

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE FÍSICA

João Henrique Campos de Souza

Estudos de esterilização por plasma a pressão atmosférica

Brasília

2012

João Henrique Campos de Souza

Estudos de esterilização por plasma a pressão atmosférica

Tese apresentada ao Instituto de Física da  
Universidade de Brasília para obtenção de  
título de Doutor em Física.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Cleves Nunes de Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. José Leonardo Ferreira

Brasília

2012

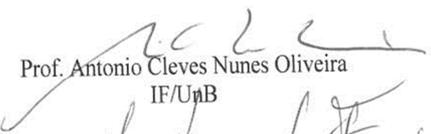
## “Estudos de esterilização por plasma a pressão atmosférica”

Por

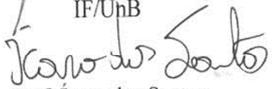
**João Henrique Campos de Souza**

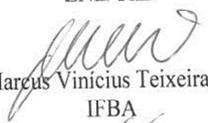
Tese submetida ao Instituto de Física da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Física.

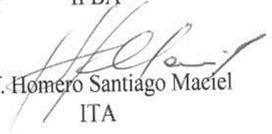
Aprovada por:

  
Prof. Antonio Cleves Nunes Oliveira  
IF/UnB

  
Prof. José Leonardo Ferreira  
IF/UnB

  
Prof. Ícaro dos Santos  
ENE/UnB

  
Prof. Marcus Vinicius Teixeira Navarro  
IFBA

  
Prof. Homero Santiago Mael  
ITA

Prof. Dr. Demétrio Antônio da Silva Filho  
Coordenador de Pós-Graduação  
Instituto de Física

# AGRADECIMENTOS

A minha esposa, Tarsila Campolina, a meu enteado Mateus, a meus pais, Livia e João Teodoro, a meus irmãos João Vitor e Rodrigo e a toda a minha família, pelo amor e pelo incentivo.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. José Leonardo Ferreira e Prof. Dr. Antonio Cleves Nunes Oliveira, pelos ensinamentos, pela amizade, pela paciência, pela ajuda nas dificuldades e pelo entusiasmo de abrir as portas do Laboratório de Plasmas da UnB para uma linha de pesquisa nova.

Aos membros da banca examinadora, pelas importantes contribuições para a finalização do trabalho.

A todos os meus amigos e colegas de trabalho, que certamente contribuíram para essa conquista. Afinal, doutorado não é só estudo!

A todos os meus professores e professoras.

Aos servidores dos Institutos de Física e de Biologia da Universidade de Brasília.

À Agência Nacional de Vigilância Sanitária, pela compreensão da relevância do trabalho e pelo apoio para o seu desenvolvimento.

# RESUMO

Apesar da variedade de tecnologias disponíveis aos serviços de saúde para o processamento dos produtos para a saúde, as especificidades de cada instrumental são determinantes na escolha do método mais indicado. Atualmente, o desafio da área tecnológica é desenvolver métodos eficazes para o processamento de materiais que não podem ser submetidos a grandes estresses físicos, como temperatura e pressão. A esterilização por plasma é uma tecnologia que chama muito a atenção pela rapidez, segurança e efetividade. Apesar de se denominarem esterilizadores por plasma, os produtos hoje no mercado têm como principal agente esterilizante o vapor de Peróxido de Hidrogênio e o Ácido Peracético, ficando a etapa de produção de plasma responsável pela remoção de resíduos tóxicos da superfície dos materiais esterilizados.

Uma das linhas de pesquisa do Laboratório de Plasmas da Universidade de Brasília é o desenvolvimento de fontes de plasma para controle de poluentes. O presente trabalho baseou-se na montagem e adaptação de uma dessas fontes para estudos de esterilização a pressão atmosférica. A descarga do tipo barreira dielétrica foi produzida utilizando-se ar comum como gás precursor e tensões AC de 16,3 kV e 60Hz. Na validação microbiológica, foram utilizados esporos de *Geobacillus stearothermophilus*, considerados os mais resistentes ao processo de esterilização por plasma. O protocolo de validação microbiológica incluiu exposições de amostras biológicas com pelo menos  $10^5$  esporos viáveis ao plasma por 2, 5, 10, 15, 20 e 40 minutos.

Em razão das baixas correntes elétricas obtidas na descarga, a potência média do sistema foi de 14,6W. Foi obtido valor de redução decimal dos esporos viáveis, ou valor-D,

de 8,40 minutos, tempo um pouco maior que o relatado por autores que trabalharam com fontes semelhantes. Associou-se esse resultado ao posicionamento das amostras biológicas em relação à descarga e à baixa potência do sistema. Houve variações de até 30% na contagem de células viáveis para cada tempo de exposição ao plasma. Associou-se a velocidade da morte microbiana, e, por conseguinte, a capacidade biocida do plasma, com a variação da umidade relativa do ar, a qual influencia na quantidade de espécies reativas derivadas da dissociação da molécula de água no plasma, como a hidroxila e alguns óxidos. Ainda assim, foi obtida a eliminação de todos os esporos viáveis após 40 minutos de exposição ao plasma.

**Palavras-chave:** plasma; esterilização; descarga a pressão atmosférica; *Geobacillus stearothermophilus*.

# ABSTRACT

Despite the variety of technologies available to health services for the processing of health care products, the characteristics of each instrument are decisive in the choice of the most appropriate method. Currently, the technological challenge is to develop efficient methods to disinfect and sterilize heat-sensitive materials, which cannot be subjected to great physical stress. The plasma sterilization is a technology that draws a lot of attention for it congregates quickness, safety and effectiveness. Although called plasma sterilization systems, the equipment available today have as primary sterilization agents the Hydrogen Peroxide and Peracetic Acid, and the plasma phase is responsible mainly for the removal of toxic residuals from the surface of the sterilized material.

One research line of the Plasmas Laboratory at the University of Brasilia is the development of plasma sources for pollutant control. The present work is based on the assembly and adjustment of one of these sources for sterilization studies at atmospheric pressure. A single dielectric barrier discharge was produced using ordinary air as the precursor gas and AC voltages of 16.3 kV and 60 Hz. In microbiological validation, we used *Geobacillus stearothermophilus*' spores, considered the most resistant to the plasma sterilization process. The validation protocol included the exposure of biological samples with at least  $10^5$  viable spores to the plasma for 2, 5, 10, 15, 20 and 40 minutes.

Because of the low electrical currents obtained in the discharge, the average power of the system was 14.6 W. The decimal reduction time of viable spores, or D-value obtained was 8.40 minutes, a time slightly higher than the ones reported by authors who work with similar sources. We associated this result to the positioning of the biological samples in our device

and the low power of our system. There were variations of 30% in the counting of viable cells for each exposure time to the plasma. We associated the kinetics of the microbial death, and therefore the biocidal capability of the plasma, to the variations on the relative humidity of the air. These variations lead to changes in the concentration of reactive species produced from dissociation of the water molecule in plasma such as the hydroxyl and some oxides. Nevertheless, we observed the elimination of all viable spores after 40 minutes exposure to plasma.

**Keywords:** plasma; sterilization; atmospheric pressure discharge; *Geobacillus stearothermophilus*.

# LISTA DE FIGURAS

Legenda da figura	Página
Figura 1.1 – Distribuição dos casos notificados de infecção por MCR associados a procedimentos invasivos, segundo ano de realização do procedimento. Brasil, 1998-2009. Reproduzida de [4].	21
Figura 1.2 – Etapas do ciclo de esterilização no STERRAD <sup>®</sup> . Reproduzido de [15].	27
Figura 2.1 – Representação da polarização do plasma na presença de gradientes de densidade de elétrons e íons. Em (a), as distribuições iniciais $n_e=n_i$ . Em (b), as distribuições $n_e$ , $n_i$ e a densidade de carga espacial $\rho=e(n_i-n_e)$ , algum tempo depois. As setas indicam a direção do campo de polarização. Reproduzida de [20].	39
Figura 2.2 – Curvas de Paschen para alguns gases. Reproduzida de [21].	44
Figura 2.3 – Formato e distribuição de cargas em uma avalanche de elétrons em dois momentos distintos. $E_0$ é o campo elétrico externo e $u_d$ a velocidade de propagação da cabeça da avalanche. A avalanche de elétrons é a etapa inicial de qualquer processo de ruptura elétrica de um meio; portanto, está presente na formação de vários tipos de descarga, como arco e descarga de barreira dielétrica. Imagem reproduzida de [20].	48
Figura 2.4 – A <i>streamer</i> Os fótons representados na figura produzem fotoionizações nas moléculas próximas, alimentando continuamente novas avalanches. Imagem reproduzida de [20].	49
Figura 2.5 – Uma <i>sprite</i> ocorrida na França, em 2009.	49
Figura 2.6 – Representação da transição avalanche- <i>streamer</i> . Em (a), há a propagação da avalanche em direção ao eletrodo. Em (b), há a formação da <i>streamer</i> . Em (c), há a formação de avalanches eletrônicas secundárias, decorrentes de fotoionizações provocadas pela <i>streamer</i> . Em (d), a propagação da <i>streamer</i> . Reproduzida de [20]	50
Figura 2.7– Regiões da descarga luminescente: (1) Escura de Aston, (2) luminescente (envoltória) do catodo, (3) escura do catodo, (4) luminescência negativa, (5) escura de Faraday, (6) coluna positiva, (7) escura do anodo, (8) luminescente do anodo. Características de uma descarga luminescente em um tubo: (a) intensidade luminosa com regiões escuras e luminosas, devido aos processos de ionização e recombinação no gás; (b) potencial $\phi$ ; (c) Campo elétrico longitudinal, (d) Densidades eletrônica e iônicas de corrente $j_e$ e $j_+$ , Densidade de cargas $n_e$ e $n_+$ , e (f) densidade espacial de cargas $\rho$ , característicos de plasmas fracamente ionizados. Reproduzida de [20].	52

Figura 2.8 – Imagem de uma descarga luminescente.	53
Figura 2.9 – Imagem da formação de descarga do tipo corona em linha de transmissão.	54
Figura 2.10 – Grandes descargas corona (em branco) em torno de condutores energizados por um transformador de 1,05 MV em um laboratório do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologias dos EUA em 1941.	54
Figura 2.11 – Exemplos de configurações da descarga de barreira dielétrica. Adaptada de [36].	57
Figura 2.12 – Fotografias de microdescargas em DBD a pressão atmosférica. A distância entre os eletrodos é de 1 mm. Reproduzida de [36].	58
Figura 2.13 – Descarga do tipo arco produzida em um arco de soldagem.	62
Figura 2.14 – O relâmpago é um dos exemplos mais comuns de descarga do tipo centelhamento na natureza.	63
Figura 3.1 – Representação da formação de dímeros de timina.	69
Figura 4.1 – Peça de latão sobre suporte de madeira com o eletrodo interno inserido.	76
Figura 4.2 – Vista frontal da casca cilíndrica. A borracha preta é um anel de vedação colocado sobre a ranhura onde foram encaixadas as placas de Petri durante a validação microbiológica da esterilização a plasma. Mais internamente, nota-se a peça cilíndrica de pirex encaixada dentro da casca de latão. Além disso, veem-se o eletrodo ao centro e os flanges laterais que podem ser utilizados na caracterização física do plasma, por exemplo.	76
Figura 4.3 – O eletrodo interno, de aço inoxidável, fixado na base de acrílico.	77
Figura 4.4 – Fotos dos eletrodos internos testados para uso na fonte de plasma. À esquerda, o eletrodo com pontas e à direita, o eletrodo com gumes, denominado “catodo liso”. Reproduzida de [58].	78
Figura 4.5 - Comparação entre os eletrodos internos testados. Reproduzida de [58].	78
Figura 4.6 - Esquema da fonte de plasma e do circuito de alimentação utilizados no experimento. Os flanges à esquerda são de acrílico especial. A placa de Petri com as amostras biológicas é posicionada na ranhura projetada para o anel de vedação utilizado na produção de vácuo.	80
Figura 4.7 – Representação das etapas de preparo das amostras biológicas para exposição ao plasma.	82
Figura 4.8 – Representação do tratamento dado às amostras biológicas após a exposição ao plasma. As placas de Petri com amostras expostas por 40 minutos eram apenas preenchidas com o meio de cultura, por não	84

necessitarem de diluição dos esporos viáveis.

