamente por inúmeros métodos, sendo que uma vez somados aos ensaios microbiológicos contribuem para o seu uso seguro e eficaz.

O comportamento de cupons de polietileno de altíssimo peso molecular expostos a sistemas de plasma usando Ar, C<sub>3</sub>F<sub>6</sub>, CH<sub>4</sub> e NH<sub>4</sub> foram avaliados quanto à citotoxicidade através de contato direto com camada confluyente de células, usando fragmentos de látex como controle positivo e de silicone como controle negativo. A inclusão do corante MTT, comumente conhecido como brometo de difenil-tetrazólio foi observada em todos os testes, revelando que os tratamentos sofridos pelos polímeros não propiciaram o desenvolvimento de toxicidade (KLAPPERICH et al., 2001).

O comportamento de diferentes linhagens de células tem encontrado aplicabilidade importante no esclarecimento da citotoxicidade de diferentes materiais. Dentre elas, destacam-se as células de fibroblasto de camundongo clone L929, usada também no presente trabalho. Exemplos do uso destas células abrangem: estudo de citotoxicidade de homopolímeros e copolímeros de 2-hidroxietil-metracrilato para potencial uso como pele temporária artificial (PRASITSILP et al., 2003), citotoxicidade de biosistemas poliméricos baseados em oligo-caprolactona dimetracrilato e seu aditivo n-butil acrilato projetados para fins implantáveis (RICKERT et al., 2003), citotoxicidade de frações despolimerizadas com diferentes pesos moleculares e concentrações do polímero quitosana (MAO et al., 2004), citotoxicidade de bio-poliésteres implantáveis temporários sintetizados por bactérias

---

e comparáveis a polímeros sintéticos (PP, PE, PET) submetidos à método de degradação acelerada (SHANGGUAN et al., 2006).

### **6.11 Avaliação da Eficácia Esterilizante de Sistema de Plasma modo RIE**

A Tabela 46 apresenta a contagem dos microrganismos sobreviventes (UFC/suporte), após exposição ao plasma de acoplamento capacitivo. Em apenas 1 (um) minuto de exposição ao plasma constituído de mistura de oxigênio e peróxido de hidrogênio, não foram observados desenvolvimentos de células de micobactérias, após emprego do método para recuperação de sobreviventes. Entretanto, esporos de *Bacillus atrophaeus* apresentaram-se altamente resistentes (SILVA et al., 2007).

Tendo em vista a maior densidade e alta reatividade das espécies reativas geradas pelo sistema de plasma modo indutivo (ICP), espera-se que ocorra redução da contagem de micobactérias em menos de 1 (um) minuto de processo (experimentos ainda não realizados). Como apresentado anteriormente, o sistema ICP não promoveu alterações estruturais significativas em cerca de 10 $\mu$ m na superfície dos polímeros, embora o aumento da rugosidade possa proporcionar o aumento do nível de adesão microbiana (FAILLE et al., 2002).

---



Tabela 46 – Contagem do número de microrganismos sobreviventes (UFC/suporte) antes e após 1 minuto de exposição a plasma RIE (O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Cepas	UFC/mL Inicial	Suportes Poliméricos				
		PVC	PC	PP	PEAD	PUR
<i>B. atrophaeus</i>	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>	9,6 x 10 <sup>6</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>	9,5 x 10 <sup>6</sup>	9,3 x 10 <sup>6</sup>
mc <sup>2</sup> 155	1,1 x 10 <sup>7</sup>	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
CCUG	1,5 x 10 <sup>7</sup>	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
MG3-6	1,2 x 10 <sup>7</sup>	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
B67	1,3 x 10 <sup>7</sup>	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
B31	1,1 x 10 <sup>7</sup>	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
INCQS 594	1,0 x 10 <sup>7</sup>	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10

Média de triplicata de amostras.

**Legenda:** UFC/mL: Unidades Formadoras de Colônias por mililitros

mc<sup>2</sup> 155: *M. smegmatis* (FIOCRUZ – RJ)

CCUG: *Culture Collection University of Göteborg*

MG3-6: *M. abscessus* subsp. *bolletii* (Vitória – ES)

PVC: Poli (cloreto de vinila)

PC: Policarbonato

PP: Polipropileno

PEAD: Polietileno de alta densidade

PUR: Poliuretano

A literatura não apresenta estudos sobre o efeito dos sistemas de esterilização por plasma (RIE ou ICP) na redução/eliminação de micobactérias, sejam elas patogênicas ou oportunistas. Alguns experimentos apresentam o efeito de vapores de gases que empregam a fase plasma apenas para detoxicação do gás no interior da câmara (KERKELA, 1994; KYI et al., 1995; RTISCH-GERDES, 1996; BÄR et al., 2001).

A possibilidade de emprego de sistemas de plasma na promoção da letalidade de micobactérias presentes em materiais de natureza polimérica no âmbito médico-hospitalar torna-se pertinente na medida em que se buscam soluções para os problemas enfrentados na esterilização química (desinfetantes). Adicionalmente, ao serem empregados tempos superiores espera-se que ambos os processos de plasma também inativem esporos de *Bacillus atrophaeus*, como aqueles apresentados por Silva e colaboradores (2007) quando foram empregados suportes vítreos, sendo a redução total do número de microrganismos ocorrida em menos de 20 minutos de processo (RIE).

O emprego de processos por plasma tem merecido atenção de diversos pesquisadores, sendo considerado um importante processo à baixa temperatura, apresentando compatibilidade com diferentes materiais, facilidade de adaptação em qualquer ambiente (hospitalar ou industrial), possibilidade de ser monitorado e facilidade de operação (SHINTANI, 1995). Outra vantagem está no fato de o plasma promover a reação química com as unidades moleculares que compõem os microrganismos muito rapidamente, viabilizando esse processo em curto espaço de tempo (CASSOLA; MARTINHO, 1997). Entretanto, dúvidas quanto às diferentes formas de processo começam a merecer maior atenção na medida em que os mecanismos responsáveis pela letalidade dos microrganismos são entendidos (CHAU et al., 1996).

---

---

## 7. CONCLUSÕES

1. Os agentes neutralizantes (Caldo Dey/Engley, Sulfito de Sódio 0,1%, Polissorbato 80 0,5% – Lecitina 0,07%, Polissorbato 80 0,5% e Soro de Cavalão) não demonstraram efeitos tóxicos às cepas de *Mycobacterium* spp. Estes agentes também foram altamente eficazes na neutralização dos desinfetantes estudados (Glutaraldeído 2%, Ácido Peracético 0,2%, Peróxido de Hidrogênio 35%, Solução Alcoólica de Digluconato de Clorexidina 0,5%, Solução Aquosa de Clorexidina 0,2%, Iodo 1%, Compostos de Amônio Quaternário 1,2% e Fenol 5%).

2. O agente desinfetante Glutaraldeído 2% apresentou-se eficaz na inativação de cepa padrão (*M. massiliense* – CCUG 48898) e isolada de ambiente ambulatorial (B67) no teste de Eficácia Micobactericida (*M. smegmatis* – mc<sup>2</sup> 155) e Eficácia Tuberculocida (*Mycobacterium bovis* cepa BCG Moreau), ambos empregando 30 minutos de exposição.

3. As cepas isoladas do surto ocorrido em Belém (PA) (*M. abscessus* subsp. *bolletii* – B31 e INCQS 594), bem como a cepa ambiental de Vitória (ES) (*M. massiliense* – MG3-6) apresentaram-se altamente resistentes ao Glutaraldeído 2%, Solução Alcoólica de Digluconato de Clorexidina 0,5%, Solução Aquosa de Clorexidina 0,2%, Iodo 1% e Compostos de Amônio Quaternário, nos testes de Eficácia Micobactericida e Tuberculocida, ambos empregando 30 minutos de exposição. Adicionalmente, estas cepas se apresentaram sensíveis ao Ácido Peracético 0,2%, Peróxido de Hidrogênio 35% e Fenol 5%.

4. Estudos envolvendo Tempo de Redução Decimal (*valor D*) demonstraram alta resistência das cepas MG3-6, B31 e INCQS 594 frente a Solução Alcoólica de Digluconato de Clorexidina 0,5%, Solução Aquosa de Clorexidina 0,2%, Iodo 1% e Compostos de Amônio Quaternário. Entretanto, as mesmas foram altamente sensíveis após o contato com Ácido Peracético 0,2%, Peróxido de Hidrogênio 35% e Fenol 5%. A solução de Glutaraldeído 2% apresentou atividade reduzida e inferior a estes últimos agentes.

5. Todos os agentes desinfetantes estudados não foram efetivos contra as cepas de *Mycobacterium* spp., em sistema de biofilme, quando inoculadas em cilindros de porcelana, após 60 minutos de contato.

6. Quando empregada a Espectroscopia Fotoacústica no Infravermelho com Transformadas de *Fourier* (PAS-FTIR), não foram evidenciadas modificações estruturais significativas, em cerca de 10µm de profundidade, quando comparados os polímeros não expostos e expostos aos processos por plasma (RIE e ICP) sob todas as condições.

---

---

7. Foi evidenciado aumento na Rugosidade média (Ra) de todos os polímeros expostos ao processo, sob todas as condições estudadas, reveladas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Perfilometria, tendo sido o sistema ICP e a mistura gasosa  $O_2 + H_2O_2$  a condição mais agressiva.

8. Foi evidenciada oxidação em nível superficial ( $0,5\mu m$ ), através do método de microanálise em sistema *Energy Dispersive Spectroscopy* (EDS), em todos os polímeros expostos ao plasma quando comparados aos não expostos sob todas as condições avaliadas, tendo sido o sistema ICP a condição mais agressiva.

9. Não foram observadas modificações químicas ou físicas que pudessem sugerir o desenvolvimento de citotoxicidade nos polímeros estudados após sua submissão ao processo e sob todas as combinações de parâmetros quando testada a citotoxicidade “*in vitro*” pelo método de Difusão em Ágar.

10. Todas as cepas de MCR estudadas foram altamente sensíveis ao plasma (RIE), sendo inativadas em apenas 1 minuto de processo. De forma comparativa, a população microbiana de *Bacillus atrophaeus* permaneceu sem alterações neste período.

---

---

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADDY, T.O. **Low temperature plasma**: a new sterilization technology for hospital applications. In: INTERNATIONAL KILMER MEMORIAL CONFERENCE ON THE STERILIZATION OF MEDICAL PRODUCTS, 5, Morin Heights, 1989. **Proceedings**. Morin Heights: Polyscience, 1991. p.80-95. [Johnson & Johnson Medical].

2. ADÉKAMBI, T.; REYNAUD-GAUBERT, M.; GREUB, G.; GENAUDAN, M.-J.; LASCOLA, B.; RAOULT, D.; DRANCOURT, M. Amoebal Coculture of "*Mycobacterium massiliense*" sp. nov. from the Sputum of a Patient with Hemoptoic Pneumonia. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.12, p.5493-5501, 2004.

3. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA) – Infecções por *Mycobacterium abscessus*. Diagnósticos e tratamento. **Informe Técnico 1**. Gerência Geral de Tecnologia em Serviços de Saúde. 2007. 8p.

4. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA) – Casos de infecção por Micobactérias Não-tuberculosas notificados. **Rede Nacional de Investigação de Surtos e Eventos Adversos em Serviços de Saúde (RENISS)**. Fev. 2009.