Figura 5.1 – Fotos da fonte de plasma em operação. À esquerda, o sistema está montado para os estudos de esterilização por plasma apresentados neste trabalho e opera conforme o protocolo (16,3 kV a pressão atmosférica). Vale ressaltar que a foto foi corrigida para melhor visualização da luminosidade da descarga. À direita, uma foto do mesmo sistema sendo utilizado para estudos de eliminação de gases poluentes, reproduzida de [58]. Na ocasião, o sistema operava com tensão de 13 kV entre os polos e dentro da faixa de pressão de  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$  Torr. O gás utilizado era o  $\text{NO}_2$ . 86

Figura 5.2 – Seções de choque de ionização por impacto eletrônico da água. À esquerda, as seções de choque para a produção dos radicais  $\text{H}_2\text{O}^+$ ,  $\text{OH}^+$ ,  $\text{O}^+$ ,  $\text{O}^{++}$ ,  $\text{H}_2^+$  e  $\text{H}^+$ . À direita, as seções de choque para a produção dos radicais  $\text{OH}^-$ ,  $\text{O}^-$  e  $\text{H}^-$ . Reproduzidas de [69]. 88

Figura 5.3 - Seções de choque de ionização por impacto eletrônico do nitrogênio molecular ( $\text{N}_2$ ). À esquerda, as seções de choque para a produção dos radicais  $\text{N}_2^+$ ,  $\text{N}^+$  e  $\text{N}^{++}$ . À direita, a seção de choque de ionização total do nitrogênio molecular. Reproduzidas de [70]. 88

Figura 5.4 - Seções de choque de ionização por impacto eletrônico do oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ). Estão representadas as seções de choque total (*gross*), de produção do radical  $\text{O}_2^+$ , e de dissociação molecular (*diss*). Reproduzidas de [71]. 89

Figura 5.5 – Indicação das áreas onde há regimes distintos de difusão de plasma no sistema. 90

Figura 5.6 – Medidas de umidade relativa do ar às 9h (12h UTC) e às 15h (18h UTC) em Brasília nos mês de março de 2009, período em que foi realizada a validação microbiológica do experimento. Fonte: INMET/MAPA. 91

Figura 5.7 – Representação gráfica dos valores obtidos na contagem dos esporos viáveis *versus* tempo de exposição ao plasma. A linha sólida é a curva de ajuste do tipo  $y = a + b \cdot \exp(c \cdot t)$ . 93

# LISTA DE TABELAS

<b>Legenda da tabela</b>	<b>Página</b>
Tabela 1.1 – Distribuição dos casos notificados de infecção por MCR associadas a procedimentos invasivos, segundo o Estado de notificação. Brasil, 1998-2009. Adaptada de [4].	22
Tabela 2.1 – Ordens de grandeza das propriedades das microdescargas para DBD a pressão atmosférica com distância entre os eletrodos de 1 mm no ar. Adaptada de [36].	59
Tabela 3.1 – Composição do ar seco. Fonte: NASA Earth Fact Sheet.	71
Tabela 5.1 – Valores obtidos na contagem de esporos viáveis para cada tempo de exposição ao plasma. Cada ampola contendo esporos originou um lote de seis amostras. Foram utilizadas cinco ampolas no experimento.	92

# LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Corrente Alternada
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
CSB	Cabine de Segurança Biológica
DBD	Descarga de Barreira Dielétrica
DC	Corrente Contínua
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
ERN	Espécie Reativa de Nitrogênio
EUA	Estados Unidos da América
<i>G.</i>	<i>Geobacillus</i>
IH	Infecção Hospitalar
INMET	Instituto Nacional de Meteorologia
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
MCR	Micobactéria de Crescimento Rápido
MHD	Magnetohidrodinâmica
NASA	National Aeronautics and Space Administration
RF	Radiofrequência
UFC	Unidade(s) Formadora(s) de Colônia(s)
UnB	Universidade de Brasília
UTC	Coordinated Universal Time
UV	Ultravioleta

# LISTA DE SÍMBOLOS

- a Deslocamento máximo
- B Intensidade de campo magnético
- c Velocidade da luz
- D Constante Macroscópica de difusão
- e Carga elétrica elementar
- E Intensidade de campo elétrico
- f Frequência
- F Força
- G Processos fonte de cargas
- H Potencial vetor
- j Densidade de corrente elétrica
- $k_B$  Constante de Boltzmann
- m Massa
- n Densidade de partículas
- $N_D$  Quantidade de portadores de carga dentro da esfera de Debye
- P Processos de perda de cargas
- p Pressão
- q Quantidade de carga
- R Escala do gradiente de densidade de carga
- r Posição
- T Temperatura
- t Tempo
- u Velocidade
- x Comprimento dos passos no caminho aleatório
- $\alpha$  Coeficiente Townsend de ionização por impacto eletrônico
- $\Gamma$  Fluxo de partículas

- $\tau$  Tempo entre os passos no caminho aleatório
- $\lambda_D$  Comprimento de Debye
- $\mu$  Constante macroscópica de mobilidade
- $\nu_{ab}$  Frequência de colisão entre as espécies a e b
- $\omega_p$  Frequência angular
- $\epsilon$  Permissividade elétrica
- $\gamma$  Radiação gama
- $\sigma$  Seção de choque
- $\beta$  Livre caminho médio
- $\varphi$  Fase
- $\xi$  Parâmetro para a seção de choque efetiva
- $\rho$  Densidade de carga

Subíndices:

- A Ambipolar
- D Debye
- e Elétron
- i Íon
- p Plasma
- 0 inicial

# SUMÁRIO

	<b>Página</b>
Agradecimentos.....	4
Resumo.....	5
Abstract.....	7
Lista de figuras.....	9
Lista de tabelas.....	12
Lista de abreviaturas e siglas.....	13
Lista de símbolos.....	14
Apresentação do trabalho.....	19
Capítulo 1 – Introdução e objetivos.....	20
1.1 – Infecção hospitalar e o processamento de materiais termosensíveis.....	21
1.2 – Métodos de esterilização.....	23
1.3 – Breve histórico da esterilização por plasma.....	25
1.4 – Objetivos.....	28
Capítulo 2 – Física de plasma e descargas elétricas em gases.....	29
2.1 – Definição e caracterização.....	30
2.2 – O movimento de elétrons em campos elétricos oscilantes.....	32
2.2.1 – Oscilações livres.....	32
2.2.2 – O efeito das colisões.....	33
2.3 – Difusão em plasmas.....	35
2.3.1 – Difusão livre.....	37
2.3.2 – Difusão ambipolar.....	38
2.4 – Produção do plasma.....	42
2.4.1 – Produção de plasmas a pressão atmosférica.....	43
2.4.2 – A curva de Paschen.....	44
2.4.3 – Produção de plasma por um campo eletromagnético.....	45
2.5 – Descargas elétricas em gases.....	46

2.5.1 – A avalanche.....	47
2.5.2 – A <i>streamer</i> .....	48
2.5.3 – A descarga luminescente.....	50
2.5.4 – A descarga corona.....	53
2.5.5 – A descarga de barreira dielétrica.....	55
2.5.6 – Descargas “quentes” – arco e centelhamento.....	61
2.6 – Evitando a formação de descargas quentes em gases atômicos e moleculares.....	64
Capítulo 3 – A interação do plasma com os microrganismos e caracterização da inativação microbiana.....	66
3.1 – Validação microbiológica.....	66
3.1.1 – Valor-D.....	66
3.1.2 – Indicador biológico.....	67
3.1.3 – Padrão de morte microbiana.....	67
3.2 – Mecanismos de ação biocida do plasma.....	68
3.2.1 – Radiação UV.....	68
3.2.2 – Espécies reativas.....	70
3.2.3 – Interação com partículas carregadas.....	74
Capítulo 4 – Descrição do sistema e dos procedimentos experimentais.....	75
4.1 – A fonte de plasma.....	75
4.2 – Protocolos para a validação microbiológica.....	81
Capítulo 5 – Resultados e discussão.....	85
5.1 – Da classificação da descarga elétrica.....	85
5.2 – Da caracterização do plasma.....	87
5.3 – Da validação microbiológica.....	90
Capítulo 6 – Conclusão.....	95
6.1 – Perspectivas futuras.....	97
Referências.....	99
ANEXO A - Artigo J. H. C. Souza e J. L. Ferreira “ <i>G. stearothermophilus</i> Spores` Inactivation by a Single Dielectric Barrier Discharge in Air at Atmospheric Pressure”. <i>IEEE Trans. Plasma Sci.</i> Vol. 40, nº. 12. 2012.	104



# APRESENTAÇÃO DO TRABALHO

Este trabalho experimental versa sobre esterilização por plasma. Sabendo que se trata de um assunto multidisciplinar, procurou-se agrupar os assuntos afins em Capítulos, assim estruturados:

No Capítulo 1, são apresentados os fatos motivadores e os objetivos deste trabalho. No Capítulo 2, aborda-se a Física de Plasmas, os fenômenos mais importantes para a descrição do experimento aqui realizado, e faz-se uma breve descrição dos tipos de descargas elétricas mais utilizadas na produção de plasma para esterilização, com enfoque maior nas Descargas de Barreira Dielétrica, tipo utilizado neste trabalho.

O Capítulo 3 traz tópicos relevantes para a compreensão da interação do plasma com amostras biológicas, visando a explicar como o plasma produz a esterilização. Neste Capítulo, aprofunda-se um pouco mais na parte das espécies reativas, principais agentes esterilizantes para o caso de plasmas produzidos a pressão atmosférica.

No Capítulo 4, descreve-se o aparato experimental e os protocolos utilizados neste trabalho. No Capítulo 5, são apresentados e discutidos os resultados obtidos. O Capítulo 6 são as conclusões do trabalho. Ao final, há um os artigos oriundos deste doutoramento, publicado na IEEE Transactions on Plasma Science.

O autor.

Brasília, novembro de 2012.

# CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

É indiscutível que as Ciências da Saúde têm absorvido grande parte das tecnologias desenvolvidas ultimamente, e que esse fenômeno vem aprimorando os procedimentos aplicados pelos profissionais da área. Todavia, atrelado a esses avanços, há o emprego de instrumentais cada vez mais modernos e específicos, cuja produção e aquisição são bastante onerosos, o que torna financeiramente inviável o uso único desses materiais nos serviços de saúde, sejam eles custeados pelo Governo ou por planos de saúde. Além disso, a sustentabilidade e a qualidade ambiental ganharam destaque no planejamento estratégico dos serviços de saúde, no sentido de se reduzir a quantidade de resíduos sólidos emitidos na natureza. Da conjugação dessas questões, uma alternativa adotada pelos gestores de saúde é a reutilização de alguns produtos médicos.

Um dos grandes desafios do processamento é a garantia da esterilidade e da integridade dos produtos reprocessados. Define-se esterilização como qualquer processo capaz de eliminar ou destruir todas as formas de microrganismos presentes (vírus, bactérias, fungos, protozoários, esporos etc.) até um nível de garantia de segurança [1-3]. Há diversas modalidades de esterilização, que empregam agentes físicos, químicos ou físico-químicos; no entanto, nenhuma delas tem aplicação universal, e a opção do método de esterilização mais adequado depende das propriedades físicas e químicas do material a ser esterilizado [1, 2].

## 1.1 - INFECÇÃO HOSPITALAR E O PROCESSAMENTO DE MATERIAIS TERMOSENSÍVEIS

É alarmante o número de casos de infecção hospitalar (IH) nos serviços de saúde do Brasil nos últimos anos. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) recebe e analisa notificações de casos de IH por micobactérias de crescimento rápido (MCR) não tuberculosas de todo o país [4]. De 1998 a 2009, vinte e dois estados em todas as regiões e o Distrito Federal notificaram 2.520 casos associados a procedimentos invasivos. A Figura 1.1 traz a distribuição dos casos por ano, e a Tabela 1.1 traz a estratificação das notificações por Estado.

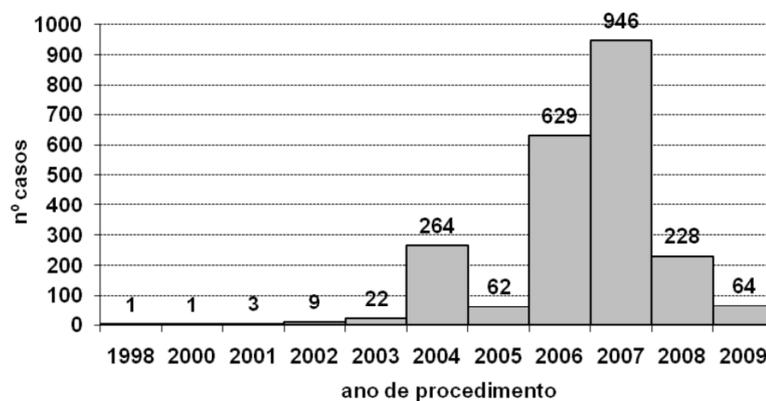


Figura 1.1 – Distribuição dos casos notificados de infecção por MCR associados a procedimentos invasivos, segundo ano de realização do procedimento. Brasil, 1998-2009.

Reproduzida de [4].

Estado de notificação	Número de casos	Percentual
RJ	1.107	43,9%
ES	363	14,4%
PA	327	13,0%
SP	193	7,7%
PR	149	5,9%
RS	115	4,6%
GO	95	3,8%
MT	50	2,0%
DF	33	1,3%
MG	31	1,2%
PI	11	0,4%
BA	11	0,4%
CE	9	0,4%
SC	6	0,2%
SE	5	0,2%
PE	5	0,2%
AL	3	0,1%
TO	2	0,1%
RR	1	0,0%
RN	1	0,0%
PB	1	0,0%
AM	1	0,0%
AC	1	0,0%
Total	2.520	100,0%

Tabela 1.1 – Distribuição dos casos notificados de infecção por MCR associadas a procedimentos invasivos, segundo o Estado de notificação. Brasil, 1998-2009. Adaptada de [4].

Entre as notificações, houve predominância (cerca de 70%) de ocorrência em pessoas submetidas a procedimentos com acesso por videocirurgia, cujo instrumental é composto, entre outros, por materiais plásticos, como trocateres, endoscópios, cânulas e fibras ópticas. Apesar de vários fabricantes classificarem esses materiais como de uso único, por motivos econômicos, os serviços de saúde optam por processar grande parte desses equipamentos e reutilizá-los. Nesse contexto, o processamento inadequado do instrumental (principalmente dos equipamentos termossensíveis) emerge como um importante fator de risco para o desenvolvimento das infecções hospitalares.

## 1.2 – MÉTODOS DE ESTERILIZAÇÃO

A esterilização com vapor saturado a pressão (autoclavação) é o método mais indicado para a esterilização de artigos termorresistentes [1-3]. A pressão interna da autoclave faz com que a temperatura de ebulição da água aumente, e a produção do vapor saturado aconteça na faixa de 121 a 135°C, temperaturas consideradas próprias para a esterilização, que acontece devido à coagulação das proteínas dos microrganismos [2, 3]. Combinações de tempo, pressão e temperatura dão ao profissional grande variedade de ciclos no processamento dos artigos.

A utilização do calor seco (estufas ou fornos de Pasteur) também é um método indicado para artigos termorresistentes [3]. Por ter como agente esterilizante somente o calor, o qual oxida as células dos microrganismos, faz-se necessário o alcance de temperaturas bastante elevadas por longo tempo [3]; essa combinação de tempo e temperatura, apesar de bem documentada na literatura, inviabiliza sua utilização na maioria dos produtos para a saúde, visto que grande parte dos artigos não suporta essas condições de exposição.

Na esterilização por irradiação, utiliza-se, em geral, uma fonte de Cobalto-60 ou de Césio-137, que são elementos radioativos predominantemente  $\gamma$ -emissores, ou aceleradores lineares. Sabe-se que a interação da radiação ionizante com os átomos e moléculas provoca diversas alterações nesses, que vão de ionizações a quebras nas estruturas moleculares [5]. A radiólise da água é um exemplo típico da interação da radiação ionizante com moléculas essenciais para a fisiologia dos seres vivos. Consequentemente, a descaracterização de substâncias e estruturas fundamentais para a vida celular (água, proteínas, aminoácidos, DNA, RNA,...) pode provocar alterações morfológicas e fisiológicas nos microrganismos, como lesões em seu material genético e formação de radicais livres que os levam a morte.

A esterilização por irradiação é um método bastante eficiente e largamente utilizado em indústrias para esterilização de artigos termossensíveis, como luvas e seringas [2, 3]. Por outro lado, é importante ressaltar que nesse método é utilizada uma fonte de radiação, cujo uso demanda uma série de cuidados com a radioproteção, infraestrutura e segurança do Centro de Material e Esterilização [6].

Entre os métodos de esterilização com produtos químicos líquidos, destaca-se o uso do glutaraldeído. A atividade biocida dessa substância dá-se por reação química de alquilação, alterando o DNA, RNA e a síntese proteica dos microrganismos [3]. A eficiência da esterilização com o glutaraldeído só é assegurada após 10 horas – em média – de imersão em solução a 2% [2]. Apesar de aplicável aos artigos sensíveis ao calor, não é um método recomendável para unidades hospitalares que demandam retorno rápido dos artigos reprocessados. Além disso, o glutaraldeído é tóxico, não biodegradável, sofre alterações nas suas propriedades a temperaturas superiores a 25°C e com alterações de pH [2, 3]. Outra substância cujos mecanismos de ação e indicações de uso são semelhantes aos do glutaraldeído é o formaldeído, cuja utilização no país é permitida apenas quando seu uso for associado a um equipamento de esterilização registrado na Agência Nacional de Vigilância Sanitária [7]. Devido a dificuldades de validação dos protocolos de esterilização, muito sensíveis a variações de temperatura, de pressão e de umidade relativa, o uso do formaldeído não é indicado para procedimentos de rotina [2].

Um método gasoso de esterilização bastante difundido no Brasil é o que aplica o gás óxido de etileno. Essa substância tem ação biocida devido à alquilação das proteínas, DNA e RNA dos microrganismos, e sua eficiência depende de parâmetros de concentração, temperatura, umidade relativa e tempo de exposição ao gás [2, 3]. Bastante utilizado para

artigos termossensíveis, é um gás explosivo e altamente inflamável, devendo ser utilizado em equipamentos especiais: as autoclaves para óxido de etileno. Não obstante, a exposição ocupacional a esse gás pode resultar em câncer, devido ao seu caráter mutagênico, além de anomalias do sistema reprodutor e doenças neurológicas [1-3]. Em virtude da alta toxicidade ambiental e da demanda de recursos humanos e materiais específicos, os setores hospitalares começaram a migrar para a terceirização desse processo de esterilização.

Por fim, o desenvolvimento da tecnologia de esterilização a plasma surge da necessidade da tríade rapidez, segurança e efetividade [1]. Na literatura, há diversas hipóteses para o mecanismo de ação do plasma, sendo as mais frequentes a emissão de radiação ultravioleta e a interação com os microrganismos por meio de radicais livres, como a hidroxila [8]. Atualmente, não há no mercado uma tecnologia que utilize exclusivamente o plasma como agente esterilizante, apesar de haver diversos estudos atestando a sua capacidade biocida.

### 1.3 – BREVE HISTÓRICO DA ESTERILIZAÇÃO POR PLASMA

O primeiro relato de plasma como agente esterilizante foi na patente de Menashi [9]. O equipamento utilizava um campo pulsado na faixa de radiofrequência (RF) para produzir um plasma de Argônio, visando a esterilizar o interior de um frasco. Menashi foi capaz de esterilizar frascos contendo  $10^6$  esporos em menos de um segundo. Ele também verificou a necessidade de o plasma entrar em contato com a superfície interior do frasco para esterilizá-la, e, por essa razão, pensava-se que a ação biocida do plasma era devido ao intenso e rápido aquecimento da superfície de vidro, procedimento posteriormente conhecido como microincineração [10].

Outras patentes de Ashman e Menashi [11], bem como de Boucher [12] e Bithell [13] mostraram que uma descarga elétrica em um gás apropriado pode esterilizar. Em todos esses casos, as amostras são inseridas em uma câmara na qual é feito vácuo e, na sequência, preenche-se a câmara com o gás desejado até uma pressão específica. Aplica-se, então, uma radiação de 13,56 MHz (frequência RF mundialmente autorizada para utilização industrial, científica e médica) por meio de uma bobina ou de placas paralelas para produzir o plasma. A esterilização é alcançada em poucos segundos.

A maioria dos experimentos pioneiros utilizavam gases inertes. No entanto, Ashman, Menashi e Boucher [11, 14] adicionaram halógenos (Cloro, Bromo e Iodo) e aldeídos aos gases precursores e verificaram aumento na eficácia do processo.

Na década de 80, Jacobs e Lin [15] utilizaram uma solução aquosa de Peróxido de Hidrogênio, um conhecido agente esterilizante, em processo de duas etapas: (1) a injeção de  $H_2O_2$  e o seu contato com os objetos a serem esterilizados; (2) aplicação de uma descarga RF, para garantir que nenhum resíduo tóxico permaneça sobre os itens esterilizados. Essa tecnologia foi posteriormente utilizada no primeiro equipamento de “esterilização a plasma” lançado comercialmente com o nome Sterrad<sup>®</sup>. Posteriormente, um sistema semelhante que opera com ácido peracético (outro conhecido agente esterilizante), denominado Plazlyte<sup>®</sup> também foi lançado no mercado.

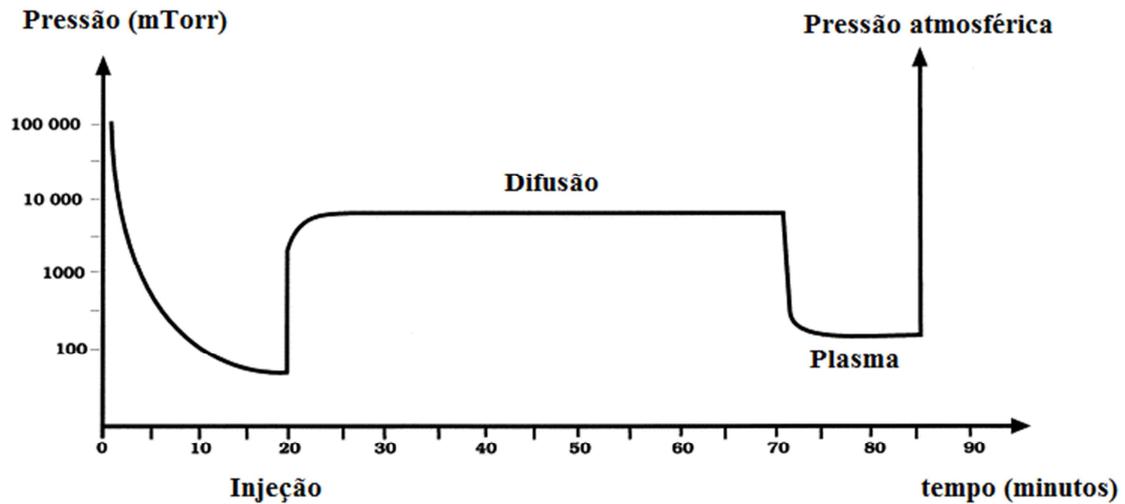


Figura 1.2 – Etapas do ciclo de esterilização no STERRAD<sup>®</sup>. Reproduzido de [16].

Vale ressaltar que nesses sistemas, comumente denominados esterilizadores por plasma, o plasma não tem ação biocida; ele serve principalmente como um agente desintoxicante, cuja função é a remoção de resíduos tóxicos e limitar o poder oxidativo dos elementos químicos altamente reativos que são injetados na câmara [16]. Basicamente, o procedimento de esterilização acontece nas seguintes etapas: (1) redução da pressão na câmara de esterilização; (2) após atingir uma pressão preestabelecida, injeta-se o vapor do agente esterilizante a concentrações que, sozinhas, produzem a esterilização. (3) Depois de tempo de contato suficiente para inativar os microrganismos, é feita nova redução da pressão e produz-se o plasma. Após repetições opcionais das etapas (1), (2) e (3), ventila-se a câmara com ar filtrado para que esta atinja a pressão atmosférica e permita a sua abertura. As curvas de contagem de células viáveis pós-processamento nesses sistemas possuem características totalmente diferentes de sistemas que utilizam o plasma como agente esterilizante [17].

Nas duas últimas décadas, além dos estudos de diversas fontes de plasma e gases precursores para se conseguir a esterilização por plasma, tem surgido novas aplicações na área

da saúde, como no controle de sangramentos sem afetar tecidos saudáveis, cicatrização de feridas e até no tratamento de alguns tipos de cânceres.

## 1.4 – OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivos:

- Objetivo geral:
  - Desenvolvimento de sistema de esterilização por plasma a pressão atmosférica.
  
- Objetivos específicos:
  - Montar e adaptar fonte de plasma para operação a pressão atmosférica.
  - Definir protocolo de exposição das amostras biológicas ao plasma.
  - Definir e validar metodologia de contagem de esporos viáveis e compatibilizá-la ao protocolo de exposição ao plasma.
  - Estudar a dinâmica de morte microbiana para a fonte montada.
  - Caracterizar os mecanismos de ação biocida do plasma.

# CAPÍTULO 2 – FÍSICA DE PLASMA E DESCARGA ELÉTRICA EM GASES

Toda a matéria do Universo conhecido é classificada quanto ao seu estado de agregação como sólida, líquida, gasosa ou plasma [1, 18, 19]. A distinção básica entre sólidos, líquidos e gases está na diferença das forças intermoleculares que mantêm suas partículas (átomos ou moléculas) constituintes juntas. Ao aquecer uma substância sólida ou líquida, os átomos e moléculas adquirem energia cinética até que essa supere uma determinada energia potencial de ligação. Esse fato está relacionado às transições de fase.

Em se tratando de um gás molecular, à medida que se fornece energia (calor, por exemplo), a energia cinética das moléculas aumenta e, por conseguinte, a intensidade das colisões. Havendo provisão de energia suficientemente grande, ocorrem colisões cujas transferências de energia serão suficientes para dissociar as moléculas em átomos. A temperaturas ainda mais elevadas, a crescente fração de átomos no gás pode adquirir energia cinética suficiente para, por meio de uma colisão, “arrancar” um elétron de outro átomo. Essa é uma das maneiras de se produzir o plasma. É importante ressaltar que essa transição gás-plasma não se enquadra no conceito de transição de fase da Termodinâmica, uma vez que aquela ocorre gradualmente à proporção que a temperatura aumenta [18, 19].

Graças aos avanços na Astrofísica e na Física Teórica, pode-se afirmar que a grande maioria do Universo que conhecemos, com algumas exceções, como a superfície de planetas frios como a Terra, existe no estado de plasma. O interior das estrelas, as nebulosas,

os relâmpagos, as Auroras, o fogo e as lâmpadas fluorescentes são apenas alguns exemplos de matéria no estado de plasma.

## 2.1 – DEFINIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO

Define-se plasma um gás macroscopicamente neutro (ou próximo da neutralidade), porém constituído por elétrons livres, átomos e moléculas ionizados, os quais apresentam comportamento coletivo devido à interação Coulombiana entre eles; todavia, para que um conjunto de partículas eletricamente carregadas seja considerado um plasma, três critérios fundamentais devem ser atendidos [18, 19]:

1º. O plasma deve ser capaz de blindar potenciais elétricos aplicados a ele – Os portadores de carga do plasma se arranjam em torno de fontes de potencial de tal maneira que limitem o efeito do potencial elétrico em cargas mais afastadas. Essa distância-limite de blindagem, característica de cada plasma, é chamada de *comprimento de Debye*, dado por:

$$\lambda_D = \left( \frac{\epsilon_o k_B T}{ne^2} \right)^{\frac{1}{2}}$$

Assim sendo, se o plasma tiver dimensão  $L$ , uma condição para que esse critério seja cumprido é:

$$\lambda_D \ll L$$

2º. Uma vez que a blindagem é resultado de um comportamento coletivo dentro da *esfera de Debye* (esfera de raio  $\lambda_D$  que limita a ação do potencial), também é necessário que o número de portadores dentro dessa esfera seja suficientemente grande. Estima-se a quantidade de portadores dentro da *esfera de Debye* por:

$$N_D = n \frac{4}{3} \pi \lambda_D^3$$

E o parâmetro fica descrito como

$$N_D \gg 1$$

3°. Uma outra importante propriedade do plasma é neutralidade macroscópica de sua carga espacial. Quando um plasma é instantaneamente perturbado, surgem campos elétricos internos que induzem o movimento das partículas para a restauração da neutralidade. Esses movimentos ocorrem com uma frequência característica, chamada *frequência de plasma*:

$$\omega_p = \left( \frac{ne^2}{m\epsilon_0} \right)^{\frac{1}{2}}$$

Colisões com partículas neutras tendem a amortecer essas oscilações coletivas e gradualmente diminuir suas amplitudes. Para que tais colisões não afetem significativamente o comportamento coletivo do plasma, é essencial que a frequência de colisões seja menor que a frequência de plasma, isto é:

$$\frac{\omega_p}{2\pi} = f_{plasma} > f_{colisões}$$

Caso contrário, os portadores não seriam capazes de se comportar independentemente; seriam “forçados” a estar em equilíbrio com as partículas neutras através das colisões, e o sistema poderia ser tratado como um gás neutro.

## 2.2 – O MOVIMENTO DE ELÉTRONS EM CAMPOS ELÉTRICOS OSCILANTES

Sabendo que tanto as equações da Eletrodinâmica quanto as equações de movimento dos elétrons são lineares em relação aos campos e à velocidade do elétron, pode-se aplicar o princípio da superposição nas suas soluções [20]. Qualquer campo periódico pode ser decomposto em componentes harmônicos e, como neste trabalho o campo elétrico utilizado é monocromático, será considerado apenas um campo elétrico senoidal.