5. ALFA, M.J.; DEGAGNE, P.; OLSON, N.; PUCHALSKI, T. Comparison of ion plasma, vaporized hydrogen peroxide, and 100% ethylene oxide sterilizers to the 12/88 ethylene oxide gas sterilizer. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.17, n.2, p.92-100, 1996.

6. AN, Y. H.; DICKINSON, R.B.; DOYLE, R.J. Mechanisms of bacterial adhesion and pathogenesis of implant and tissue infections, p. 1-27. In Y. H. An and R. J. Friedman (ed.), **Handbook of bacterial adhesion: principles, methods, and applications**. Humana Press, Totowa, N.J., 2000.

7. ANDERSON, J.M.; HILTNER, A.; WIGGINS, M.J.; SCHUBERT, M.A.; COLLIER, T.O.; KAO, W.J.; MATHUR, A.B. Recent advances in biomedical polyurethane biostability and biodegradation. **Polymer International**, v.46, p.163-171, 1998.

8. ANGELILLO, I.F.; BIANCO, A.; NOBILE, C.G.A.; PAVIA, M. Evaluation of the efficacy of glutaraldehyde and peroxygen for disinfection of dental instruments. **Letters in Applied Microbiology**, v.27, p.292-296, 1998.

---

As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR 6023/2002 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas seguem o Chemical Abstract Source Service Index (CASSI), 2002.

---

---

9. AOUTINI, M.; BERTRAND, P.; PONCIN-EPAILLARD, F. Characterization of polypropylene surface treated in a CO<sub>2</sub> plasma. **Plasmas and Polymers**, v.8, n.4, p.225-236, 2003.

10. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. AOAC Official Methods of Analysis. 14th ed. Arlington, 1984. p.65-68.

11. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. AOAC Official Method of Analysis 965.12 – Tuberculocidal Activity of Disinfectants. **AOAC International**, 1988, 2p.

12. ASTAGNEAU, P.; DESPLACES, N.; VINCENT, V. Mycobacterium xenopi spinal infections after discovertebral surgery: investigation and screening of a large outbreak. **The Lancet**, v.358: p.747-751, 2001.

13. AZEVEDO, J.C. **Segurança biológica de implantes mamários de silicone: interrelação entre processos esterilizantes e biocompatibilidade**. São Paulo, 2004. 91p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

14. BACKGROUND Information: Plasma sterilization: a limited infection control technique. S.l.: s.n., v.4, 1996, 30p.

15. BÄR; W.; MÁRQUEZ; G.; NAUMANN, A.; RÜSCH-GERDES, S. Contamination of bronchoscopes with *Mycobacterium tuberculosis* and successful sterilization by lowtemperature hydrogen peroxide plasma sterilization. **Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology**, v.29, n.5, p.306-311, 2001.

16. BARDOUNIOTIS, E.; CERI, H.; OLSON, M.E. Biofilm formation and biocide susceptibility testing of *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium marinum*. **Current Microbiology**, v.46, p.28-32, 2003.

17. BARRETO, A. M. W.; CAMPOS, C. E. D. Micobactérias “não tuberculosas” no Brasil. **Boletim de Pneumologia Sanitária**, v.8, n.1, p.23-32, 2000.

18. BARRY, C.E. Drug sensivity and environmental adaptation of mucobacterial cell wall components. Trends Microrbiol. 4:275-281. 1996 apud G. MCDONNELL, A. D. RUSSELL Antiseptics and Disinfection: activity action, and resistance. **Clinical Microbiology Review.**, p.147-179, jan. 1999.

---

- 
19. BECTON & DICKINSON **Manual of Microbiological Culture Media**. Disponível em: < [http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/D\\_E\\_Neutralizing\\_Agar.pdf](http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/D_E_Neutralizing_Agar.pdf)>. Acesso em: 26 nov. 2006.
20. BELLO-GONZALEZ, T.; ROSALES-PANTOJA, P.; ACOSTA-GIO, A.H.; WAARD, J.H. Instrument processing with lauryl dimetil benzyl ammonium bromide: A Challenger for patient safety. **American Journal of Infection Control**, n.36, p.598-601, 2008.
21. BEST, M.; SATTAR, S.A.; SPRINGTHORPE, V.S.; KENNEDY, M.E. Efficacies of selected disinfectants against *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, p.2234-2239, 1990.
22. BEST, M.; SATTAR, S.A.; SPRINGTHORPE, V.S.; KENNEDY, M.E. Comparative Mycobactericidal Efficacy of Chemical Disinfectants in Suspension and Carrier Tests. **Applied and Environmental Microbiology**, v.4, n.11, p.2856-2858, 1998.
23. BILLMEYER Jr., F.W. **Textbook of Polymer Science**. New York, NY: John Wiley & Sons Inc., New York, 1984, 578p.
24. BLANCO, R.M.; INUMARU, V.T.G; MARTINS, M.C.; GIAMPAGLIA, C.M.S.; UEKI, S.Y.M.; CHIMARA, E.; YOSHIDA, J.T.U.; TELLES M.A.S. Estratégias para a identificação de espécies do complexo *Mycobacterium fortuitum*. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, n.61, v.2, p.91-96, 2002.
25. BLOCK, S.S. **Disinfection, Sterilization and Preservation**. Third Edition. Lea & FEBIGER, Philadelphia, 1983, 576p.
26. BOLAN, G.; REINGOLD, A.L; CARSON, L.A. Infections with *Mycobacterium chelonae* in patients receiving dialysis and using processed hemodialyzers. **Journal of Infection Disease**, v.152, p.1013-1019, 1985.
27. BOLAND, T.; LATOUR, R.A.; SUTZENBERGER, F.J. Molecular basis of bacterial adhesion, p. 29-41. In Y. H. An and R. J. Friedman (ed.), **Handbook of bacterial adhesion: principles, methods, and applications**, 1st ed. Humana Press, Totowa, N.J., 2000.
28. BOL'SHAKOV, A.A.; CRUDEN, B.A.; MOGUL, R.; RAO, M.V.V.S.; SHARMA, S.P.; KHARE, B.N.; MEYYAPPAN, M. Radio-Frequency Oxygen Plasma as a Sterilization Source. **American Institute of Aeronautics and Astronautics Student Journal** , v.42, n.4, p.823-831, 2004.
-

- 
29. BORCIA, G.; ANDERSON, C.A.; BROWN, N.M.D. The surface oxidation of selected polymers using an atmospheric pressure air dielectric barrier discharge. Part I. **Applied Surface Science**, v.221, p.203-214, 2004.
30. BORCIA, G.; ANDERSON, C.A.; BROWN, N.M.D. The surface oxidation of selected polymers using an atmospheric pressure air dielectric barrier discharge. Part II. **Applied Surface Science**, v.225, p.2186-197, 2004a.
31. BOSCARIOL, M.R.; MOREIRA, A.J.; MANSANO, R.D.; KIKUCHI, I.S.; PINTO, T.J.A. Sterilization by pure oxygen plasma and by oxygen-hydrogen peroxide plasma: an efficacy study. **International Journal of Food Science and Technology**, v.43, n.5, p.170-175, 2008.
32. BOU-CHACRA, N.A.; OHARA, M.T. Validação de método para avaliação da qualidade sanitária de preparação cosmética de base lipófila. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v.39, n.2, p.185-194, Abril/Junho, 2003.
33. BRANDA, S.S.; VIK, S.; FRIEDMAN, L.; KOLTER, R. Biofilms: the matrix revisited. **Trends in Microbiology**, v.13, p.20-26, 2005.
34. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. VisaLegis. **Portaria Interministerial n. 3, de 01 de julho de 1988**. Aprova o Regulamento Técnico n.RT-008/87 - "Bolsas Plásticas para Acondicionamento de Sangue Humano e seus Componentes". Disponível em: <<http://elegis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=3940&word=>>. Acesso em: 26 jan. 2007.
35. BRASIL. **Portaria n. 15, de 23 de agosto de 1988**. Determinar que o registro de produtos saneantes e domissanitários com finalidade antimicrobiana seja procedido de acordo com as normas regulamentares anexas à presente. Estabelecer o prazo até as respectivas revalidações dos registros para que os produtos aqui abrangidos e anteriormente registrados se adequem ao novo regulamento. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, p.17041-3, 5 set. 1988, Seção 1.
36. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. VisaLegis. **Portaria n. 2043, de 12 de dezembro de 1994**. Institui o Sistema de Garantia da Qualidade de produtos correlatos submetidos ao regime da Lei n.6.360, de 27 de setembro de 1976 e o Decreto n.79.094, de 05 de janeiro de 1977. Disponível em: <<http://elegis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=723&word=>>. Acesso em: 26 jan. 2007.
-



- 
37. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. VisaLegis. **Portaria Interministerial n. 482, de 16 de abril de 1999.** Aprova o Regulamento Técnico e seus Anexos, objeto desta Portaria, contendo disposições sobre os procedimentos de instalações de Unidade de Esterilização por óxido de etileno e de suas misturas e seu uso, bem como, de acordo com as suas competências, estabelecer as ações sob a responsabilidade do Ministério da Saúde e Ministério do Trabalho e Emprego. Disponível em: <[http://elegis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=1537&word=.](http://elegis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=1537&word=)> Acesso em: 26 jan. 2007.
38. BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Resolução n. 267, de 14 de setembro de 2000.** Proibição de substâncias que destroem a camada de ozônio. Disponível em: <[http://www.ibama.gov.br/ambtec/legislacao/267\\_2000\\_Oz%F4nio\\_proibe\\_subs\\_destroem\\_cam\\_Ozon.doc](http://www.ibama.gov.br/ambtec/legislacao/267_2000_Oz%F4nio_proibe_subs_destroem_cam_Ozon.doc)>. Acesso em: 26 jan. 2007.
39. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. VisaLegis. **Resolução n. 185, de 22 de outubro de 2001.** Aprova o Regulamento Técnico que consta no anexo desta Resolução, que trata do registro, alteração, revalidação e cancelamento do registro de produtos médicos na Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Disponível em: <[http://elegis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=22426&word=.](http://elegis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=22426&word=)> Acesso em: 26 jan. 2007.
40. BRASIL. Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE nº 8, em 27 de fevereiro de 2009.**
41. BRASIL. Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE nº 689, em 28 de abril de 2004.** Disponível em: <http://www.camara.gov.br/sileg/integras/251316.pdf>>. Acesso em: 15 ago. 2007.
42. BRASÍLIA. **Nota à imprensa: Micobactérias.** 15 de agosto de 2008. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2008/150808\\_1.htm](http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2008/150808_1.htm)> Acesso em: 19 de ago. 2008.
43. BROADLEY, S.J.; JENKINS, P.A.; FURR, J.R.; RUSSELL, A.D. Antimycobacterial activity of biocides. **Letters Applied Microbiology**, v.13, p.118-122, 1991.
44. BROOUN, A.; SONGHUA, L.; LEWIS, K. A Dose-Response Study of Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.44, n.3, p.640-646, 2000.
-