Em se tratando de movimentos não relativísticos (caso desse estudo), a intensidade da força magnética da onda  $e\frac{u}{c}H$  é muito menor que a força elétrica  $eE$ . Além disso, a amplitude das oscilações eletrônicas no processo de descarga é pequena quando comparada ao comprimento de onda. Assume-se, portanto, que o elétron está em um campo elétrico do tipo  $\vec{E} = \vec{E}_0 \cdot \text{sen}(\omega t)$ ;  $\vec{E}_0 = \text{const.}$

### 2.2.1 – OSCILAÇÕES LIVRES

Assume-se inicialmente que o elétron se move sem colisões. Tal assunção também é válida para o caso de o elétron realizar várias oscilações entre as colisões  $\omega \gg \nu_c$ . Integrando a equação de movimento,

$$m \frac{d\vec{u}}{dt} = -e \cdot \vec{E}_0 \cdot \text{sen}(\omega t)$$

Chega-se a

$$\vec{u} = \frac{e \cdot \vec{E}_0}{m\omega} \cdot \cos(\omega t) + \vec{u}_0$$

$$\vec{r} = \frac{e \cdot \vec{E}_0}{m\omega^2} \cdot \sin(\omega t) + \vec{u}_0 \cdot t + \vec{r}_0$$

Nesse caso, o elétron oscila na frequência do campo. Essas oscilações estão superpostas a uma arbitrária velocidade de translação  $u_0$ . O deslocamento e a velocidade máximos da oscilação são, respectivamente:

$$a = \frac{e \cdot E_0}{m\omega^2} ; u = \frac{e \cdot E_0}{m\omega}$$

O deslocamento está em fase com o campo, enquanto a velocidade está defasada de  $\pi/2$ .

O caso limite das oscilações sem colisões é observado em frequências ópticas e a frequências de micro-ondas a baixas pressões ( $< 10$  Torr) [20, 21].

### 2.2.2 – O EFEITO DAS COLISÕES

As colisões afetam a fase, e, portanto, perturbando o curso harmônico das oscilações dos elétrons [20, 21]. Uma grande mudança na direção de movimento após um espalhamento faz com que o elétron não alcance o máximo do deslocamento  $a$  que a força pode produzir; o elétron reinicia o processo de oscilação após cada colisão, com uma nova fase e um novo ângulo em relação à direção instantânea da velocidade [18-21]. Para levar isso em conta, adiciona-se a taxa de perda de momento devido a colisões à equação de movimento do elétron “médio”. Assim como no caso dos campos constantes, tem-se a equação para a velocidade média:

$$m \frac{d\vec{u}}{dt} = -e \cdot \vec{E}_0 \cdot \text{sen}(\omega t) - m\vec{u} v_c$$

A solução dessa equação, válida após várias colisões é:

$$\vec{u} = \frac{e \cdot \vec{E}_0}{m \sqrt{\omega^2 + v_c^2}} \cdot \cos(\omega t + \varphi); \quad \varphi = \arctan\left(\frac{v_c}{\omega}\right)$$

$$\vec{r} = \frac{e \cdot \vec{E}_0}{m \omega \sqrt{\omega^2 + v_c^2}} \cdot \text{sen}(\omega t + \varphi)$$

As amplitudes do deslocamento e a velocidade do elétron são menores por um fator  $\sqrt{1 + \frac{v_c^2}{\omega^2}}$ , em relação ao caso das oscilações livres. Quanto maior a frequência efetiva de colisões  $v_c$ , menores elas são ( $v_c$  é determinada pela velocidade de movimento aleatório, que é muito maior que a velocidade de oscilação nas descargas). O deslocamento muda de fase em relação ao campo, a fase muda de 0 para  $\pi/2$  [20, 21].

O deslocamento da posição  $r$  e a velocidade  $u$  sempre podem ser resolvidos em termos de duas componentes, uma proporcional à magnitude do campo elétrico  $\vec{E} = \vec{E}_0 \cdot \text{sen}(\omega t)$  e a outra à sua taxa de variação  $\frac{d\vec{E}}{dt} = \omega \vec{E}_0 \cdot \cos(\omega t)$ .

$$\vec{r} = \frac{e \cdot \vec{E}_0}{m(\omega^2 + v_c^2)} \cdot \text{sen}(\omega t) + \frac{v_c}{\omega} \frac{e \cdot \vec{E}_0}{m(\omega^2 + v_c^2)} \cdot \cos(\omega t)$$

$$\vec{u} = \frac{\omega e \cdot \vec{E}_0}{m(\omega^2 + v_c^2)} \cdot \cos(\omega t) - \frac{v_c e \cdot \vec{E}_0}{m(\omega^2 + v_c^2)} \cdot \text{sen}(\omega t)$$

A razão das componentes é determinada pelo papel relativo das colisões e está diretamente relacionada à mudança de fase  $\varphi$ . As expressões acima mostram que o papel das colisões é caracterizado pela razão da frequência efetiva e a frequência circular do campo, que

é maior que a frequência  $f$  mais de uma ordem de magnitude. No limite  $\omega^2 \gg \nu_c^2$ , as relações acima são próximas daquelas obtidas para as oscilações livres [20, 21].

## 2.3 – DIFUSÃO EM PLASMAS

Grande parte dos fenômenos de plasma pode ser descrito com modelos simplificados nos quais o plasma é descrito como um fluido de partículas neutras e cargas elétricas com funções de distribuição de energia do tipo Maxwell-Boltzmann, e apenas as interações e movimentos do fluido são levados em consideração. O formalismo por trás dessa abordagem é chamado Teoria Magnetohidrodinâmica (MHD), e um dos fenômenos descritos na Teoria MHD é a difusão em plasmas [18, 19].

Entende-se a difusão como um fenômeno de transporte de matéria onde um soluto (sólido, líquido ou gasoso) é transportado devido aos movimentos das moléculas de um fluido, pelo movimento térmico de todas as partículas a temperaturas acima do zero absoluto [22]. Estes movimentos fazem com que, do ponto de vista macroscópico, o soluto passe das zonas mais elevada de concentração para zonas de baixa concentração.

Na descrição da difusão à luz da Teoria MHD, há três forças dominantes atuando nas partículas carregadas do plasma. Primeiramente, partículas carregadas reagem a campos eletromagnéticos por meio da Força de Lorentz, dada por:

$$\vec{F}_L = m \frac{d\vec{u}}{dt} = q(\vec{E} + \vec{u} \times \vec{B})$$

Em seguida, há a força decorrente do gradiente de pressão:

$$\vec{F}_p = -\frac{\vec{\nabla} p}{n} = -\frac{\vec{\nabla}(nk_B T)}{n}$$

Onde a pressão é dada pela Equação geral dos gases  $p = nk_B T$ . A pressão também pode ser escrita como um tensor, haja vista que pode ser anisotrópica. Para plasmas isotérmicos, a força decorrente do gradiente de pressão pode ser escrita como:

$$\vec{F}_p = -k_B T \frac{\vec{\nabla} n}{n}$$

E, finalmente, há o termo relacionado às colisões entre as partículas (carregadas e neutras) que constituem o plasma:

$$\vec{F}_c = -m \sum_{a,b} \nu_{ab} (\vec{u}_a - \vec{u}_b)$$

Onde  $\nu_{ab}$  é a frequência de colisão entre as espécies  $a$  e  $b$ .

Utilizando essas três forças, a equação de momento de fluido para cada espécie é:

$$mn \frac{d\vec{u}}{dt} = qn(\vec{E} + \vec{u} \times \vec{B}) - \vec{\nabla} p - mn \nu(\vec{u} - \vec{u}_0) \quad \text{Eq. 1}$$

Onde o termo de colisão deve ser somado para todas as colisões. Assumindo que o plasma isotérmico esteja em um estado estacionário, que a velocidade das partículas de interesse é muito maior que as velocidades das partículas lentas ( $u \gg u_0$ ) e que haja apenas campos elétricos atuando nas partículas, a Equação 1 fica:

$$qn\vec{E} - \vec{\nabla} p - mn \nu \vec{u} = 0 \quad \text{Eq. 2}$$

Como o plasma é isotérmico, de forma que  $\vec{\nabla} p = k_B T \vec{\nabla} n$ , e resolvendo para  $\vec{u}$ , tem-se que:

$$\vec{u} = \frac{q\vec{E}}{m\nu} - \frac{k_B T}{m\nu} \frac{\vec{\nabla} n}{n} \quad \text{Eq. 3}$$

Essa equação pode ser reescrita como:

$$\vec{\Gamma} = \pm \mu n \vec{E} - D \vec{\nabla} n \quad \text{Eq. 4}$$

Onde  $\vec{\Gamma} = n \vec{u}$  é o fluxo de partículas, e:

$$\mu = \frac{|q|}{m\nu} \quad \text{Eq. 5}$$

$$D = \frac{k_B T}{m\nu} \quad \text{Eq. 6}$$

São, respectivamente, as constantes macroscópicas de mobilidade e de difusão. Essas constantes são calculadas separadamente para cada espécie. Usando a definição da velocidade térmica média  $\bar{u} = \left( \frac{8k_B T}{\pi m} \right)^{\frac{1}{2}}$  [22] e o livre caminho médio (para o espalhamento tipo esfera

rígida)  $\beta = \frac{\bar{u}}{\nu}$  [23], podemos escrever  $D$  como [18, 19]:

$$D = \frac{\pi}{8} \beta^2 \nu \quad \text{Eq. 7}$$

É importante notar que  $D$  tem a forma  $\frac{(\Delta x)^2}{\tau}$ , onde  $\Delta x$  é o comprimento do passo e  $\tau$  é o tempo entre passos no caminho aleatório. Essa é a estrutura básica do processo de difusão [18, 19, 22].

### 2.3.1 - DIFUSÃO LIVRE

Da Eq. 4, na ausência de campo elétrico, pode-se obter uma lei da difusão, que relaciona o fluxo de partículas  $\vec{\Gamma} = n \vec{u}$  ao gradiente de densidade:

$$\vec{\Gamma} = -D \vec{\nabla} n$$

Essa relação é chamada Lei de Fick. Lembrando que a equação da continuidade é dada por:

$$\frac{\partial n}{\partial t} + \vec{\nabla} \cdot (n \vec{u}) = G - P$$

Onde  $G$  representa os processos que “produzem” partículas carregadas (ionizações, por exemplo) e  $P$  representa os processos de “destroem” as partículas carregadas (recombinações, por exemplo). Assim, considerando que tanto os termos de “fontes” quanto de “sumidouros” de partículas são zero, tem-se que [18, 19]:

$$\frac{\partial n}{\partial t} + \vec{\nabla} \cdot \vec{\Gamma} = 0$$

Com  $D$  independente da posição, chega-se à equação da difusão livre para uma espécie:

$$\frac{\partial n}{\partial t} - D\nabla^2 n = 0$$

### 2.3.2 – DIFUSÃO AMBIPOLAR

Retomando a relação (Eq. 4), considera-se que ela funciona separadamente para elétrons e para íons. Além disso, faz-se a presunção de congruência de que o fluxo de elétrons e de íons de uma determinada região é igual,  $\Gamma_e = \Gamma_i$  de forma que não se tenha cargas espaciais locais. Essa presunção continua valendo nos casos de colisões que produzem ionização, haja vista que nesses casos serão produzidas quantidades iguais de cada espécie.

Considerando que os elétrons têm massa menor, e que por essa razão eles tendem a fluir mais rapidamente (em um plasma não magnetizado), o campo elétrico externo deve surgir para manter o equilíbrio no fluxo de partículas local [18, 19]. Em outras palavras, um número maior de elétrons deixa a região de plasma inicialmente, produzindo um desequilíbrio na carga espacial e, conseqüentemente, um campo elétrico. A Figura 2.1 representa o fenômeno.

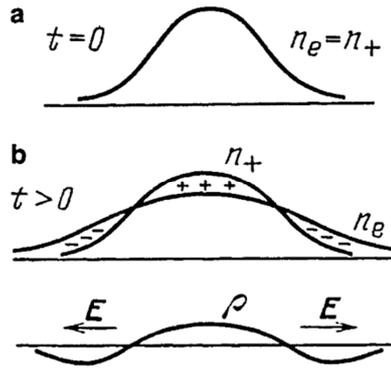


Figura 2.1 – Representação da polarização do plasma na presença de gradientes de densidade de elétrons e íons. Em (a), as distribuições iniciais  $n_e = n_i$ . Em (b), as distribuições  $n_e$ ,  $n_i$  e a densidade de carga espacial  $\rho = e(n_i - n_e)$ , algum tempo depois. As setas indicam a direção do campo de polarização. Reproduzida de [20].

Utilizado a Eq. 4 para ambas as espécies, com  $\Gamma_e = \Gamma_i = \Gamma$ , e  $n_e = n_i = n$ , tem-se que:

$$\mu_i n \vec{E} - D_i \vec{\nabla} n = \pm \mu_e n \vec{E} - D_e \vec{\nabla} n \quad \text{Eq. 8}$$

Resolvendo para  $\vec{E}$  em termos de  $\vec{\nabla} n$  :

$$\vec{E} = \frac{D_i - D_e}{\mu_i + \mu_e} \frac{\vec{\nabla} n}{n} \quad \text{Eq. 9}$$

Substituindo a Eq. 9 na relação de fluxo comum, chega-se a (na equação para os íons):

$$\bar{\Gamma} = \mu_i \frac{D_i - D_e}{\mu_i + \mu_e} \vec{\nabla} n - D_i \vec{\nabla} n = - \frac{\mu_i D_e + \mu_e D_i}{\mu_i + \mu_e} \vec{\nabla} n \quad \text{Eq. 10}$$

Nota-se que essa equação é simétrica em relação aos coeficientes e, obviamente, vale para elétrons e íons. Introduzindo o coeficiente de difusão ambipolar:

$$D_A = - \frac{\mu_i D_e + \mu_e D_i}{\mu_i + \mu_e} \quad \text{Eq. 11}$$

Vê-se que a Eq. 10 tem a mesma forma da Lei de Fick,  $\vec{\Gamma} = -D_A \vec{\nabla} n$  [18, 19]. Substituindo Eq. 10 na equação da continuidade, e assumindo que todos os coeficientes são independentes da posição, tem-se que:

$$\frac{\partial n}{\partial t} - D_A \nabla^2 n = 0 \quad \text{Eq. 12}$$

A Eq. 12 é chamada equação de difusão ambipolar.