- 
45. BROWN-ELLIOTT, B.A.; WALLACE-JR, R.J. Clinical and Taxonomic Status of Pathogenic Nonpigmented or Late-Pigmenting Rapidly Growing Mycobacteria **Clinical Microbiology Reviews**, v.15, n.4, p.716-746, 2002.
46. BRYCE, E.A.; CHIA, E.; LOGELIN, G.; SMITH, J.A. An evaluation of the AbTox Plazlyte Sterilization System. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.18, n.9, p.646-53, 1997.
47. BURGESS, D.J.; REICH, R.R. Industrial ethylene oxide sterilization. In: MORRISSEY, R.F.; PHILLIPS, G.B., eds. **Sterilization technology: a practical guide for manufactures and users of health care products**. New York: Morrisey, 1993. cap.7, p.152-195.
48. BUSIN, M.; PONZIN, D.; ARFFA, R.C. Mycobacterium chelonae interface infection after Endokeratoplasty. **American Journal of Ophthalmology**. v.135, p.393-395, 2003.
49. CAHEN, D. Photoacoustic in life sciences. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v.3, p.293-310, 1980.
50. CAMARGO, D.; SAAD, C.; RUIZ, F. Iatrogenic outbreak of *Mycobacterium chelonae* skin abscesses. **Epidemiology & Infection**, v.117, p.113-119, 1996.
51. CANEVAROLO Jr., S.V. **Ciência dos polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros**. São Paulo: Artliber, 2004. 183p.
52. CARDOSO, A.M.; SOUSA, E.M.; VIANA-NIERO, C.; BORTOLI, F.B.; NEVES, Z.C.P.; LEÃO, S.C.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A.P.; KIPNIS, A. Emergence of nosocomial *Mycobacterium massiliense* infection in Goiás, Brazil. **Microbes and Infection**, n.10, p.1552-1557, 2007.
53. CARPENTIER, B.; CERF, O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. **Journal of Applied Bacteriology**, n.75, p.499-511, 1993.
54. CASSOLA, M. A.; MARTINHO, E. Plasma de peróxido de hidrogênio. **Revista SOBECC**, v.2, n.3, p.8-11. São Paulo: jul/set, 1997.
-

- 
55. CASTRO-SILVA, A.; FREIRE, A.; GRINBAUM, R.; ELMOR DE ARAÚJO, M.; ABENSUR, H.; ARAÚJO, M.; ROMÃO, J.; SAMPAIO, J.; NORONHA, I. Cutaneous *Mycobacterium haemophilum* infection in a kidney transplant recipient after acupuncture treatment. **Transplant Infectious Disease**, no. doi: 10.1111/j.1399-3062.2010.00522.x
56. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Mycobacterium chelonae* infections associated with face lifts - New Jersey, 2002-2003. **Morbidity Mortality Weekly Report**, v.53, p.192-194, 2004.
57. CHADHA, R.; GROVER, M.; SHARMA, A. An outbreak of post-surgical wound infections due to *Mycobacterium abscessus*. **Pediatric Surgery Internation**, v.13, p.406-410, 1998.
58. CHANG, Y.I.; CHANG, P.K. The role of hydration force on the stability of the suspension of *Saccharomyces cerevisiae* – application of the extended DLVO theory. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, n.211, p.67-77, 2002.
59. CHAU, T.T.; KAO, K.C.; BLANK, G.; MADRID, F. Microwave plasmas for low-temperature dry sterilization. **Biomaterials**, v.17, n.13, p.1273-1277, 1996.
60. CHEN, F.F. Industrial applications of low temperature plasma physics: Part A. California: Electrical engineering department, 1994. University of California. 24p. [Apostila].
61. CHRONEOU, A.; ZIMMERMAN, S.K.; COOK, S.; WILLEY, S.; EYRE-KELLY, J.; ZIAS, N.; SHAPIRO, D.; BEAMIS Jr., J.; CRAVEN, D. Molecular typing of *M. chelonae* Isolates from a Pseudo-outbreak involving an automated Bronchoscope washer. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.29, n.1, nov. 2008.
62. CIURCZAK, E.W. Aplicações da espectroscopia por infravermelho fotoacústica. **Pharmaceutical Technology: Edição Brasileira**, v.3, n.4, p.11-12, 1999.
63. CLODE, P.L. Charge contrast imaging of biomaterials in a variable pressure scanning electron microscope. **Journal of Structural Biology**, v.155, n.3, p.505-511, 2006.
-

- 
64. CLOUGH, R.L.; SHALABY, S.W. **Irradiation of polymers**: fundamentals and technological applications. Washington: American Chemical Society, 1996. 433p. (ACS Symposium series, 620) (Developed from a symposium sponsored by the Division of Polymer Chemistry, Inc., at the 208<sup>th</sup>. National Meeting of the American Chemical Society, Washington, DC, August 21-25, 1994).
65. CONGER, N.G.; O'CONNELL, R.J.; LAUREL, V.L. Mycobacterium simiae outbreak associated with a hospital water supply. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.25, p.1050-1055, 2004.
66. COSTERTON, J.W. ; LEWANDOWSKI, Z. ; CALDWELL, D.E. ; KORBER, D.R. ; LAPPIN-SCOTT, H.M. Microbial biofilms. **Annual Review Microbiology**, v.49, p.711-745, 1995.
67. COSTERTON, J.W.; LAPPIN-SCOTT, H.M. Introduction to microbial biofilms, p.1-11. *In* H. M. Lappin-Scott and J. W. Costerton (ed.), **Microbial biofilms**, 1st ed. Cambridge University Press, New York, N.Y., 1995a.
68. COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S.; GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v.284, p.1318-1322, 1999.
69. COX, R.; DEBORJA, K.; BACH, M.C. A pseudo-outbreak of *Mycobacterium chelonae* infections related to bronchoscopy. **Infection Control Hospital Epidemiology** v.18, p.136-137, 1997.
70. CRUZ, J.C. *Mycobacterium fortuitum* um novo bacilo ácido resistente patogênico para o homem. **Acta Médica**, n.1, p.297-301, 1938.
71. CRUZ, A.S. **Teste de citotoxicidade “in vitro” como alternativa ao teste “in vivo” de Draize na avaliação de produtos cosméticos**. São Paulo, 2003. 107p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
72. DAILLOUX, M.; LAURAIN, C.; WEBER, M.; HARTEMANN, P.H. Water And Nontuberculous Mycobacteria. **Water Research**, v.33, n.10, p.2219-2228, 1999.
73. DAVEY, M.E.; O'TOOLE, G.A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiology Molecular Biology Review**, v.64, p.847-867, 2000.
-

- 
74. DAVIES, D.G.; PARSEK, M.R.; PEARSON, J.P.; IGLEWSKI, B.H.; COSTERTON, J.W.; GREENBERG, E.P. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. **Science**, v.280, n.5361, p.295-298, 1998.
75. DEN ELZEN, M.G.J.; SWART, R.J.; ROTMANS, J. Strengthening the Montreal Protocol: does it cool down the greenhouse? **Science of the Total Environment**, v.113, n.3, p.229-250, 1992.
76. DONLAN, R.M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v.8, n.9, sep. 2002.
77. DUNNE, W.M.; BURD, E.M. Fibronectin and proteolytic fragments of fibronectin interfere with the adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to plastic. **Journal of Applied Bacteriology**, n.74, p.411-416, 1993.
78. DYTOC, M.T.; HONISH, L.; SHANDRO, C.; TING, P.T.; CHUI, L.; FIORILLO, L.; ROBINSON, J.; FANNING, A.; PREDY, G.; RENNIE, R.P. Clinical, microbiological, and epidemiological findings of an outbreak of *Mycobacterium abscessus* hand-and-foot disease. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.53, n.1, p.39-45, 2005.
79. ELIASSON, B.; KOGELSCHATZ, U. Nonequilibrium volume plasma chemical processing. **IEEE Transactions on Plasma Science**, v.19, p.1063-1077, 1991.
80. ENVIRONMENT PROTECTION AGENCY. United States of America. Neutralization Confirmation Assay for Disinfectant Products Tested against *Mycobacterium bovis* BCG, 2004. 23p.
81. ENVIRONMENT PROTECTION AGENCY. United States of America. Quantitative Suspension Test Method for Determining Tuberculocidal Efficacy of Disinfectants Against *Mycobacterium bovis* (BCG), 2006. 28p.
82. ERBEL, H.J.; SUDARSAN, R. Exposure of biofilms to slow flow fields: The convective contribution to growth and disinfection. **Journal of Theoretical Biology**, n.253, p.788-807, 2008.
83. ESTEBAN, J.; MARTÍN-DE-HIJAS, N.Z.; KINNARI, T.J.; AYALA, G.; FERNANDEZ-ROBLAS, G.I. Biofilm development by potentially pathogenic non-pigmented rapidly growing mycobacteria. **BMC Microbiology**, v.8, p.184-191, 2008.
-

- 
84. FAILLE, C.; JULLIEN, C.; FONTAINE, F.; BELLON-FONTAINE, M-N.; SLOMIANNY, C.; BENEZECH, T. Adhesion of *Bacillus* spores and *Escherichia coli* cells to inert surfaces: role of surface hydrophobicity. **Canadian Journal of Microbiology**, v.48, p.728-738, 2002.
85. FALKINHAM, J.O. Growth in catheter biofilms and antibiotic resistance of *Mycobacterium avium*. **Journal of Medical Microbiology**, v.56, p.250-254, 2007.
86. FEICHTINGER, J.; SCHULZ, A.; WALKER, M.; SCHUMACHER, U.; HALL-STOODLEY, L.; LAPPIN-SCOTT, H. Biofilm formation by the rapidly growing mycobacterial species *Mycobacterium fortuitum*. **FEMS Microbiology Letters**, v.168, p.77-84, 1998.
87. FERGUSON, D.D.; GERSHMAN, K.; JENSEN, B. *Mycobacterium goodii* infections associated with surgical implants at Colorado hospital. **Emerging Infectious Disease**, v.10, p.1868-1871, 2004.
88. FOX, L.P.; GEYER, A.S.; HUSAIN, S.; DELLA-LATTA, P.; GROSSMAN, M.E. *Mycobacterium abscessus* cellulites and multifocal abscesses of the breasts in a transsexual from illicit intramammary injections of silicone. **Journal American Academy of Dermatology**, v.50, p.450-454, 2004.
89. FRAUD, S.; MAILLARD, J.-Y.; RUSSELL, A.D. Comparison of the mycobactericidal activity of ortho-phthaldehyde, glutaraldehyde and other dialdehydes by a quantitative suspension test. **Journal of Hospital Infection**. v.48, p.214-221, 2001.
90. FREEMAN, R.; GEIER, H.; WEIGLE, K.M.; DO, J.; FORD, T.E.; CANGELOSI, G.A. Roles for cell wall glycopeptidolipid in surface adherence and planktonic dispersal of *Mycobacterium avium*. **Applied and Environmental Microbiology**, p.7557-7558, dec. 2006.
91. FREITAS, D.; ALVARENGA, L.; SAMPAIO, J. An outbreak of *Mycobacterium chelonae* infection after LASIK. **Ophthalmology**, v.110, p.276-285, 2003.
92. FRESHNEY, R.I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**. 2.ed. New York: Wiley-Liss, 1987. 397p.
93. FRITZE, D.; PUKALL, R. Reclassification of bioindicator strains *Bacillus subtilis* DSM 675 and *Bacillus subtilis* DSM 2277 as *Bacillus atrophaeus*. **International Journal of Systematic and Evolucionary Microbiology**, v.51, p.35-37, 2001.
-