O coeficiente de difusão ambipolar pode ser simplificado ao se notar que, em descargas fracamente ionizadas,  $\mu_e \gg \mu_i$ . Fazendo essa consideração, a Eq. 11 fica:

$$D_A \approx D_i + \frac{\mu_i}{\mu_e} D_e \quad \text{Eq. 13}$$

E utilizado a relação de Einstein:

$$D_\alpha = \frac{\mu_\alpha k_B T_\alpha}{q_\alpha}; \alpha = i, e$$

Chega-se a:

$$D_A \approx D_i \left( 1 + \frac{T_e}{T_i} \right) \quad \text{Eq. 14}$$

Da Eq. 14, nota-se que a difusão ambipolar fica amarrada às espécies mais lentas, nesse caso os íons, mas ela aumenta segundo um termo proporcional à razão das temperaturas. Logo, no caso dos plasmas fracamente ionizados, nos quais  $T_e \gg T_i$ , os íons e os elétrons se difundem a razões muito maiores que a taxa de difusão para íons livres.

Vale ressaltar que no regime onde  $\mu_e \gg \mu_i$  e  $T_e \gg T_i$ , o termo de gradiente de pressão da Eq. 4 é pequeno, se comparado ao fluxo e termos de campo para os íons, de forma que:

$$\vec{\Gamma}_i = \vec{\Gamma} \approx \mu_i n \vec{E} \quad \text{Eq. 15}$$

Por outro lado, para os elétrons o termo de fluxo é pequeno, se comparado aos termos do campo e do gradiente de pressão, de forma que:

$$\vec{\Gamma}_e = \vec{\Gamma} = -\mu_e n \vec{E} - D_e \vec{\nabla} n \approx 0 \quad \text{Eq. 16}$$

Portanto, o movimento dos íons é dominado pela mobilidade e o movimento dos elétrons é determinado pelo equilíbrio de Boltzmann.

Finalmente, para que o fluxo de elétrons não exceda o fluxo de íons, apesar das desigualdades  $D_e \gg D_i$  e  $\mu_e \gg \mu_i$ , os termos de difusão e deriva (de sinais opostos) devem se compensar dentro da região do fluxo relativamente pequeno dos íons [20, 21]. Assim, o campo de polarização que aparece automaticamente na difusão ambipolar é dado por:

$$|\vec{E}| = -\frac{D_e}{\mu_e} \left| \frac{\vec{\nabla} n}{n} \right| = -\frac{k_B T_e}{e} \left| \frac{\vec{\nabla} n}{n} \right| \approx \frac{k_B T_e}{eR}$$

Onde  $R$  é o comprimento que caracteriza a escala do gradiente de densidade de carga. Esta é a distância ao longo da qual a densidade de elétrons varia consideravelmente [20, 21]. O campo de polarização é o resultado da separação de carga; por sua vez, a separação é causada pelo movimento (térmico) aleatório do componente mais rápido (elétrons), e resulta da energia térmica deles.

De fato, onde o campo de polarização existir, a sua diferença de potencial ao longo de  $R$  é tal que a energia elétrica adquirida pela a carga é da ordem da energia térmica dos elétrons. O campo de polarização é gerado pela carga espacial. A partir da Lei de Gauss e da equação acima, chega-se a:

$$\frac{\delta n}{n} \approx \frac{k_B T_e}{4\pi e^2 n} \frac{1}{R^2} = \left( \frac{\lambda_D}{R} \right)^2$$

A quantidade  $\lambda_D$  é o comprimento de Debye do plasma. Ele dá a distância de separação caracterizando forte carga e polarização plasma. Se  $R \gg \lambda_D$ , isto é, se grandes diferenças de densidade aparecerem ao longo de distâncias maiores do que o comprimento de Debye, então  $\frac{\delta n}{n} \ll 1$ , desvios da neutralidade de carga são pequenos, e a difusão é ambipolar. Se  $R \leq \lambda_D$ , elétrons e íons difundem-se independentemente. Vale ressaltar também que a condição  $\left( \frac{\lambda_D}{R} \right)^2 \ll 1$  resulta no critério quantitativo que distingue o plasma enquanto um meio ionizado, mas eletricamente neutro, de outros casos de presença de cargas elétricas em gases [18-21].

## 2.4 – PRODUÇÃO DO PLASMA

Basicamente, o plasma é produzido pelos seguintes processos [18, 19]: **Aumento de temperatura**, conforme descrito no início do Capítulo; **Fotoionização**, na qual os átomos do gás neutro absorvem fótons com energia igual ou maior que a energia de ionização desses átomos. A energia excedente é convertida em energia cinética para o par elétron-íon formado. **Descarga elétrica**, onde um campo externo aplicado a um gás acelera elétrons livres a energias suficientemente elevadas para ionizar outros átomos por colisões. É esta última a principal responsável pela produção do plasma no sistema estudado neste trabalho.

## 2.4.1 – PRODUÇÃO DE PLASMAS A PRESSÃO ATMOSFÉRICA

Devido, por exemplo, à radiação de fundo, há pares elétron-íon presentes mesmo no ar a temperatura e pressão ambientes. A taxa de ionização também é afetada por substâncias radioativas tanto no solo quanto no ar, mas há somente cerca de  $10^7$  pares de elétrons-íon  $\text{m}^{-3} \text{s}^{-1}$  [24]. Diversos tipos de energia podem ser utilizado para a ionização: elétrica, térmica, óptica (radiação UV, por exemplo), radioativa (por exemplo, radiação gama), raios-X, etc. No entanto, as ferramentas de ionização mais úteis são os campos eletromagnéticos.

As propriedades dos plasmas, tais como a densidade de partículas carregadas e suas energias, geralmente dependem do tipo de alimentação do sistema (por exemplo, AC, DC, alta frequência, pulsada,...), do tipo de gás, da densidade etc. As partículas do par elétron-íon têm carga de mesmo módulo, mas massas diferentes. Como a massa do elétron é cerca de  $10^4$  vezes menor que a massa do íon, os elétrons respondem mais rapidamente a um campo eletromagnético incidente que os íons .

Em plasmas gerados a baixas pressões, a frequência de colisão é baixa, a energia cinética dos elétrons é consideravelmente maior que a dos íons e das partículas neutras, o que caracteriza um plasma fora do equilíbrio. Por outro lado, altas pressões e frequências de colisão correspondentemente elevadas levam à formação de plasmas em equilíbrio térmico (também chamados plasmas “quentes”). À pressão atmosférica e a pressões maiores, a maneira mais viável para a criação de plasmas fora do equilíbrio é por meio da injeção “seletiva” de energia nos elétrons. Métodos e sistemas para este fim são descritos mais adiante.

## 2.4.2 – A CURVA DE PASCHEN

As condições para a ruptura dielétrica de um gás a diferentes pressões foram estudadas inicialmente por Friedrich Paschen [25]. O resultado é a conhecida curva de Paschen, que descreve a tensão de ruptura como função da distância entre os eletrodos ( $d$ ) e a pressão do gás ( $p$ ).

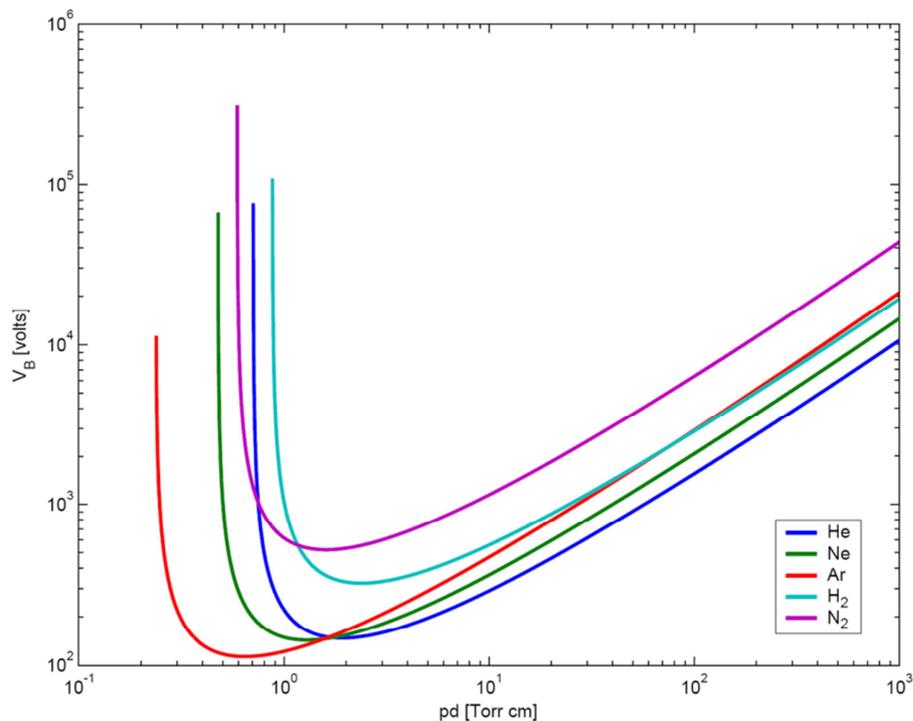


Figura 2.2 – Curvas de Paschen para alguns gases. Reproduzida de [21].

Para todos os gases, a curva de Paschen tem uma forma côncava para cima, indicando que há sempre um valor ideal do produto  $p.d$  em que a tensão de ruptura tem um mínimo. Em ambos os lados do mínimo, o tensão de ruptura aumenta. A baixa pressão, a densidade de partículas do gás disponíveis para ionização é baixa. A altas pressões, a frequência de colisão é alta e os elétrons não adquirem energia suficiente para ionizar o gás ao longo do diminuto caminho entre colisões. A equação para a tensão de ruptura é baseada em

ajuste de dados experimentais. De acordo com [26], a equação de Paschen pode ser escrita como:

$$V = \frac{B.p.d}{\ln \left( \frac{A}{\ln \left( 1 + \frac{1}{\eta} \right)} \right) + \ln(p.d)}$$

Onde  $A$  e  $B$  são constantes dependentes do tipo de gás e  $\eta$  é o coeficiente de emissão secundária de elétrons. Vale lembrar que a tensão de ruptura de uma mistura de gases pode ser diminuída graças ao efeito Penning, um processo de ionização resultante de colisões entre partículas metaestáveis excitadas e partículas neutras cujo potencial de ionização seja inferior ao potencial de excitação das partículas metaestáveis [27, 28].

### 2.4.3 - PRODUÇÃO DE PLASMA POR UM CAMPO ELETROMAGNÉTICO

Em sistemas de tensão contínua, a ruptura do gás geralmente começa como uma descarga transitória sob a forma de uma avalanche ou um centelhamento e com potências mais altas facilmente se transforma em um arco de alta corrente.

Gases também podem ser ionizados por campos eletromagnéticos oscilantes tendo amplitudes do campo elétrico suficientemente elevadas para a ruptura. Devido às diferentes mobilidades de elétrons e íons, os campos AC permitem a injeção seletiva de energia aos elétrons, viabilizando um plasma frio fora do equilíbrio a pressões elevadas. A energia eletromagnética (por exemplo, micro-ondas) pode ser irradiada para o plasma sem a necessidade de eletrodos. Alternativamente, o(s) eletrodo(s) em descargas AC pode(m) ser

coberto(s) por material dielétrico, impedindo a formação de corrente ôhmica, e permitindo apenas a corrente de deslocamento. Este é o princípio das descargas de barreira dielétrica (DBD), descritas mais adiante.

Nos gases a alta pressão, os elétrons perfazem muitas colisões por oscilação, fazendo com que o movimento dos elétrons e a perda deles sejam principalmente regulados por fenômenos como a difusão. Nessas condições, não só a magnitude do campo elétrico é importante, mas também a fase do movimento dos elétrons em relação ao campo elétrico oscilante [29, 30]. Além disso, estudos mostraram que a tensão de ruptura aumenta significativamente quando, por exemplo, Ar, O<sub>2</sub> ou N<sub>2</sub>, é adicionado ao He, apesar do menor potencial de ionização desses aditivos. Como esses gases têm mais graus de liberdade (vibracionais e rotacionais), além da possibilidade de absorverem energia na dissociação molecular, surgem novos canais para a perda de energia dos elétrons[31].

## 2.5 – DESCARGAS ELÉTRICAS EM GASES

O termo “descarga elétrica” surgiu com o processo de descarga de um capacitor em um circuito com um espaço entre eletrodos [32]. Se a voltagem é suficientemente alta, ocorre a ruptura dielétrica do gás e um estado ionizado é formado. O circuito é então fechado e o capacitor descarrega. Mais tarde, o termo “descarga” foi aplicado para qualquer passagem de corrente elétrica por um gás ionizado, e a qualquer processo de ionização do gás pela aplicação de campos eletromagnéticos [32]. Entre os vários tipos de descarga elétrica, há a avalanche, a *streamer*, a descarga luminescente, a corona, as descargas de barreira dielétrica, o centelhamento e os arcos.

## 2.5.1 – A AVALANCHE

A avalanche de elétrons é o primeiro elemento de qualquer mecanismo de ruptura [20, 21, 32]. Nela, os elétrons são acelerados por um intenso campo elétrico externo. A certa energia cinética, esses elétrons podem ionizar átomos ou moléculas do gás precursor e criar mais elétrons. O número de ionizações produzidas por unidade de comprimento por elétron é chamado de coeficiente Townsend de ionização por impacto  $\alpha_i$  [32]:

$$\alpha_i(\vec{E}) = \alpha \left( \frac{|\vec{E}|}{\xi_0} \right) = \sigma_i \cdot n_0$$

Onde  $|\vec{E}|$  é a intensidade do campo elétrico,  $\sigma_i$  é a seção de choque de ionização por impacto eletrônico,  $n_0$  a densidade do gás de fundo e  $\xi_0$  é um parâmetro para a seção de choque efetiva para determinada densidade do gás. Uma forma especial desta equação para as descargas estáticas em campos homogêneos foi proposta inicialmente por Townsend [20, 21, 32]:

$$\alpha_i(\vec{E}) = \alpha_0 \cdot e^{\left( -\frac{\xi_0}{|\vec{E}|} \right)}$$

Onde  $\alpha_0$  é outro parâmetro relacionado com a seção de choque efetiva para determinada densidade do gás. O comprimento de ionização  $\frac{1}{\alpha_i}$  determina um comprimento intrínseco para o plasma. Este comprimento é a distância média que um elétron deriva nos campo antes de criar um par elétron-íon por impacto. Por conseguinte, em gases cujas distâncias intermoleculares são menores do que este comprimento, nenhuma descarga elétrica pode ocorrer. Tanto o livre caminho médio quanto o comprimento de ionização são inversamente

proporcionais à densidade do gás [20, 21, 32]. A Figura 2.3 representa dois momentos distintos da evolução de uma avalanche.