- 
94. GADRI, R.B.; ROTH, J.R.; MONTIE, T.C.; WINTENBERG, K.K.; TSAI, P.P.-Y.; HELFRITCH, D.J.; FELDMAN, P.; SHERMAN, D.M.; KARAKAYA, F.; CHEN, Z. Sterilization and plasma processing of room temperature surfaces with a one atmosphere uniform glow discharge plasma (OAUGDP). **Surface and Coatings Technology**, n.131, p.528-542, 2000.
95. GALIL, K.K.; MILLER L.A.; YAKRUS, M.A. Abscesses due to *Mycobacterium abscessus* linked to injection of unapproved alternative medication. **Emerging Infection Disease**, v.5, p.681-687, 1999.
96. GALLARDO-MORENO, A.M.; GONZALEZ-MARTIN, M.L.; PEREZ-GIRALDO, C. The measurement temperature: an important factor relating physicochemical and adhesive properties of yeast cells to biomaterials. **Journal of Colloid and Interface Science**, n.271, p.351-358, 2002.
97. GARDELLA Jr., J.A.; JIANG, D.Z.; MCKENNA, W.P.; EYRING, E.M. Applications of Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy (FTIR/PAS) to surface and corrosion phenomena. **Applications of Surface Science**, v.15, p.36-49, 1983.
98. GARRETT, T.R.; BHAKOO, M.; ZHANG, Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. **Progress in Natural Science**, v.18, p.1049-1056, 2008.
99. 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**, v.34, n.4, p.1257-1266, 2006.
100. GIÃO, M.S.; MONTENEGRO, M.I.; VIEIRA, M.J. Monitoring biofilm formation by using cyclic voltammetry– effect of the experimental conditions on biofilm removal and activity. **Water Science and Technology**, v.47, n.5, p.51-56, 2003.
101. GOGOLEWSKI, S.; MAINIL-VARLET, P.; DILLON, J.G. Sterility, mechanical properties, and molecular stability of polylactide internal – fixation devices treated with low-temperature plasmas. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.32, p.227-235, 1996.
102. GOLDMAN, M.; PRUITT, L. Comparison of the effects of gamma radiation and low temperature peroxide gas plasma sterilization on the molecular structure, fatigue resistance, and wear behavior of UHMWPE. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.40, p.378-384, 1998.
-

---

103. GOLDSTEIN, J.I.; NEWBURY, D.E.; ECHLIN, P.; JOY, D.C.; ROMING Jr., A.D.; LYMAN, C.E.; FIORI, C.; LIFSHIN, E. **Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis**: a text for biologists, materials scientists, and geologists. 2.ed. New York: Plenum Press, 1992. cap.12, p.635-639.

104. GORNA, K.; GOGOLEWSKI, S. Molecular stability, mechanical properties, surface characteristics and sterility of biodegradable polyurethanes treated with low-temperature plasma. **Polymer Degradation and Stability**, v.79, p.475-485, 2003.

105. GRAHAM, D.T.; MARK, G.E.; POMEROY, A.R.; MACARTHUR, E.B. *In vivo* validation of a cell culture test for biocompatibility testing of urinary catheters. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.18, p.1125-1135, 1984.

106. GREENWALD, D. Risks of reprocessing endoscopes and reusable instruments. **Techniques in Gastrointestinal Endoscopy**, n.9, p. 233-235, 2007.

107. GREGORY, A.W.; SCHAALJE, G.B.; SMART, J.D.; ROBISON, R.A. The mycobactericidal efficacy of ortho-phthaldehyde and the comparative resistances of *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium terrae* and *Mycobacterium chelonae*. **International Control and Hospital Epidemiology**. v.20, n.5, 1999.

108. GRILL, A. **Cold Plasma in Materials Fabrication: From Fundamental to Applications**, IEEE Press, New York, 1994, 257p.

109. GUESS, W.L.; ROSENBLUTH, S.A.; SCHMIDT, B.; AUTIAN, J. Agar diffusion method for toxicity screening of plastics on cultured cell monolayers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.54, p.1545-1547, 1965.

110. HALL-STOODLEY, L.; LAPPIN-SCOTT, H. Biofilm formation by the rapidly growing mycobacterial species *Mycobacterium fortuitum*.. **FEMS Microbiology Letters**, n.168, p.77-84, 1998.

111. HALL-STOODLEY, L.; STOODLEY, P. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. **Trends in Microbiology**, v.13, p.7-10, 2005.

112. HAWSER, S.; ISLAM, K. *Candida*. In: **Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy**. PACE, J.L.; RUPP, M.E.; FINCH, R.G. Taylor & Francis, Boca Raton, FL, 2006, p.174.

---



- 
113. HELMUS, M.N.; TWEDEN, K. "Materials Selection", In: **Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering**, Part A, v.1, p.27-59, 1995.
114. HENRY, M.T.; INAMDAR, L.; O'RIORDAIN, D.; SCHWEIGER, M.; WATSON, J.P. Nontuberculous mycobacteria in non-HIV patients: epidemiology, treatment and response. **European Respiratory Journal**, v.23, p.741-746, 2004.
115. HERMANSSON, M. The DLVO theory in microbial adhesion. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, n.14, p.105-119, 1999.
116. HERMELIN, I.J.; BURTIN, C.; LEVERGE, R.; PRUGNAUD, J.-L. Côt de fonctionnement de deux systèmes de stérilisation à basse température, centralisé et decentralize. **Journal of Pharmacie Clinique**, v.17, n.3, p.138-144, 1998.
117. HERNANDEZ, A.; MARTRO, E.; MATAS, L.; JIMENEZ, A.; AUSINA, V. Mycobactericidal and tuberculocidal activity of Korsolex AF, an amine detergent/disinfectant product. **Journal of Hospital Infection**, v.59, p.62-66, 2005.
118. HERRMANN, M.; BAUDAUX, P.E.; PITTET, D.; AUCKENTHALER, R.; LEW, P.D.; SCHUMACHER-PERDREAU, F.; PETERS, G.; WALDVOGEL, F.A. Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material. **Journal Infectious. Disease**, n.158, p.693-701, 1998.
119. 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.
120. HOWARD, S.T.; BYRD, T.F.; LYONS, C.R. A polymorphic region in *Mycobacterium abscessus* contains a novel insertion sequence element. **Microbiology**, v.148, p.2987-2996, 2002.
121. HUGO. W.B.; RUSSELL, A.D. **Pharmaceutical Microbiology**. Laboratory evaluation of antimicrobial agents. Massachusetts: Blackwell Publishing, 2004, 7a. edition, p.191, 2004.
122. IDO, K.; ISHINO, Y.; OTA, Y.; KIHIRA, K.; TANIGUCHI, Y.; SAIFUKU, K.; SATOH, K.; KAWAMOTO, C.; HAYASHI, M.; KIMURA, K. Deficiencies of automatic endoscopic reproprocessors: a method to achieve high-grade disinfection of endoscopes. **Techniques in Gastrointestinal Endoscopy**, v. 44, n.5, 1996.
-

---

123. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARTIZATION. ISO 10.993-5: Biological evaluation of medical devices. Part 5. Test for cytotoxicity: *in vitro* methods. Geneva: ISO, 1999. 7p.

124. JACOBS, P.T. **Sterrad® sterilization system**: a new technology for instrument sterilization. Arlington, Texas: Johnson & Johnson, Advanced Sterilization Products Medical, 1994. p.1-33.

125. JAYABALAN, M. Sterilization and reprocessing of materials and medical devices reusability. **Journal of Biomaterials Applications**, v.10, p.97-112, 1995.

126. JEONG, Y.J.; LEE, K.S.; KOH, W.-J.; HAN, J.; KIM, T.S.; KWON, O.J. Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Infection in Immunocompetent Patients: Comparison of Thin-Section CT and Histopathologic Findings. **Radiology**, v.231, p.880-886, 2004.

127. JUHAS, M.; EBERL, L.; TÜMMLER, B. Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. **Environmental Microbiology**, v.7, n.4, p.459-471, 2005.

128. KACZMAREK, H.; KOWALONEK, J.; SZALLA, A.; SIONKOWSKA, A. Surface modification of thin polymeric films by air-plasma or UV irradiation. **Surface Science**, v.507/510, p.883-888, 2002.

129. KAMPF, G.; SHAFFER, M.; HUNTE, C. Insufficient neutralization in testing a chlorhexidine-containing ethanol-based hand rub can result in a false positive efficacy assessment. **BMC Infectious Diseases**, v.5, p.48-52, 2005.

130. KAUPPINEN, J.; NOUSIAINEN, T.; JANTUNEN, E.; MATTILA, R.; KATILA, M.L. Hospital water supply as a source of disseminated *Mycobacterium fortuitum* infection in a leukemia patient. **Infection Control Hospital Epidemiology**, v.20, p.343-345, 1999.

131. KATZ, J. Developments in medical polymers for biomaterials applications. **Medical Device & Diagnostic Industry**, v.23, n.1, p.122-132, 2001.

132. KAWANO, Y. Espectroscopia vibracional de absorção no infravermelho/espectroscopia fotoacústica no infravermelho. In: CANEVAROLO Jr., S.V., coord. **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo: Artliber, 2004. 448p.

---

- 
133. KERKELA, A.; RANTALA, R.; KURONEN, T. Sterilization of difficult instruments contaminated either with *Mycobacterium gordonae* or with *Bacillus subtilis* by Sterrad system. An experimental study. Publication interne au Public Health Laboratory. Helsinki, Finland, 1994.
134. KHORASANI, M.T.; ZAGHIYAN, M.; MIRZADEH, H. Ultra high molecular weight polyethylene and polydimethylsiloxane blend as acetabular cup material. **Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces**, v.41, p.169-174, 2005.
135. KIM, H.-Y.; YUN, Y.-J.; PARK, C.G.; LEE, D.H.; CHO, Y.K.; PARK, B.J.; JOO, S.-I.; KIM, E.-C.; HUR, Y.J.; KIM, B.J.; KOOK, Y.-H. Outbreak of *Mycobacterium massiliense* infection associated with intramuscular injections. **Journal of Clinical Microbiology**, p.3127-3130, sept. 2007.
136. KLAPPERICH, C.; PRUITT, L.; KOMVOPOULOS, K. Chemical and biological characteristics of low-temperature plasma treated ultra-high molecular weight polyethylene for biomedical applications. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.12, p.549-556, 2001.
137. KLINE, S.; CAMERON, S.; STREIFEL, A. An outbreak of bacteremias associated with *Mycobacterium mucogenicum* in a hospital water supply **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.25, p.1042-1049, 2004.
138. KOLODKIN-GAL, I.; ROMERO, D.; CAO, S.; CLARDY, J.; KOLTER, R.; LOSICK, R. D-Amino Acids Trigger Biofilm Disassembly. **Science**, v.328, n.5978, p.627- 629, April 2010.
139. KREBS, M.C.; BÉCASSE, P.; VERJAT, D.; DARBORD, J.C. Gas plasma sterilization: relative efficacy of the hydrogen peroxide phase compared with that of the plasma phase. **International Journal of Pharmaceutics**, n.160, p.75-81, 1998.
140. KREMER, K.; van der LAAN, T.; van SOOLINGEN, D. Storage of Mycobacterial Strains. p.359-365. In: **Methods of Molecular Medicine**, v.54: *Mycobacterium tuberculosis* Protocols. T. Parish and N.G. Stoker. Humana Press Inc., Totowa, NJ. 2002.
141. KRISHNAN, K.; HILL, S.; HOBBS, J.P.; SUNG, C.S.P. Orientation measurements from polymer surfaces using Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, v.36, n.3, p.257- 259, 1982.
-

---

142. KUCHMA, T.N.; SAMOILENKO, I.I.; ALIPOV, Ye.E.; LYSTSOV, V.N. Study of the mechanisms of the combined action of microwave electromagnetic radiation and hydrogen peroxide on the viability of microorganisms. **Biophysics**, v.41, n.2, p.427-434, 1996.

143. KYI, M.S.; HOLTON, J.; RIDGWAY, G.L. Assessment of the efficacy of a low temperature hydrogen peroxide gas plasma sterilization system. **Journal of Hospital Infection**, v.31, n.4, p.275-284, 1995.

144. LEÃO, S.C.; DUARTE, R.S.; CHIMARA, E. Prokaryotic taxonomy rules and nomenclature changes in the *Mycobacterium chelonae-abscessus* group: author reply. **Future Microbiol**, v.5, n.10, p.1459, 2010.

145. LEÃO, S.C.; TORTOLI, E.; VIANA-NIERO, C.; UEKI, S.Y.M.; LIMA, K.V.B.; LOPES, M.L.; YUBERO, J.; MENENDEZ, M.C.; GARCIA, M.J. Characterization of mycobacteria from a major Brazilian outbreak suggests that revision of the taxonomic status of members of the *Mycobacterium chelonae-M. abscessus* group is needed. **Journal of Clinical Microbiology**, v.47, n.9, p.2691-2698, 2009.

146. LEÃO, S.C.; BERNARDELLI, A.; CATALDI, A.; ZUMARRAGA, M.; ROBLEDO, J.; REALPE, T.; MEJÍA, G.I.; TELLES, M.A.S.; CHIMARA, E.; VELAZCO, M.; FERNANDEZ, J.; RODRIGUES, P.A.; GUERRERO, M.I.; LEÓN, C.I.; PORRAS, T.B.; RASTOGI, N.; GOH, K.S.; SUFFYS, P.; ROCHA, A.S.; NETTO, D.S.; RITACCO, V.; LÓPEZ, B.; BARRERA, L.; PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; PORTAELS, F. Multicenter evaluation of mycobacteria identification by PCR restriction enzyme analysis in laboratories from Latin America and the Caribbean. **Journal of Microbiological Methods**, v.61, p.193-199, 2005.

147. LEROUGE, S.; GUIGNOT, C.; TABRIZIAN, M.; FERRIER, D.; YAGOUBI, N.; YAHIA, L.H. Plasma-based sterilization: effect on surface and bulk properties, and hydrolytic stability of reprocessed polyurethane electrophysiology catheters. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.52, p.774-782, 2000a.

148. LEROUGE, S.; FOZZA, A.C.; WERTHEIMER, M.R.; MARCHAND, R.; YAHIA, L.H. Sterilization by low pressure plasma: the role of vacuum ultraviolet radiation. **Plasmas and Polymers**, v.5, p.31-46, 2000b.

149. LEROUGE, S.; WERTHEIMER, M.R.; MARCHAND, R.; TABRIZIAN, M.; YAHIA, L.H. Effect of gas composition on spore mortality during low pressure plasma sterilization. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.51, p.128-135, 2000c.

---

- 
150. LEROUGE, S.; WERTHEIMER, M.R.; YAHIA, L.H. Plasma sterilization: a review of parameters, mechanisms and limitations. **Plasmas and Polymers**, v.6, n.3, p.175-188, 2001.
151. LEROUGE, S.; TABRIZIAN, M.; WERTHEIMER, M.R.; MARCHAND, R.; YAHIA, L.H. Safety of plasma-based sterilization: surface modifications of polymeric medical devices induced by Sterrad<sup>®</sup> and Plazlyte<sup>™</sup> processes. **Bio-Medical Materials and Engineering**, v.12, p.3-13, 2002.
152. LI, Y.-H.; TANG, N.; ASPIRAS, M.B.; LAU, P.C.Y.; LEE, J.H.; ELLEN, R.P.; CVITKOVITCH, D.G. A Quorum-Sensing Signaling System Essential for Genetic Competence in *Streptococcus mutans* Is Involved in Biofilm Formation **Journal of Bacteriology**, v.184, n.10, p.2699-2708, May 2002.
153. LOUKILI, N.H.; BECKER, H.; HARNO, J.; BIENTZ, M.; MEUNIER, O. Effect of peracetic acid and aldehyde disinfectants on biofilm. **Journal of Hospital Infection**, v.58, p.151-154, 2004.
154. MAH, T.-F.C.; O'TOOLE, G.A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in Microbiology**, v.9, n.1, pp.34-39, Jan. 2001.
155. MAILLARD, J-Y. Bacterial resistance to biocides in the healthcare environment: should it be of genuine concern? **Journal of Hospital Infection**, n.65 (S2), p.60-72, 2007.
156. MANERO, J.M.; GIL, F.J.; PADROS, E.; PLANELL, J.A. Applications of environmental scanning electron microscopy (ESEM) in biomaterials field. **Microscopy Research and Technique**, v.61, p.469-480, 2003.
157. MANO, E.B.; MENDES, L.C. **Introdução a polímeros**. 2.ed. São Paulo: Edgard Blucher, 1999. 191p.
158. MANZER, L.E. The CFC-ozone issue: progress on the development of alternatives to CFCs. **Science**, v.249, n.4964, p.31-35, 1990.
159. MAO, S.; SHUAI, X.; UNGER, F.; SIMON, M.; BI, D.; KISSEL, T. The depolymerization of chitosan: effects on physicochemical and biological properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v.281, p.45-54, 2004.
-

---

160. MAO, S.; SHUAI, X.; UNGER, F.; WITTMAR, M.; XIE, X.; KISSEL, T. Synthesis, characterization and cytotoxicity of poly(ethylene glycol)- grafted-trimethyl chitosan block copolymers. **Biomaterials**, v.26, p.6343- 6356, 2005.

161. MARSOLLIER, L.; BRODIN, P.; JACKSON, M.; KORDULÁKOVÁ, J.; TAFELMEYER, P.; CARBONNELLE, E.; AUBRY, J.; MILON, G.; LEGRAS, P.; ANDRÉ, J.-P.S.; LEROY, C.; COTTIN, J.; GUILLOU, M.L.J.; REYSSET, G.; COLE, S.T. Impact of *Mycobacterium ulcerans* biofilm on transmissibility to ecological niches and Buruli ulcer pathogenesis. **PLoS Pathogens**, v.3, n.5, p.582-594, may 2007.

162. MARTINY, H.; FLOSS, H. Residual on medical devices following reprocessing. **Journal of Hospital Infection**, n.48 (SA), p.S88-S92, 2001.

163. MBITHI, J.N.; SPRINGTHORPE, V.S.; SATTAR, S.A.; PACQUETTE. Bactericidal, Virucidal, and Mycobactericidal Activities of Reused Alkaline Glutaraldehyde in an Endoscopy Unit. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, n.11, p.2988-2995, 1993.

164. MCCARTHY, S.J.; GORDON, F.M.; MITCHELL, N.; GUNATILLAKE, P.A.; HEATH, G.; BRANDWOOD, A.; SCHINDHELM, K. *In vivo* degradation of polyurethanes: transmission-FTIR microscopic characterization of polyurethanes sectioned by cryomicrotomy. **Biomaterials**, v.18, p.1387-1409, 1997.

165. MCDONNELL, G.; RUSSELL, A.D. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.1, p.147-179, Jan. 1999.

166. MELLO, M.M.; STUDDERT, D.M.; THOMAS, E.J.; YOON, C.S.; BRENNAN, T.A. Who pays for medical errors?: an analysis of adverse event costs, the medical liability system, and incentives for patient safety improvement. **Journal of Empirical Legal Studies**, v.4, n.4, p.835-860, 2007.

167. MERRET, K.; CORNELIUS, R.M.; MCCLUNG, W.G.; UNSWORTH, L.D.; SHEARDOWN, H. Surface analysis methods for characterizing polymeric biomaterials. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v.13, n.6, p.593-621, 2002.

168. MEYERS, H.; BROWN-ELLIOTT, B.A.; MOORE, D.; CURRY, J.; TRUONG, C.; ZHANG, Y.; WALLACE, R.J. An Outbreak of *Mycobacterium chelonae* Infection Following Liposuction. **Clinical Infectious Diseases**, v.34, p.1500-1507, 2002.

---

---

169. MIGUEZ-BURBANO, M.J.; SHOR-POSNER, G.; HADRIGAN, S. Non-tuberculous mycobacteria in HIV-infected patients: geographic, behavioural, and immunological factors. Disponível em: <<http://infection.thelancet.com>>, v.5, July 2005. Acesso em: 22 de abril de 2009.

170. MOISAN, M.; BARBEAU, J.; MORTEAU, S.; PELLETIER, J.; TABRIZIAN, M.; YAHIA, L.H. Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. **International Journal of Pharmaceutics**, v.226, n.1/2, p.1-21, 2001a.

171. MOISAN, M.; BARBEAU, J.; PELLETIER, J.; PHILIP, N.; SAOUDI, B. Plasma sterilization: mechanisms, potential and shortcomings. **Le Vide: Science, Technique et Applications**. n.esp., p.12-18, 2001b. (Actes de 13<sup>th</sup> International Colloquium Plasma Processes (CIP 2001)).

172. MOISAN, M.; BARBEAU, J.; CREVIER, M.C.; PELLETIER, J.; PHILIP, N.; SAOUDI, B. Plasma sterilization: methods and mechanisms. **Pure and Applied Chemistry**, v.74, n.3, p.349-358, 2002.

173. MOREAU, S.; MOISAN, M.; TABRIZIAN, M.; BARBEAU, J.; PELLETIER, J.; RICARD, A.; YAHIA, L.H. Using the flowing afterglow of a plasma to inactivate *Bacillus subtilis* spores: influence of operating conditions. **Journal of Applied Physics**, v.88, n.2, p.1166-1174, 2000.

174. MOREIRA, A.J.; MANSANO, R.D.; PINTO, T.J.A.; RUAS, R.; ZAMBON, L.S.; SILVA, M.S.; VERDONCK, P.R. Sterilization by oxygen plasma. **Applied Surface Science**, v.235, p.151-155, 2004.

175. MORRISON, C.; MACNAIR, R.; MACDONALD, C.; WYKMAN, A.; GOLDIE, I.; GRANT, M.H. *In vitro* biocompatibility testing of polymers for orthopaedic implants using cultured fibroblasts and osteoblasts. **Biomaterials**, v.16, n.13, p.987-992, 1995.

176. MOTT-SMITH, H.M. Letter to Nature. **Nature**, p.233:219, sep 1971.

177. MURCIA, M.I.; LEÓN, C.I.; HOZ, F.; SARAIVA, J. Asociación Micobacterias-VIH/SIDA em Pacientes Atendidos en un Hospital Universitario en Bogotá, Colombia. **Revista de Salud Pública**. v.9, n.1, p.97-105, 2007.