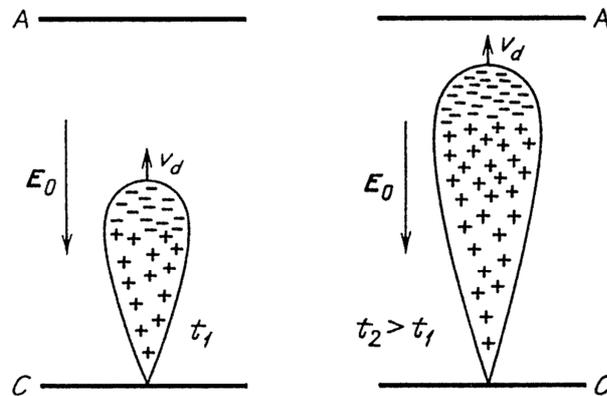


Figura 2.3 – Formato e distribuição de cargas em uma avalanche de elétrons em dois momentos distintos.  $E_0$  é o campo elétrico externo e  $u_d$  a velocidade de propagação da cabeça da avalanche. A avalanche de elétrons é a etapa inicial de qualquer processo de ruptura elétrica de um meio; portanto, está presente na formação de vários tipos de descarga, como arco e descarga de barreira dielétrica. Imagem reproduzida de [20].

### 2.5.2 - A *STREAMER*

A *streamer* é um estreito canal condutor, de um plasma fracamente ionizado, que cresce entre os eletrodos de uma descarga quando a densidade de partículas é alta e o campo elétrico suficientemente forte [20, 32]. Caso adquira condutividade suficiente, a *streamer* é capaz de modificar as características do campo elétrico nas proximidades dos eletrodos de forma a produzir grandes corrente e fração de ionização. Em casos extremos, ela evolui para uma descarga do tipo centelhamento ou arco [20, 32].

Para que uma avalanche se transforme em uma *streamer*, ela deve ser significativamente amplificada [32]. O campo produzido pela carga espacial deve ter intensidade equivalente à do campo externo aplicado. Se não for assim, essa perturbação no campo externo não altera a evolução normal da avalanche. As *streamers* são observadas na natureza principalmente em fenômenos da alta atmosfera, como a formação de *sprites* (descargas entre nuvens carregadas) [32]. A Figura 2.4 traz uma representação esquemática de uma *streamer*, a Figura 2.5 traz uma foto de uma *sprite*, e a Figura 2.6 traz uma representação da transição de uma avalanche para uma *streamer*.

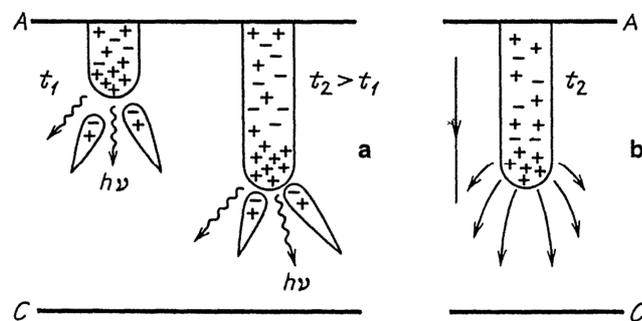


Figura 2.4 – A *streamer* Os fótons representados na figura produzem fotoionizações nas moléculas próximas, alimentando continuamente novas avalanches. Imagem reproduzida de [20].



Figura 2.5 – Uma *sprite* ocorrida na França, em 2009.

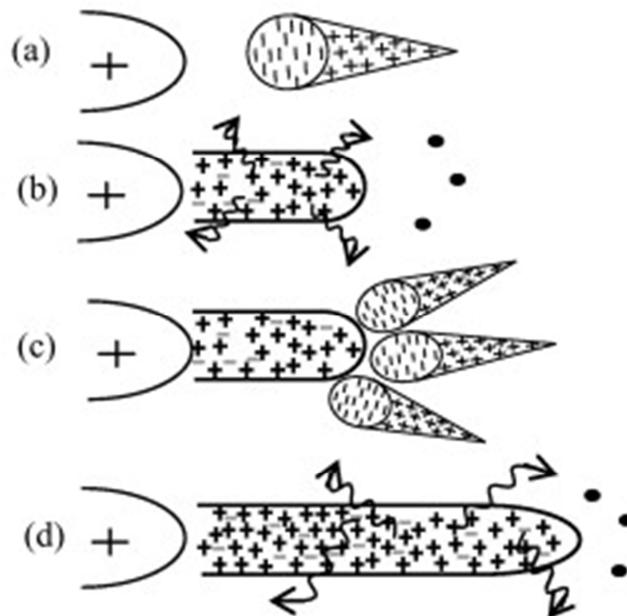


Figura 2.6 – Representação da transição avalanche-*streamer*. Em (a), há a propagação da avalanche em direção ao eletrodo. Em (b), há a formação da *streamer*. Em (c), há a formação de avalanches eletrônicas secundárias, decorrentes de fotoionizações provocadas pela *streamer*. Em (d), a propagação da *streamer*. Reproduzida de [33].

### 2.5.3 – A DESCARGA LUMINESCENTE

A descarga luminescente (também conhecida como descarga *glow*) é uma descarga a baixa pressão, de catodo frio, onde a maior parte dos elétrons provém de emissão secundária, devida a um bombardeamento do eletrodo por íons positivos [20, 21]. Distingue-se por ter uma grande região de carga espacial positiva, próxima ao catodo, com forte campo elétrico e quedas de tensão entre 100 e 400 V na bainha que se forma em torno dele. A coluna positiva de uma descarga luminescente de corrente contínua (CC) é um dos exemplos mais difundidos de um plasma fracamente ionizado fora do equilíbrio mantido por um campo

elétrico. A região envoltória do catodo é vital para a formação da descarga; já a coluna positiva não é essencial [20, 21].

A descarga luminescente é um dos mais bem estudados tipos de descarga e é também a que tem maior número de aplicações tecnológicas (de lâmpadas de neon a televisores a plasma) [32]. Tubos de descarga luminescente convencionais costumam ter em torno de 1 cm de raio por 10 cm a 1 metro de comprimento, trabalhando entre  $10^{-2}$  e  $10^2$  Torr com voltagens entre  $10^2$  e  $10^3$  Volts e correntes de  $10^{-4}$  a  $10^{-1}$  A.

Essa descarga possui regiões com propriedades físicas distintas. As regiões luminosas são devidas à ionização e recombinação de elétrons e íons no gás, podem ter cores diferentes que variam de acordo com a constituição dos gases e a pressão no interior do tubo. Estas cores estão relacionadas às linhas do espectro de emissão dos gases. Há ainda a presença de regiões escuras entre regiões luminosas (Figura 2.8). Nas regiões escuras, os elétrons estão sendo acelerados, mas só atingiram as energias de ionização nas próprias regiões luminosas. Isto porque perderam boa parte desta energia nas colisões dentro da região luminosa imediatamente anterior, desconsiderando as proximidades dos eletrodos. Como não há ionização nesta região, também não há recombinação e, portanto, não há emissão de luz.

Nesse tipo de descarga, caso se eleve a pressão, a coluna positiva se comprimirá em torno do eixo da descarga; caso contrário, ela se expandirá até próximo às paredes [20, 21]. Aproximando os dois eletrodos, a coluna positiva vai diminuindo à medida que a distância diminui até desaparecer por completo, só então é que a região de luminescência negativa começará a diminuir. Caso esta distância diminua demais a descarga se desfaz por

obstrução. Na Figura 2.7, podemos observar algumas características gerais da descarga luminescente.

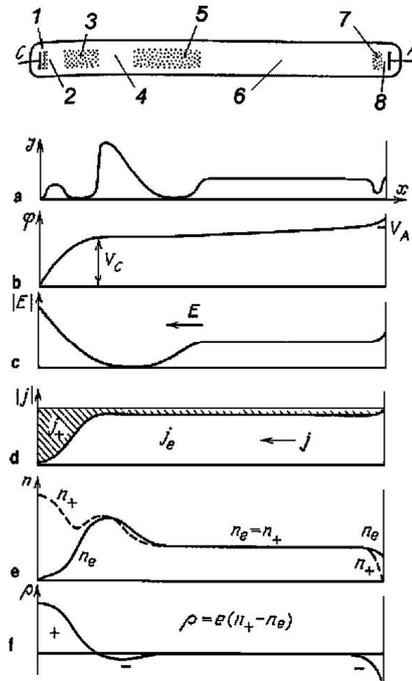


Figura 2.7– Regiões da descarga luminescente: (1) Escura de Aston, (2) luminescente (envoltória) do catodo, (3) escura do catodo, (4) luminescência negativa, (5) escura de Faraday, (6) coluna positiva, (7) escura do anodo, (8) luminescente do anodo. Características de uma descarga luminescente em um tubo: (a) intensidade luminosa com regiões escuras e luminosas, devido aos processos de ionização e recombinação no gás; (b) potencial  $\phi$ ; (c) Campo elétrico longitudinal, (d) Densidades eletrônica e iônica de corrente  $j_e$  e  $j_+$ , Densidade de cargas  $n_e$  e  $n_+$ , e (f) densidade espacial de cargas  $\rho$ , característicos de plasmas fracamente ionizados. Reproduzida de [20].



Figura 2.8 – Imagem de uma descarga luminescente.

#### 2.5.4 – A DESCARGA CORONA

A descarga corona é uma descarga de baixa potência, que necessita campos elétricos altamente não uniformes e intensos para se manifestar [20, 21]. A corona ocorre apenas em um dos eletrodos e possui características que dependem de sua polaridade. Se a descarga ocorre no catodo, é dita corona negativa, se ocorre no anodo é positiva.

No caso de uma descarga em gases, a magnitude da carga espacial também é limitada, já que o plasma emite íons de apenas uma polaridade, que se acumulam no espaço entre os eletrodos. Enquanto a corrente na descarga for aumentada, novos portadores de carga serão produzidos e poder-se-á obter uma descarga do tipo centelhamento a partir de certo ponto; no entanto a transição corona/centelha não é bem definida.

A corona é mantida pelas energias eletrônicas ganhas do campo elétrico próximo ao eletrodo, ao longo do livre caminho médio no gás ( $\sim 10^{-7}$  m, a pressão atmosférica). As geometrias básicas para este tipo de descarga são: ponta-plano, fio-plano, fio-fio, cilindros concêntricos e esferas concêntricas [20, 21].

Descargas corona são uma grande fonte de perdas de energia em linhas de transmissão de alta potência, mas são também a base de funcionamento de dispositivos como contadores de partículas Geiger-Müller, filtros e separadores elétricos e sistemas de eliminação de poluentes. Na natureza, uma das descargas corona mais conhecidas é o chamado fogo de St. Elmo. As Figuras 2.9 e 2.10 trazem exemplos de descargas corona.



Figura 2.9 – Imagem da formação de descarga do tipo corona em linha de transmissão.

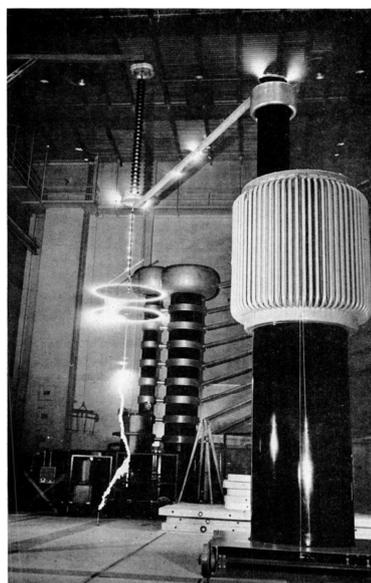


Figura 2.10 – Grandes descargas corona (em branco) em torno de condutores energizados por um transformador de 1,05 MV em um laboratório do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologias dos EUA em 1941.

Descargas corona podem ser separadas em duas categorias diferentes: coronas contínua e pulsada [33]. A descarga corona contínua ocorre com tensões DC ou tensões AC de baixa frequência. Nessa descarga, há uma contínua formação de *streamers*. No entanto, se o circuito elétrico tiver capacidade para suportar correntes elevadas, as *streamers* podem se transformar em descargas luminescentes estacionárias ou arco. Portanto, descargas corona contínuas podem ocorrer apenas se a corrente for limitada. Um exemplo é a descarga corona que se forma em torno de linhas de transmissão de alta tensão, em que a grande distância do solo limita a corrente [20, 21, 33].

A descarga corona pulsada é produzida através da aplicação de um pulso de tensão de curta duração a um eletrodo. Uma vantagem dessa descarga é que a curta duração do pulso assegura que nenhuma transição para centelhamento ou arco ocorra e, portanto, ela pode ser usada em tensões e correntes mais altas do que uma corona contínua [33]. A energia é quase toda depositada em elétrons que originam transições químicas, reduzindo significativamente efeitos indesejados, como o aquecimento. Além disso, as energias de elétrons podem ser muito altas, o que pode ser benéfico para as transições. Estes efeitos são muito úteis em aplicações tais como no controle de poluentes. Outra característica importante dessa descarga é a densidade de energia muito mais elevada que as possíveis para as coronas contínuas. Finalmente, a corona pulsada pode ser desencadeada com grande precisão de tempo, o que faz com que seja possível estudar a descarga com câmeras rápidas [33].

### 2.5.5 – A DESCARGA DE BARREIRA DIELETRICA

A descarga de barreira dielétrica (DBD) destaca-se como uma das principais fontes de plasma não-térmico a pressão atmosférica [20, 21, 34, 35]. Também conhecida

como “descarga silenciosa”, a DBD é estudada desde o século XIX, e foi originalmente desenvolvida para produção industrial de ozônio [35]. No entanto, investigações detalhadas sobre as propriedades desta descarga, aliadas à sua flexibilidade no que diz respeito à configuração geométrica, parâmetros de funcionamento e de meio para operação, levaram a uma série de novas aplicações: a geração de radiação infravermelha altamente coerente em lasers de CO<sub>2</sub>, as lâmpadas UV e lasers excimer, além de equipamentos para controle de poluentes e tratamento de superfícies. Condições de funcionamento obtidas em experimentos de laboratório podem ser facilmente expandidas para grandes instalações industriais.