---

---

178. MURILLO, J.; TORRES, J.; BOFILL, L.; RIOS-FABRA, A.; IRAUSQUIN, E.; ISTURIZ, R.; GUZMAN, M.; CASTRO, J.; RUBINO, L.; CORDIDO, M. Skin and wound infection by rapidly growing mycobacteria: An unexpected complication of liposuction and liposculpture. **Archives of Dermatology**, v.136, p.1347-1352, 2000.

179. NAIR, B.; ELMORE, A.R. Final Report on the Safety Assessment of Sodium Sulfite, Potassium Sulfite, Ammonium Sulfite, Sodium Bisulfite, Ammonium Bisulfite, Sodium Metabisulfite and Potassium Metabisulfite. **International Journal of Toxicology**, v.22, p.63-88, June 2003.

180. NEWMAN, M.I.; CAMBEROS, A.E.; ASCHERMAN, J. Mycobacteria abscessus outbreak in US patients linked to offshore surgicenter. **Annals of Plastic Surgery**, v.55, p.107-110, 2005.

181. NEWPORT, M. The genetics of nontuberculous mycobacterial infection. **Expert reviews in molecular medicine**, v.5, n.28, Feb 2003.

182. NGUYEN, C.; TOMFORD, J.W.; DESAI, M.M. Retroperitoneal cold abscess caused by *Mycobacterium chelonae abscessus* after percutaneous nephrolithotomy in India: strategies for detection, management, and prevention in the United States. **Urology**, v.73, n.1, 2009.

183. NOLAN, C.M.; HASHISAKI, P.A.; DUNDAS, D.F. An outbreak of soft-tissue infections due to *Mycobacterium fortuitum* associated with electromyography. **Journal Infection of Disease**, v.163, p.1150-1153, 1991.

184. O ESTADO DE SÃO PAULO. Micobactéria pode ter afetado 4 mil pacientes, reconhece Anvisa. Reportagem: Fabiane Leite. 29 nov. 2008. Disponível em: <[http://www.estadao.com.br/estadaodehoje/20081129/not\\_imp285545,0.php](http://www.estadao.com.br/estadaodehoje/20081129/not_imp285545,0.php)>. Acesso em: 4 dez. 2008.

185. O ESTADO DE SÃO PAULO. País tem 78 casos suspeitos de bactéria que causou surto hospitalar há 2 anos. Reportagem: Lígia Formenti. 26 ago 2010. Disponível em: [http://www.estadao.com.br/estadaodehoje/20100826/not\\_imp600488,0.php](http://www.estadao.com.br/estadaodehoje/20100826/not_imp600488,0.php). Acesso em: 03 set. 2010.

186. OHSHIMA, T.; SATA, K.; TERAUCHI, H.; SATO, M. Physical and chemical modifications of high-voltage pulse sterilization. **Journal of Electrostatics**, n.42, p.159-166, 1997.

---



- 
187. OJHA, A.; HATFULL, G.F. The role of iron in *Mycobacterium smegmatis* biofilm formation: the exochelin siderophore is essential in limiting iron conditions for biofilm formation but not for planktonic growth. **Molecular Microbiology**, n.66, v.2, p.468-483, 2007.
188. OLIVEIRA, D.C. **Esterilização por óxido de etileno**: estudos de efetividade esterilizante de misturas não explosivas e compatíveis com a camada de ozônio. São Paulo, 2000. 159p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
189. OLIVEIRA, D.C.; PINTO, T.J.A. Influência da concentração gasosa sobre a efetividade esterilizante da mistura Oxyfume 2002<sup>®</sup> (óxido de etileno diluído em HCFCs 22 e 124). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.37, n.2, p.203-209, 2001.
190. OLIVEIRA, D.C.; PINTO, T.J.A. Study of sterilizing effectivity of different ethylene oxide gaseous mixtures using CFCs and HCFCs (Oxyfume 12<sup>®</sup> and Oxyfume 2002<sup>®</sup>). **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v.56, n.5, p.242-247, 2002.
191. OLIVEIRA, R.S.; SIRCILI, M.P.; OLIVEIRA, E.M.D.; BALIAN, S.C.; FERREIRA-NETO, J.S.; LEÃO, S.C. Identification of *Mycobacterium avium* genotypes with distinctive traits by combination of IS1245-RFLP and restriction analysis of *hsp65*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.44-49, 2003.
192. O'TOOLE, G.A.; KAPLAN, H.B.; KOLTER, R. Biofilm Formation as Microbial Development. **Annual Review Microbiology**, v.54, p.49-79, 2001.
193. PADOVEZE, M.C.; DEL MONTE, M.C.C. **Esterilização de artigos em unidades de saúde**. 2.ed. São Paulo: Associação Paulista de Estudos e Controle de Infecção Hospitalar, 2003. 156p.
194. PAI, S.M.; ZELL, P.E. Method for real time monitoring and control of load sterilization and parametric release. Patent 5788925 Issued on August 4, 1998. Estimated Expiration Date: February 16, 2016.
195. PAIDHUNGAT, M.; SETLOW, B.; DRIKS, A.; SETLOW, P. Characterization of Spores of *Bacillus subtilis* Which Lack Dipicolinic Acid. **Journal of Bacteriology**, v.182, n.19, p.5505-5512, 2000.
-

- 
196. PAINTER, P.C.; WATZEK, M.; KOENIG, J.L. Fourier transform infrared study of polypropylene. **Polymer**, v.18, p.1169-1172, 1977.
197. PAMULA, E.; BLAZEWICZ, M.; PALUSZKIEWICZ, C.; DOBRZYNSKI, P. FTIR study of degradation products of aliphatic polyesters-carbon fibers composites. **Journal of Molecular Structure**, v.596, p.69-75, 2001.
198. PARASHAR, D.; CHAUHAN, D.S.; SHARMA, V.D.; CHAUHAN, A.; CHAUHAN, S.V.S.; KATOCH, V.M. Optimization of Procedures for Isolation of Mycobacteria from Soil and Water Samples Obtained in Northern India. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.6, p.3751-3753, June 2004.
199. PENNA, T.C.V.; FERRAZ, C.A.M.; CASSOLA, M.A. The presterilization microbial load on used medical devices and the effectiveness of hydrogen peroxide gas plasma against *Bacillus subtilis* spores. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.20, n.7, p.465-472, 1999.
200. PINHEIRO S.R. **Avaliação da atividade micobactericida de desinfetantes químicos sobre estirpes de *Mycobacterium avium* isoladas de suínos abatidos no Estado de Santa Catarina, no ano de 1999**. [Livre Docência]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2001.
201. PINTO, T.J.A. **Aspectos fundamentais na validação do monitor biológico para a esterilização por óxido de etileno**. São Paulo, 1991. 203p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
202. PINTO, T.J.A., Peróxido de Hidrogênio como agente despirogenizante de componentes para produtos médico-hospitalares. **Revista de Saúde Pública**, v.29, n.1, p.75-79, 1995.
203. PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. São Paulo: Atheneu, 2000. 309p.
204. PINTO, T.J.A.; GRAZIANO, K.U. Reprocessamento de artigos médico-hospitalares de uso único. In: FERNANDES, A.T.; FERNANDES, M.O.V.; FILHO, N.R., eds. **Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde**. São Paulo: Atheneu, 2000. p.1070-1077.
-

- 
205. PINTO, T.J.A.; OLIVEIRA, D.C. Avaliação da influência da temperatura sobre a resistência (valor D) de monitores biológicos produzidos em laboratório e adquiridos comercialmente (ATTESTR 1264, 3M), contendo *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372. **Farmácia & Química**, v.34, n.1, p.37-43, 2001.
206. PINTO, T.J.A.; GARCIA-AMOEDO, L.H.; BONATO, C.B. Esterilização por óxido de etileno. **Pharmaceutical Technology: Edição Brasileira**, v.6, n.4, p.58-67, 2002.
207. POSSARI, J.F. **Centro de Material e Esterilização. Planejamento e Gestão**. 1. ed. Iátria, Ed. Érica Ltda. São Paulo, 2003, 166p.
208. PRADO, A.C; CASTILLO, P.F. Lay clinics and an epidemic outbreak of mycobacterium skin and soft-tissue infection. **Presse Med**, v.113, p.800-801, 2004.
209. PRASITSILP, M.; SIRIWITTAYAKORN, T.; MOLLOY, R.; SUEBSANT, N.; SIRIWITTAYAKORN, P.; VEERANONDHA, S. Cytotoxicity study of homopolymers and copolymers of 2-hydroxyethyl methacrylate and some alkyl acrylates for potential use as temporary skin substitutes. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.14, p.595-600, 2003.
210. PRUITT, L.; RANGANATHAN, R. Effect of sterilization on the structure and fatigue resistance of medical grade UHMWPE. **Materials Science and Engineering, C: Biomimetic and Supramolecular Systems**, v.3, p.91-93, 1997.
211. PUMBWE, L.; SKILBECK, C.A.; WEXLER, H.M. Presence of Quorum-sensing Systems Associated with Multidrug Resistance and Biofilm Formation in *Bacteroides fragilis*. **Microbial Ecology**, v.56, n.3, p.412-419, 2008.
212. PUREVDORJ, D.; IGURA, N.; ARIYADA, O.; HAYAKAWA, I. Effect of feed gas composition of gas discharge plasmas on *Bacillus pumilus* spore mortality. **Letters in Applied Microbiology**, v.37, p.31-34, 2003.
213. RABELLO, M. **Aditivação de polímeros**. São Paulo: Artliber, 2000. 248p.
214. RAHAV, G.; PITLIK, S.; AMITAI, Z. An outbreak of Mycobacterium jacuzzii infection following insertion of breast implants. **Clinical Infecttion Disease**, v 43, p.823-830, 2006.
-

- 
215. RAJINI, M.; PRASAD, S.R.; REDDY, R.R.; BHAT, R.V.; VIMALA, K.R. Postoperative infection of laparoscopic surgery wound due to *Mycobacterium chelonae*. **Indian Journal of Medical Microbiology**, n.25, v.2, p.163-165, 2007.
216. RAMASWAMY, A.; BISWAS, J.; BRASKAR, V.; GOPAL, L.; RAJAGOPAL, R.; MADHAVAN, H.N. Postoperative *Mycobacterium chelonae* Endophthalmitis after Extracapsular Cataract Extraction and Posterior Chamber Intraocular Lens Implantation. **Ophthalmology**, v.107, n.7, jul 2000.
217. RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.S.; SCHOEN, F.J.; LEMONS, J.E. **Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine**, 2004, 864p.
218. RAVAT, B.; GSCHWIND, R.; GRIVET, M.; DUVERGER, E.; CHAMBAUDET, A.; MAKOVICKA, L. Electron irradiation of polyurethane: some FTIR results and a comparison with a EGS4 simulation. **Nuclear Instruments & Methods in Physics Research, Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms**, v.160, p.499-504, 2000.
219. RAVAT, B.; GRIVET, M.; CHAMBAUDET, A. Evolution of the degradation and oxidation of polyurethane versus the electron irradiation parameters: fluency, flux and temperature. **Nuclear Instruments & Methods in Physics Research, Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms**, v.179, p.243-248, 2001.
220. RICKERT, D.; LENDLEIN, A.; SCHMIDT, A.M.; KELCH, S.; ROEHLKE, W.; FUHRMANN, R.; FRANKE, R.P. *In vitro* cytotoxicity testing of AB-polymer networks based on oligo (caprolactone) segments after different sterilization techniques. **Journal of Biomedical Materials Research, Part B: Applied Biomaterials**, v.67, p.722-731, 2003.
221. RIJNAARTS, H.H.M.; NORDE, W.; LYKLEMA, J.; ZEHNDER, A.J.B. DLVO and steric contributions to bacterial deposition in media of different ionic strengths. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, n.14, p.179-195, 1999.
222. RODRIGUES, A.C.; WUERTZ, S.; BRITO, A.G.; MELO, L.F. Three-dimensional distribution of GFP-labeled *Pseudomonas putida* during biofilm formation on solid PAHs assessed by confocal laser scanning microscopy. **Water Science and Technology**, v.47, n.5, p.139-142, 2003.
223. ROSATO D.V. Biocompatible Polymers, Metals, and Composites, M. Szycher, ed., Technomic Publ., 1983, p.1022. in RATNER, B.D. **Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine**, 2004, p.57.
-

---

224. RTISCH-GERDES, S. Low temperature plasma sterilization--effective against mycobacteria? **Hygiene/Medizin Technik**. German, 1996.