Em sua configuração mais simples, a DBD acontece entre dois eletrodos separados por uma ou mais camadas de material dielétrico e um gás precursor. A descarga com uma ou duas camadas dielétricas guarda muitas semelhanças com as descargas produzidas entre dois eletrodos metálicos; todavia, uma diferença fundamental é que as DBD não operam com tensões contínuas, pois o acoplamento capacitivo do dielétrico necessita de um campo elétrico alternado para produzir uma corrente de deslocamento [20, 21, 34, 35]. Apesar de as DBD poderem ser produzidas com tensões AC que vão de frequência de linhas de transmissão a micro-ondas, a faixa de funcionamento típica para a maioria das aplicações técnicas das DBD está entre 500 Hz e 500 kHz. As configurações de descarga mais comuns são as de placas paralelas e as de eletrodos cilíndricos e coaxiais. A Figura 2.11 traz algumas configurações possíveis para a DBD.

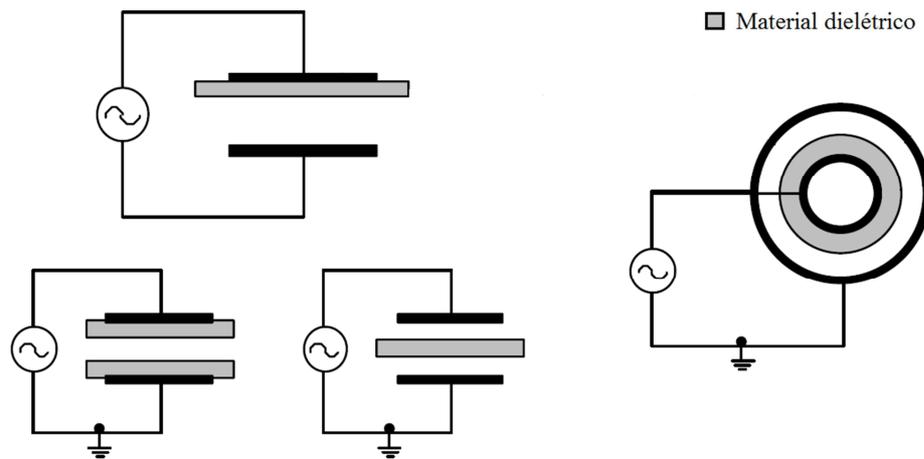


Figura 2.11 – Exemplos de configurações da descarga de barreira dielétrica. Adaptada de [36].

As primeiras fases da produção da DBD são muito semelhantes às das descargas produzidas sem materiais dielétricos, a saber: avalanche de elétrons, formação da streamer, sua propagação entre os eletrodos e seu decaimento [20, 21, 35]. A presença do dielétrico assegura que a corrente será limitada, de forma que a DBD não se transforme em uma descarga do tipo arco ou centelhamento, e que o plasma permanecerá “frio”.

A tensão de ruptura do gás entre materiais dielétricos não varia muito, se comparada à tensão de ruptura entre eletrodos metálicos. As distâncias típicas entre os eletrodos vão de micrômetros a vários centímetros. Para as DBD atmosféricas, distâncias típicas de poucos milímetros requerem tensões da ordem de dezenas de kV. Materiais dielétricos como o vidro, placas de quartzo ou de cerâmica são bastante comuns. Além desses, há relatos da utilização de eletrodos metálicos com revestimentos dielétricos, como tubos de aço revestidos com camadas de esmalte.

A DBD pode ser produzida em amplos intervalos de temperatura e de pressão. À pressão atmosférica, a ruptura dielétrica do gás ocorre por meio de várias microdescargas filamentosas independentes. Essas microdescargas de curtíssima duração têm propriedades semelhantes às de descargas luminescentes de alta pressão, e energias eletrônicas suficientemente elevadas para ionizar e dissociar os átomos e moléculas do gás precursor. A Figura 2.12 mostra fotografias dessas microdescargas em uma descarga no ar cujos eletrodos transparentes distavam 1 mm.

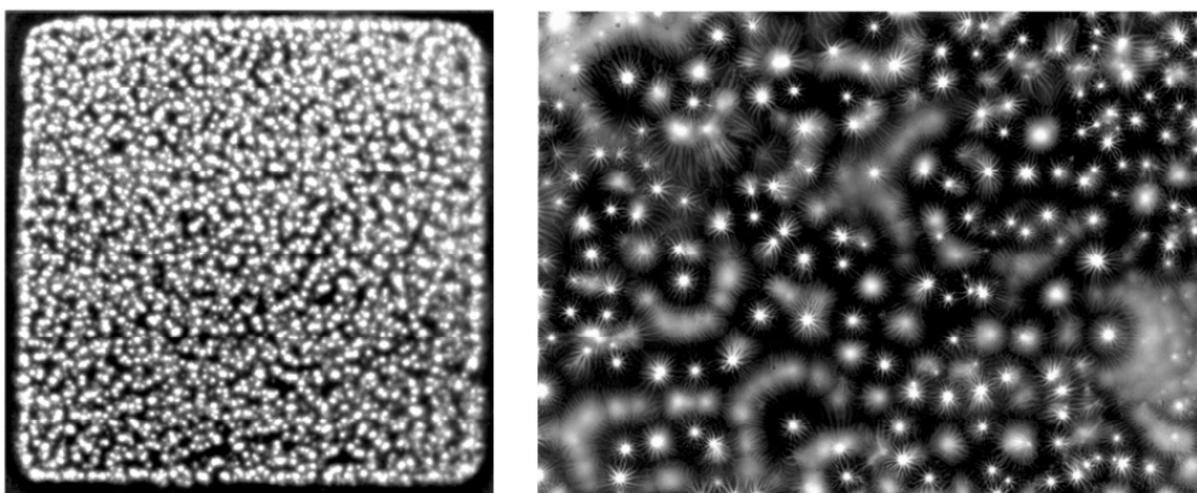


Figura 2.12 – Fotografias de microdescargas em DBD a pressão atmosférica. A distância entre os eletrodos é de 1 mm. Reproduzida de [36].

Experimentos que utilizavam esta técnica fotográfica realizados na década de 1930 já mostravam que as DBD produzidas àquela época apresentavam cerca de 10 microdescargas de duração menor que  $1 \mu\text{s}$  por  $\text{cm}^2$ , e que o diâmetro médio dos canais de ruptura eram de, aproximadamente 0,1 mm.

Na superfície do material dielétrico, o canal da microdescarga se espalha para uma descarga de superfície que cobre uma região muito maior do que o diâmetro do canal original.

Propriedades típicas dessas microdescargas (ordens de grandeza) para DBD a pressão atmosférica com distância entre os eletrodos de 1 mm no ar estão resumidas na Tabela 2.1.

Duração	1-10 ns
Raio do filamento de descarga	0,1 mm
Intensidade de corrente elétrica	0,1 A
Densidade de corrente elétrica	11-1000 A/cm <sup>2</sup>
Carga total	0,1-1 nC
Densidade eletrônica	10 <sup>14</sup> -10 <sup>15</sup> cm <sup>-3</sup>
Energia dos elétrons	1-10 eV
Temperatura do gás	Próxima à temperatura do gás ambiente

Tabela 2.1 – Ordens de grandeza das propriedades das microdescargas para DBD a pressão atmosférica com distância entre os eletrodos de 1 mm no ar. Adaptada de [36].

Os filamentos das microdescargas podem ser caracterizados como canais de plasma fracamente ionizados cujas propriedades são muito semelhantes às da descarga luminescente transiente de alta pressão. Eles se iniciam quando a tensão de ruptura é atingida, e se extinguem a tensões não muito abaixo da inicial, quando as capturas dos elétrons livres e as recombinações reduzem a condutividade do plasma. Devido ao acúmulo de cargas elétricas no material dielétrico, o campo elétrico resultante no local da microdescarga diminui drasticamente de intensidade em poucos nanossegundos, o que encerra o fluxo de corrente no local. A quantidade de carga transportada é proporcional à distância entre os eletrodos e à permissividade do dielétrico, mas independe da pressão. A densidade de corrente no canal de

microdescarga pode atingir de 100 a 1000 A.cm<sup>-2</sup>. Devido à sua curta duração, o aquecimento transiente do gás é muito pequeno na região do canal.

A barreira dielétrica limita a quantidade de carga e a energia depositadas na microdescarga e distribui os filamentos por toda a superfície do eletrodo. Enquanto a tensão externa está subindo, microdescargas adicionais ocorrem em posições novas porque a presença de cargas residuais no dielétrico reduz a intensidade dos campos elétricos onde as microdescargas já aconteceram. Quando a tensão é invertida, contudo, os novos canais formam-se nos locais das microdescargas antigas. Assim, tensões elevadas e de baixa frequência tendem a expandir as microdescargas, enquanto as tensões de alta frequência e de baixa intensidade tendem à reignitar os canais antigos a cada meio período da tensão AC. Este efeito de memória devido à deposição de carga no dielétrico é amplamente utilizado em telas de plasma de corrente alternada.

Para uma vasta gama de formatos de onda e de frequências de tensão, as propriedades das microdescargas independem do circuito de alimentação. Em geral, elas são determinadas pelas propriedades do gás, pela pressão e pela configuração dos eletrodos. Aumentar a potência em uma dada configuração significa gerar mais microdescargas por unidade de tempo e/ou por unidade de área do eletrodo. Essa característica é muito importante, pois permite estudar e adequar as propriedades da microdescarga para uma determinada aplicação. O aumento de escala até mesmo para superfícies de eletrodo muito grandes em aplicações industriais normalmente não são um problema se o espaçamento entre os eletrodos e a densidade de potência não forem alterados.

Ainda assim, algumas propriedades da descarga podem ser alteradas quando as variações da tensão são muito rápidas. Quando o tempo de elevação da tensão é comparável ao de duração de uma microdescarga, um grande número de microdescargas pode ser iniciado simultaneamente. Nesse caso, pode não haver área no eletrodo suficiente para acomodar todas as descargas iniciadas, o que acarreta microdescargas menos intensas. Por outro lado, a DBD pulsada permite outras possibilidades, como a sincronização das microdescargas, a ultrapassagem da tensão de ruptura para campos estacionários, além de permitir o espaçamento adequado entre os pulsos de acordo com o que se deseja estudar.

## 2.5.6 – DESCARGAS “QUENTES” – ARCO E CENTELHAMENTO

As avalanches, *streamers*, descargas de barreira dielétrica, corona e luminescente são exemplos de descargas elétricas “frias”. Isto significa que a temperatura das partículas mais pesadas, como os íons e as moléculas ionizadas, não é muito maior que temperatura ambiente e definitivamente é muito menor que a temperatura dos elétrons ( $T_e \gg T_i \approx T_n$ , onde  $e$ ,  $i$  e  $n$  representam elétrons, íons e partículas neutras, respectivamente). Essa é uma das características do plasma fora do equilíbrio [18-21].

A descarga do tipo arco é, via de regra, uma descarga autossustentável, com relativa baixa queda de potencial (da ordem do potencial de ionização de átomos, ou seja, em torno de 10 eV) [20, 21]. Essa característica distingue a descarga do tipo arco da descarga do tipo luminescente, cuja queda de potencial em torno do catodo é de centenas de Volts. Tal

queda menor resulta em mecanismos de emissão de elétrons pelo catodo que permitem um suprimento maior de corrente elétrica, aproximadamente igual à corrente total da descarga [20, 21]. Os catodos nas descargas do tipo arco emitem elétrons tanto “arrancados” pelo campo elétrico, quanto por emissão termiônica.

Uma característica da descarga do tipo arco é, portanto, as elevadas correntes elétricas (da ordem de 1 a  $10^5$ A), muito maiores que as correntes típicas das descargas luminescentes (da ordem de  $10^{-4}$  a  $10^{-1}$ A) [21]. Como os catodos recebem grandes quantidades de energia da corrente elétrica, eles alcançam altas temperaturas, podendo causar erosão e vaporização dos mesmos. É comum encontrar na espectroscopia óptica de descargas desse tipo as linhas espectrais dos elementos químicos constituintes dos eletrodos (diferentemente das demais descargas “frias”, onde se espera que apenas as linhas espectrais do gás precursor apareçam) [21, 33]. A depender da pressão do gás e da duração do pulso elétrico, essa descarga e o centelhamento podem originar plasmas em equilíbrio térmico, onde a temperatura das partículas pesadas é próxima da temperatura dos elétrons e pode chegar a milhares de Kelvin ( $T_e \approx T_i \approx T_n$ ). Um exemplo bastante comum de uma descarga do tipo arco são os arcos utilizados em soldagem [33].



Figura 2.13 – Descarga do tipo arco produzida em um arco de soldagem.

O centelhamento ocorre a tensões acima do nível de ruptura e a pressões elevadas (muitas vezes até acima da pressão atmosférica) [20]. Em geral, as descargas do tipo centelhamento acontecem quando o produto  $p.d > 10^3$  Torr.cm. A tais valores, a tensão necessária para a ruptura pode chegar a centenas de kV e as correntes elétricas são igualmente elevadas [20]. Essa descarga é um rápido processo transiente, e um dos exemplos mais comuns de sua ocorrência na natureza é o relâmpago.



Figura 2.14 – O relâmpago é um dos exemplos mais comuns de descarga do tipo centelhamento na natureza.

Na área de aplicações tecnológicas, o aquecimento do gás é frequentemente problemático e, por essa razão, as descargas não térmicas são preferidas em aplicações como a deposição de filmes e o tratamento de superfícies e de materiais delicados, como polímeros [33]. Ainda assim, há diversas aplicações para as descargas “quentes”, como nas tochas de plasma utilizadas na incineração de lixo e fornos de altas temperaturas.