225. RUSSEL, J.M.; LUO, M.; CICERONE, R.J.; DEEVER, L.E. Satellite confirmation of the dominance of chlorofluorocarbons in the global stratospheric chlorine budget. **Nature**, v.379, n.6565, p.526-529, 1996.

226. RUSSELL, A.D.; HUGO, W.B.; AYLIFFE, G.A.J. **Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization**. London, Oxford: Blackwell Scientific, 1982, 653p.

227. RUSSELL, A.D. Bacterial resistance to disinfectants: present knowledge and future problems. **Journal of Hospital Infection**, v.43, p.S57-S58, 1998.

228. RUSSELL, A.D.; HUGO, W.B.; AYLIFFE, G.A.J. **Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization**. London, Oxford: Blackwell Scientific, 2004, p.115-116.

229. RUTALA, W.A. Draft APIC Guideline for selection and use of disinfectants. **American Journal of Infection Control**, v.23, n.3, p.A35-A65, 1995.

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

231. RUTALA, W.A.; WEBER, D.J. Low-temperature sterilization technologies: do we need to redefine 'sterilization'? **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.17, n.2, p.87-91, 1996.

232. RUTALA, W.A.; GERGEN, M.F.; WEBER, D.J. Comparative evaluation of the sporicidal activity of new low-temperature sterilization technologies: ethylene oxide, 2 plasma sterilization systems, and liquid peracetic acid. **American Journal of Infection Control**, v.26, n.4, p.393-398, 1998.

233. RYCZKOWSKI, J.; PASIECZNA, S. Recent applications of FT-IR/PAS in surface science. **Journal de Physique IV: Proceedings**, v.109, p.79-88, 2003.

234. SADTLER Commercial Spectra: **Infrared Grating Collection**. Philadelphia: Sadtler Research Laboratories, 1985. spect.n.D6518K, D5241P, D466K, D7550K.

---

---

235. SAFRANEK, T.J.; JARVIS, W.R.; CARSON, L.A. *Mycobacterium chelonae* wound infections after plastic surgery employing contaminated gentian violet skin-marking solution. **The New England Journal of Medicine**, v.317, p.197-201, 1987.

236. SAIMAN, L. The mycobacteriology of non-tuberculous micobactéria. **Paediatric Respiratory Reviews**, v.5 (Supl A), p.S221-S223, 2004.

237. SAKURAGI, Y.; KOLTER, R. Quorum-Sensing Regulation of the Biofilm Matrix Genes (*pel*) of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v.189, n.14, p.5383-5386, July 2007.

238. SAMMONS, R.; MARQUIS, P. Application of the low vacuum scanning electron microscopy to the study of biomaterials and mammalian cells. **Biomaterials**, v.18, p.81-86, 1997.

239. SAMPAIO, J.L.; CHIMARA, E.; FERRAZOLI, L.; TELLES, M.A.; DEL GUERCIO, V.M.; JERICO, Z.V. Application of four molecular typing methods for analysis of *Mycobacterium fortuitum* group strains causing post-mammoplasty infections. **Clinical Microbiology Infection**, v.12, p.142-149, 2006a.

240. SAMPAIO, J.L.; JUNIOR, D.N.; FREITAS, D. An outbreak of keratitis caused by *Mycobacterium immunogenum*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, p.3201-3207, 2006b.

241. SARTO, F.; TORNQVIST, M.A.; TOMANIN, R.; BARTOLUCCI, G.B.; OSTERMAN-GOLKAR, S.V.; EHRENBERG, L. Studies of biological and chemical monitoring of low-level exposure to ethylene oxide. **Scandinavian Journal of Work, Environment & Health**, v.17, n.1, p.60-64, 1991.

242. SCHOREY, J.S.; SWEET, L. The mycobacterial glycopeptidolipids: structure, function, and their role in pathogenesis. **Glycobiology**, v.18, n.11, p.832-841, 2008.

243. SCHULZE-ROBBECKE, R.; JANNING, B.; FISCHEDER, R. Occurrence of mycobacteria in biofilm samples. **Tuberculosis Lung Disease**, v.73, p.141-144, 1992.

244. SEABRA, F.P.; ROZENBERG, I.; ANDRADE, M.; AZAMBUJA, D. Ceratite pelo *Mycobacterium chelonae* após laser in situ ceratomileusis (lasik). Estudo microbiológico e histopatológico: relato de um caso - P018. **Resumo dos painéis do XXXI Congresso de Oftalmologia**. Disponível em: <<http://www.abonet.com.Br/abo/644s/painel01.htm>>. Acesso em: 13 outubro 2008.

---

---

245. SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE SÃO PAULO. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac” (Campinas). Comunicado. Disponível em: <ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc\_tec/ih/mf\_com161204.pdf>. Acesso em: 15 agosto 2007.

246. SERRANO, M.C.; PAGANI, R.; PENA, J.; PORTOLES, M.T. Transitory oxidative stress in L929 fibroblast cultured on poly(caprolactone) films. **Biomaterials**, v.26, p.5827-5834, 2005.

247. SHANGGUAN, Y.; WANG, Y.; WU, Q.; CHEN, G. The mechanical properties and in vitro biodegradation and biocompatibility of UV-treated poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). **Biomaterials**, v.27, p.2349-2357, 2006.

248. SHEN, F.; YU, Y.; McKELLOP, H. Potential errors in FTIR measurement of oxidation in ultrahigh molecular weight polyethylene implants. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.48, p.203-210, 1999.

249. SHINTANI, H. The relative safety of gamma-ray, autoclave and ethylene oxide gas sterilization of the thermosetting polyurethane. **Biomedical Instrumentation & Technology**, v.29, n.6, p.513-519, 1995.

250. SIDOUNI, F.Z.; NURDIN, N.; CHABRECEK, P.; LOHMANN, D.; VOGT, J.; XANTHOPOULOS, N.; MATHIEU, H.J.; FRANCOIS, P.; VAUDAUX, P.; DESCOUTS, P. Surface properties of a specifically modified high-grade medical polyurethane. **Surface Science**, v.491, p.355-369, 2001.

251. SILVA, V.S.; MORÉS, N.; FERREIRA, F.; DIAS, R.A.; BALIAN, S.C.; DUTRA, V. Identificação dos fatores de risco associados à ocorrência de micobacterioses no sul do Brasil. Estudo caso-controle. **Arquivos Instituto Biológico**, v.68, p.19-22, 2001.

252. SILVA, M.V. **Influência da reutilização na biocompatibilidade de materiais médico-hospitalares de uso único**. São Paulo, 2002. 190p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

253. SILVA, J.M.F.; MOREIRA, A.J.; OLIVEIRA, D.C.; BONATO, C.B.; MANSANO, R.D.; PINTO, T.J.A. Comparative sterilization effectiveness of plasma in O<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mixtures and ethylene oxide treatment. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, n.61, v.3, p.204-210, May-Jun 2007.

---

---

254. SIMMON, K.E.; POUNDER, J.I.; GREENE, J.N.; WALSH, F.; ANDERSON, C.M.; COHEN, S.; PETTI, C.A. Identification of an emerging pathogen, *Mycobacterium massiliense*, by *rpoB* sequencing of clinical isolates collected in United States. **Journal of Clinical Microbiology**, p.1978-1980, Jun 2007.

255. SIMÕES, M.; SIMÕES, L.C.; VIEIRA, M.J. Species association increases biofilm resistance to chemical and mechanical treatments. **Water Research**, n.43, p.229-237, 2009.

256. SMITH, P.G. Continuous monitoring of EtO concentrations during sterilization. **Medical Device & Diagnostic Industry**, v.23, n.2, p.80-88, 2001.

257. SOLOSHENKO, L.A.; KHOMICH, V.A.; TSIOLKO, V.V.; MIKHNO, I.L.; SHEHEDRIN, A.I.; RYABTSEV, A.V. Experimental and theoretical investigation of cold sterilization of medical instruments by plasma DC glow discharge. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PLASMA CHEMISTRY, 14, Prague, 1999. **Proceedings**. Prague, 1999. p.2551.

258. SOLOSHENKO, L.A.; TSIOLKO, V.V.; KHOMICH, V.A.; SHEHEDRIN, A.I.; RYABTSEV, A.V.; BAZHENOV, V.Y.; MIKHNO, I.L. Sterilization of medical products in low-pressure glow discharges. **Plasma Physics Reports**, v.26, n.9, p.792-800, 2000.

259. SOLOSHENKO, L.A.; TSIOLKO, V.V.; KHOMICH, V.A.; BAZHENOV, V.Y.; RYABTSEV, A.V.; SHEHEDRIN, A.I.; MIKHNO, I.L. Features of sterilization using low pressure DC discharge hydrogen peroxide plasma. **IEEE Transactions on Plasma Science**, v.30, n.4, p.1440-1444, 2002.

260. SONG, J.Y.; SOHN, J.W.; JEONG, H.W.; CHEONG, H.J.; KIM, W.J.; KIM, M.J. AN outbreak of post-acupuncture cutaneous infection due to *Mycobacterium abscessus*. **BMC Infectious Diseases**, n.6, v.6, 2006. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2334/6/6>>. Acesso em: 28 julho 2009.

261. SOTO, L.E.; BOBADILLA, M.; VILLALOBOS, Y. Post-surgical nasal cellulitis outbreak due to *Mycobacterium chelonae*. **Journal of Hospital Infection**, v.19, p.99-106, 1991.

262. SOWA, M.G.; DAHLIA, F.; EYSEL, H.H.; MANTSCH, H.H. FTIR-PAS depth profiling investigation of polyethylene surface sulfonation. **Journal of Molecular Structure**, n.379, p.77-85, 1996.

---



---

263. SPERLING, L.H. **Introduction To Physical Polymer Science**. 4.ed. John Wiley & Sons, inc. Publication, Hoboken, New Jersey, 2006, 866p.

264. SPOERING, A.L.; GILMORE, M.S. Quorum sensing and DNA release in bacterial biofilms. **Current Opinion in Microbiology**, v.9, p.133-137, 2006.

265. STAMPI, S.; De LUCA, G.; ZANETTI, F. Evaluation of the efficiency of peracetic acid in the disinfection of sewage effluents. **Journal of Applied Microbiology**, n.91, p.833-838, 2001.

266. STAMPI, S.; De LUCA, G.; ONORATO, M.; AMBROGIANI, E.; ZANETTI, F. Peracetic acid as an alternative wastewater disinfectant to chlorine dioxide. **Journal of Applied Microbiology**, v.93, p.725-731, 2002.

267. STEELMAN, V.M. Ethylene oxide: the importance of aeration. **AORN Journal**, v.55, n.3, p.773-785, 1992.

268. STEWART, P.S; COSTERTON, J.W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **The Lancet**, v.358, p.135-138, 2001.

269. STIENSTRA, Y.; van der GRAAF, W.T.A.; TE MEERMAN, G.J.; THE, T.H.; DE LEIJ, L.F.; van der WERF, T.S. Susceptibility to development of Mycobacterium ulcerans disease: review of possible risk factors. **Tropical Medicine and International Health**, v.6, n.7, p.554-562, Jul 2001.

270. STRAUS, E.; WU, N. Radioimmunoassay of Tuberculo-protein Derived from Mycobacterium tuberculosis. **Proceedings: National Academy of Sciences of the United States of America**, v.77, n.7, [Part 2: Biological Sciences] (jul 1980), p.4301-4304.

271. STROBEL, M.; WALZAK, M.J.; HILL, J.M.; LIN, A.; KARBASHEWSKI, E.; LYONS, C.S. A comparison of gas-phase methods of modifying polymer surfaces. **Journal of Adhesion Science Technology**, v.9, n.3, p.365-383, 1995.

272. STUART, B. **Modern infrared spectroscopy**. Chichester: John Wiley, 1996. 180p. (Analytical Chemistry by Open Learning).

273. STUART, B. **Biological applications of infrared spectroscopy**. Chichester, New York: John Wiley, 1997. 191p. (Analytical Chemistry by Open Learning).

---

---

274. SUGIURA, M.; MURASE, A.; MITSUOKA, T. Distribution analysis of functional groups in polymers by derivatization-electron probe X-ray microanalysis. **Polymer Degradation and Stability**, v.72, p.393-398, 2001.

275. SUTTON, S.V.W.; PROUD, D.W.; RACHUI, S.; BRANNAN, D.K. Validation of Microbial Recovery from Disinfectants. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v.56, n.5, Sep/Oct 2002.

276. SUTTON, P.M.; QUINT, J.; PRUDHOMME, J.; FLATTERY, J.; MATERNA, B.; HARRISON, R. Glutaraldehyde Exposures Among Workers Making Bioprosthetic Heart Valves. **Journal of Occupational and Environmental Hygiene**, v.4, n.5, p.311-320, 2007.

277. SVORCIK, V.; KOLAROVA, K.; SLEPICKA, P.; MACKOVA, A.; NOVOTNA, M.; HNATOWICZ, V. Modification of surface properties of high and low density polyethylene by Ar plasma discharge. **Polymer Degradation and Stability**, v.91, n.6, p.1219-1225, 2006.

278. SZOPINSKI, F.G.; PUSKAR, M.A.; HECKER, L.H. Field validation of three passive dosimeters for excursion limit monitoring of ethylene oxide. **American Industrial Hygiene Association Journal**, v.52, n.4, p.151-157, 1991.

279. TAJIMA, S.; KOMVOPOULOS, K. Effect of ion energy fluency on the topography and wettability of low-density polyethylene exposed to inductively coupled argon plasma. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v.39, p.1084-1094, 2006.

280. TAUBERT, A.; WINEY, K.L. Imaging and X-ray microanalysis of a poly(ethylene-ran-methacrylic acid) ionomer melt neutralized with sodium. **Macromolecules**, v.35, p.7419-7426, 2002.

281. TELENTI, A.; MARCHESI, F.; BALZ, M.; BALLY, F.; BOTTGER, E.C.; BODMER, T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, p.175-178.

282. THEMNER, K.; SPANNE, P.; JONES, K.W. Mass loss during X-ray microanalysis. Nuclear Instruments & Methods. In: **Physics Research, Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms**, v.49, p.52-59, 1990.

---

- 
283. TIWARI, T.S.P.; RAY, B.; K.C.J., JR.; RATHOD, M.K.; ZHANG, Y; BROWN-ELLIOTT, B.A.; HENDRICKS, K.; JR, R.J.W. Forty Years of Disinfectant Failure: Outbreak of Postinjection *Mycobacterium abscessus* Infection Caused by Contamination of Benzalkonium Chloride. **Clinical Infectious Diseases**, n.36, p.954-962, 2003.
284. TORRES, J.R.; RIOS-FABRA, A.; MURILLO, J.; MONTECINOS, E.; CACERES, A.M. Injection site abscess due to the *Mycobacterium fortuitum-chelonae* complex in the immunocompetent host. **Infection Disease Clinical Practice**, v.7, p.56-60, 1998.
285. TORTOLI, E. Standard operating procedure for optimal identification of mycobacteria using 16S rRNA gene sequences. **Standards in Genomic Sciences**, v.3, p.145-152, 2010.
286. TOY, B.R.; FRANK, P.J. Outbreak of *Mycobacterium abscessus* infection after soft tissue augmentation. **Dermatologic Surgery**, v.29, p.971-973, 2003.
287. TRUPIANO, J.K.; SEBEK, B.A.; GOLDFARB, J.; LEVY, L.R.; HALL, G.S.; PROCOP, G.W. Mastitis due to *Mycobacterium abscessus* after body piercing. **Clinical Infection Disease**, v.33, n.1, p.131-134, 2001.
288. TYAN, Y.; LIAO, J.; LIN, S.; CHEN, C. The study of the sterilization effect of gamma ray irradiation of immobilized collagen polypropylene nonwoven fabric surfaces. **Journal of Biomedical Materials Research, Part A**, v.67, p.1033-1043, 2003.
289. UNITED States Pharmacopeia. USP 23; Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1995.
290. UNITED States Pharmacopeia. USP 29; The National Formulary: NF24. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2006.
291. UNITED States Pharmacopeia. USP 30; Microbiological Best Laboratory Practices, Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2008. p.93; p.596
292. UNITED States Pharmacopeia. USP 30; Validation of microbial recovery from pharmaceutical articles, Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2008. p.684.
-

---

293. UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Instituto de Física. Departamentos: Física Aplicada (FAP). Filmes Finos. **Laboratório de Filmes Finos**. Disponível em: <<http://fap01.if.usp.br/>>. Acesso em: 10 jul. 2006.

294. VERDONCK, P.B. **Estudo sobre danos induzidos por plasma**. São Paulo, 1998. 147p. Tese de Livre Docência – Escola Politécnica – Universidade de São Paulo.

295. VIANA-NIERO, C.; LIMA, K.V.; LOPES, M.L.; RABELLO, M.C.; MARSOLA, L.R.; BRILHANTE, V.C.; DURHAM, A.M.; LEÃO, S.C. Molecular characterization of *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolleti* in isolates collected from outbreaks of infections after laparoscopic surgeries and cosmetic procedures. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, n.3, p.850-855, mar 2008.

296. VIJAYARAGHAVAN, R.; CHANDRASHEKHAR, R.; SUJATHA, Y. Hospital outbreak of atypical mycobacterial infection of port sites after laparoscopic surgery. **Journal of Hospital Infection**, v.64, p.344-347, 2006.

297. VILLANUEVA, A.; CALDERON, R.V.; VARGAS, B.A.; RUIZ, F.; AGÜERO, S.; ZHANG, Y.; BROWN, B.A.; WALLACE Jr., R.J. Report on an outbreak of postinjection abscesses due to *Mycobacterium abscessus*, including management with surgery and clarithromycin therapy and comparison of strains by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. **Clinical Infection Disease**, n.24, p.1147-1153, 1997.

298. VINOGRADOV, I.; LUNK, A. Spectroscopic diagnostics of DBD in Ar/fluorocarbon mixtures – correlation between plasma parameters and properties of deposited polymer films. **Plasma Processes and Polymers**, v.2, p.201-208, 2005.

299. VIZCAINO-ALCAIDE, M.J.; HERRUZO-CABRERA, R.; FERNANDEZ-ACEÑERO, M.J. Comparison of the disinfectant efficacy of Perasafe1 and 2% glutaraldehyde in *in vitro* tests. **Journal of Hospital Infection**, v.53, p.124-128, 2003.

300. WALSH, S.E.; MAILLARD, J-E.; RUSSELL, A.D. *Ortho*-phthalaldehyde: a possible alternative to glutaraldehyde for high level disinfection. **Journal of Applied Microbiology**, n.86, p.1039-1046, 1999.

301. WANG, J.; PAN, C.J.; HUANG, N.; SUN, H.; YANG, P.; LENG, Y.X.; CHEN, J.Y.; WAN, G.J.; CHU, P.K. Surface characterization and blood compatibility of poly(ethylene tetrphthalate) modified by plasma surface grafting. **Surface and Coatings Technology**, n.196, p.307-311, 2005.

---

- 
302. WANG, I.-W.; ANDERSON, J.M.; MARCHANT, R.E. *Staphylococcus epidermidis* adhesion to hydrophobic biomedical polymer is mediated by platelets. **Journal of Infectious Disease**, n.167, p.329-336, 1993.
303. XU, L.; TERASHITA, F.; NONAKA, H.; OGINO, A.; NAGATA, T.; KOIDE, Y.; NANKO, S.; KURAWAKI, I.; NAGATSU, M. Discharge conditions for CW and pulse-modulated surface-wave plasmas in low temperature sterilization. **Journal of Physics D: Applied Physics**, n.39, p.148-152, 2006.
304. YAMAZAKI, Y.; DANELISHVILI, L.; WU, M.; MACNAB, M.; BERMUDEZ, L.E. *Mycobacterium avium* genes associated with the ability to form biofilm. **Applied and Environmental Microbiology**, p.819-825, Jan 2006.
305. YANG, C.Q.; BRESEE, R.R.; FATELEY, W.G. Near-surface analysis and depth profiling by FT-IR photoacoustic spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, v.41, n.5, p.889-896, 1987.
306. YANG, C.Q. Infrared spectroscopic analysis of textile materials degradation using photoacoustic detection. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.31, p.617-621, 1992.
307. YANG, H.; YARAJ, J.I.; SAKHAMURI, S. Characterization of edible coatings and microorganisms on food surfaces using Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, v.55, n.5, p.571-582, 2001.
308. YUE-E, F.; JUN, J.; CHAOXIONG, M. Study of radiation-induced grafting of 2-hydroxyethyl methacrylate to chloroprene rubber membrane. **Radiation Physics and Chemistry**, v.54, p.159-163, 1999.
309. ZHIBANG, Y.; BIXIA, Z.; QISHAN, L. Large-scale outbreak of infection with *Mycobacterium chelonae* subsp. abscessus after penicillin injection. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p.2626-2628, 2002.
310. ZOBELL, C.E. The influence of solid surface on the physiological activities of bacteria in sea water. **Journal of Bacteriology**, n.33, p.86, 1937.
311. ZREIQAT, H.; EVANS, P.; HOWLETT, C.R. Effect of surface chemical modification of bioceramic on phenotype of human bone-derived cells. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.44, p.389-396, 1999.
-