## 2.6 - EVITANDO A FORMAÇÃO DE DESCARGAS QUENTES EM GASES ATÔMICOS E MOLECULARES

Pelas razões previamente expostas, no tratamento de materiais e superfícies sensíveis a elevadas correntes e temperaturas, é desejável que se produza plasmas não térmicos fora do equilíbrio. Para tanto, há diversas opções para a produção de descargas estáveis a pressão atmosférica, sendo as mais utilizadas apresentadas abaixo [33]:

- Uso de campos AC de alta frequência ou DC pulsada com pulsos de tensão de curta duração. Um exemplo é o uso de energia de micro-ondas (2,45 GHz), que tem efeito estabilizador sobre o volume de ionização sem necessitar de emissão de elétrons secundários pelo eletrodo. Há relatos de que descargas do tipo arco surgem após cerca de 100 ns [42]. Por conseguinte, é possível suprimir esse tipo de descarga utilizando pulsos mais curtos.
- Uso de barreiras dielétricas em eletrodos AC. A escolha do material da barreira é muito importante devido a fenômenos como o acúmulo de carga superficial e o efeito Penning. O desempenho da barreira também é dependente do gás e da frequência do campo. Por exemplo, tem-se observado [43] que a propagação de uma descarga é retardada e a sua largura de canal é significativamente aumentada quando ela se move em direção a um dielétrico cuja superfície está altamente carregada. Em um gás eletronegativo como o ar, a velocidade de propagação é duas ordens de magnitude maior do que no He. A formação de descargas difusas e uniformes no ar depende da quantidade de carga depositada na superfície do dielétrico e na quantidade e disposição espacial das microrroturas filamentosas. *Streamers* com expansão radial então proveem a carga espacial necessária para a estabilização do plasma luminescente [44].

- Uso de fluxo intenso de gás. O fluxo do gás controla o tempo das partículas no plasma e valores de potencia por partícula. Fluir gás também tem um efeito de arrefecimento [45], que afeta o comprimento do plasma que flui [46] e pode suprimir ou prevenir a formação de arcos quentes.
- Uso de geometrias de eletrodos diferenciadas, com múltiplas estruturas possuindo arestas pontiagudas ou cones capazes de produzir campos elétricos locais de alta intensidade. Essa característica diminui a tensão de ruptura e estabiliza a descarga sobre a superfície dos eletrodos [47, 48]. O surgimento de arcos é favorecido quando se tem eletrodos pontiagudos, de forma que, nesses casos, a potência aplicada deve ser controlada, para a manutenção do plasma no regime de luminescência.
- Seleção de gás adequado. Descargas atmosféricas são mais facilmente mantidas em He, devido ao seu pequeno diâmetro ( $\approx 2,8 \text{ \AA}$ , enquanto a molécula de ar comum tem um diâmetro médio de  $\approx 9,7 \text{ \AA}$ ) [33] e, portanto, oferece um livre caminho médio maior se comparado a outros gases, bem como um elevado coeficiente de emissão secundária  $\eta$ , permitindo uma tensão de ruptura mais baixa.

É importante ressaltar que a supressão eficaz de centelhamento e descargas do tipo arco nas descargas a pressão atmosférica geralmente requer combinações de vários dos métodos descritos acima.

# CAPÍTULO 3 – A INTERAÇÃO DO PLASMA COM OS MICRORGANISMOS E CARACTERIZAÇÃO DA INATIVAÇÃO MICROBIANA

## 3.1 – VALIDAÇÃO MICROBIOLÓGICA

### 3.1.1 – VALOR-D

O conceito de inativação ou de destruição de uma população de microrganismos não é absoluto. Isso porque é impossível determinar se e quando todos os microrganismos de uma amostra tratada são destruídos [49, 50]. Há relatos de células que sobreviveram mesmo quando expostas a condições outrora letais. Dessa forma, a investigação experimental da cinética de inativação de células é soberana na provisão da medida temporal da destruição microbiana [49, 50].

Um parâmetro amplamente utilizado por pesquisadores que estudam esterilização a plasma é o tempo de redução decimal, ou valor-D. Ele é definido como o tempo necessário para reduzir a população viável de microrganismos a 10% da população original. Em geral, o valor-D é expresso em unidades de tempo, apesar de, em casos de esterilização por radiação, o valor-D ser expresso em unidade de dose [49, 50].

### 3.1.2 – INDICADOR BIOLÓGICO

A escolha de um microrganismo como indicador biológico é baseada em vários critérios: resistência ao tipo de processo utilizado, ausência de patogenicidade e facilidade de cultura [49, 50]. Em geral, esses microrganismos são identificados pela sua espécie, pelo número de referência na coleção de onde o microrganismo foi replicado, pelo número de esporos viáveis e pelo valor-D. Especificamente para a esterilização a plasma, foram testadas diversas bactérias, vírus, fungos e esporos, e elegeu-se o esporo do *Bacillus stearothermophilus* como o indicador biológico padrão, por ser a espécie mais resistente ao processo e a que melhor atende aos demais critérios [49, 50].

Estudos genéticos e taxonômicos recentes mostraram que algumas espécies do gênero *Bacillus* migraram de gênero ou se combinaram formando um novo gênero. É o caso da espécie *Geobacillus stearothermophilus*, cujas aplicações são as mesmas do *B. stearothermophilus* [51].

O *G. stearothermophilus* é um bacilo esporulante, Gram-positivo, termófilo, cuja temperatura ideal de crescimento está na faixa de temperatura de 55°C a 60°C. Ele é encontrado no solo, águas termais, sedimentos do oceano, e é um dos microrganismos que podem causar a deterioração de produtos alimentares [51].

### 3.1.3 – PADRÃO DE MORTE MICROBIANA

Até o momento, os trabalhos experimentais sobre os efeitos microbicidas dos plasmas frios produzidos a pressão atmosférica mostram que as curvas de contagem de células

viáveis apresentam um padrão de decaimento exponencial [49, 50]. Há relatos de que, quando plotadas em gráficos semi-log, essas curvas podem apresentar diferentes inclinações [39]. Alguns dos fatores associados a esses comportamentos são: o tipo de microrganismo, o suporte onde o microrganismo é semeado (tipo de placa, de meio de cultura etc.) e o método de exposição (se em contato direto com o plasma ou se as amostras são posicionadas fora da descarga) [39, 49, 50]. Há relatos de que para cada momento, há um processo de inativação predominante (radiação UV, erosão de biofilmes por bombardeamento iônico, processos metabólicos, entre outros) [34, 39]. Nesses casos de múltiplas inclinações, é determinado um valor-D para cada etapa.

## 3.2 – MECANISMOS DE AÇÃO BIOCIDA DO PLASMA

### 3.2.1 – RADIAÇÃO UV

Sabe-se que a exposição à radiação ultravioleta (UV) afeta as células por induzir a formação de dímeros de timina no DNA, o que inibe a capacidade dos microrganismos se replicarem. No entanto, estudos mostram que em plasmas produzidos a pressão atmosférica, a radiação UV não é um agente biocida relevante [34, 37, 39, 52-56]. Isso porque a radiação UV só inativa microrganismos se seu comprimento de onda estiver entre 220 nm e 280 nm e se a dose de radiação for suficientemente alta. A maioria dos gases utilizados nos experimentos a pressão atmosférica não emitem doses de radiação UV significativas nessa faixa de comprimentos de onda. Além disso, estudos mostram que a maioria da radiação produzida em plasmas a pressão atmosférica é reabsorvida no volume do próprio plasma, sequer chegando às amostras [39].

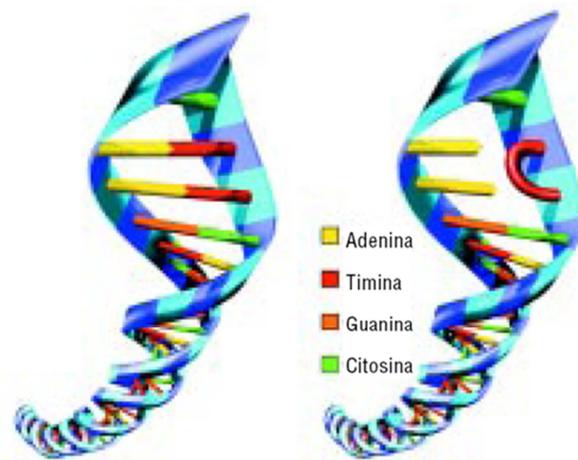


Figura 3.1 – Representação da formação de dímeros de timina.

### 3.2.2 – ESPÉCIES REATIVAS

As propriedades dos plasmas não-térmicos são determinadas pelas colisões entre os elétrons e os demais constituintes do plasma. No ar atmosférico, as reações químicas são principalmente decorrentes do impacto de elétrons com oxigênio e nitrogênio, elementos químicos mais abundantes, conforme apresentado na Tabela 1

<b>Composição do ar seco.</b>	
<b>Gás</b>	<b>Partes por milhão (a fração volumétrica somente é igual à fração molar para gases ideais)</b>
Nitrogênio (N <sub>2</sub> )	780.840 ppm (78.084%)
Oxigênio (O <sub>2</sub> )	209.460 ppm (20.946%)
Argônio (Ar)	9.340 ppm (0.9340%)
Dióxido de carbono (CO <sub>2</sub> )	380 ppm (0.0380%)
Neônio (Ne)	18,18 ppm (0.001818%)
Hélio (He)	5,24 ppm (0.000524%)
Metano (CH <sub>4</sub> )	1,79 ppm (0.000179%)
Criptônio (Kr)	1,14 ppm (0.000114%)
Hidrogênio (H <sub>2</sub> )	0,55 ppm (0.000055%)
Óxido nitroso (N <sub>2</sub> O)	0,3 ppm (0.00003%)
Xenônio (Xe)	0,09 ppm ( $9 \times 10^{-6}$ %)
Ozônio (O <sub>3</sub> )	0,0 a 0,07 ppm (0% a $7 \times 10^{-6}$ %)
Dióxido de nitrogênio (NO <sub>2</sub> )	0,02 ppm ( $2 \times 10^{-6}$ %)
Iodo (I)	0,01 ppm ( $1 \times 10^{-6}$ %)
Monóxido de carbono (CO)	0,1 ppm (0.00001%)
Amônia (NH <sub>3</sub> )	traços

Tabela 3.1 – Composição do ar seco. Fonte: NASA Earth Fact Sheet

As espécies reativas (átomos, moléculas, íons) geradas nos plasmas produzidos a pressão atmosférica têm papel fundamental na capacidade biocida desse agente esterilizante [34, 35, 38-41, 52-56]. Vários autores demonstraram um aumento no poder microbicida das descargas, quando na composição do gás precursor há oxigênio [34, 35, 38-41, 52-56]. Isso se deve à formação de compostos como o ozônio ( $O_3$ ), o oxigênio atômico ( $O$  ou  $O^{\cdot}$ ), superóxidos ( $O_2^{\cdot-}$ ) e peróxidos ( $[O-O]^{2-}$  ou  $H_2O_2$ ). A presença de umidade também contribui na letalidade do plasma, pois um dos principais subprodutos da dissociação da molécula de água é o radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ), que ataca estruturas internas e externas dos microrganismos [34, 35, 38-41, 52-56]. Além desses, quando a descarga é produzida no ar, a formação de compostos nitrogenados reativos, como os  $NO_x$  também auxiliam na morte microbiana [34, 35, 38-41, 52-56].

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), de nitrogênio (ERN), entre outras espécies reativas, é parte integrante do metabolismo celular e é observada em diversas condições fisiológicas. ERO e ERN têm importante função biológica, como na fagocitose, fenômeno em que essas espécies são produzidas para eliminar o agente agressor. Por outro lado, quando sua produção é exacerbada, o organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante que consegue controlar e restabelecer o equilíbrio. O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante [57-59], com predomínio dos oxidantes, com dano consequente.

Em sistemas biológicos, a membrana celular constitui um dos focos de atuação de ERO, de ERN e de outras espécies reativas e sua função é vital para a célula. Além da membrana que envolve a célula, as membranas das organelas intracelulares, tais como mitocôndria, retículo endoplasmático, núcleo etc., apresentam uma estrutura bilipídica e uma

variedade de proteínas e açúcares [57, 60-62]. O dano celular resulta basicamente de ataque de ERO e ERN sobre as macromoléculas, tais como açúcares  $(\text{CH}_2\text{O})_n$ , DNA, proteínas e lipídios.

Nos açúcares, importante fonte de energia para os microrganismos, o  $\text{OH}^\cdot$  reage com  $(\text{CH}_2\text{O})_n$  por abstração randomizada de um átomo de H de um dos átomos de C, produzindo um radical centrado no carbono, o que leva à quebra da cadeia de importantes moléculas.

No tocante aos ácidos nucleicos, as ERO, principalmente o  $\text{OH}^\cdot$ , atacam o açúcar desoxirribose, as bases purínicas (adenina e guanina) e pirimidínicas (timina, citosina e uracila), com ataque preferencial à guanina, gerando 8-hidroxi- ou 8-oxoguanina [61], mutagênicas. Como resultado, ocorrem as quebras da cadeia do DNA, da ligação cruzada entre as fitas e modificações nas suas bases levando a mutações e apoptose.

As proteínas têm muitos sítios reativos [61, 62]. Durante o estresse oxidativo, o primeiro evento é a formação de um radical centrado no carbono, por extração de átomo de hidrogênio do carbono  $\alpha$ , em uma ligação peptídica, daí, ocorre fragmentação das cadeias e oxidação de quase todos os tipos de aminoácidos, com produção frequente de compostos carbonilados, particularmente a partir de prolina, arginina e lisina. Adicionalmente, proteínas podem conter sítios de ligação com metais que são especialmente suscetíveis a reações reversíveis de oxidação e redução, as quais podem produzir uma sequência de sinais que podem ser reconhecidos por proteases celulares específicas que degradam tais proteínas. Muitas proteínas intracelulares têm grupos sulfidríla reativos em resíduos de cisteína, que podem ser oxidados a dissulfeto ou ácidos cistéicos, que podem ser novamente reduzidos

metabolicamente. Similarmente, muitas proteínas têm um aminoácido metionina que pode sofrer modificação reversível a sulfóxido ou sulfona. Os aminoácidos aromáticos formam quinurenina, grupos catecólicos e polímeros. Há formação de produtos de adição com peróxidos lipídicos e com hidroxialdeídos derivados de lipídeos insaturados.

Finalmente, a peroxidação lipídica é causada pelo ataque de uma espécie reativa, geralmente  $\text{OH}^\cdot$ , que abstrai um átomo de hidrogênio de um grupo metileno alílico, normalmente, de um ácido graxo poli-insaturado, deixando um elétron desemparelhado no carbono, caracterizando a etapa de iniciação. Este radical é usualmente estabilizado por rearranjo molecular, formando um dieno conjugado. Em condições aeróbicas, o carbono radicalar do dieno conjugado reage com  $\text{O}_2$  (que é uma molécula hidrofóbica e, portanto, se concentra no interior das membranas) e forma o radical peroxila. Este radical peroxila é capaz de abstrair átomos de hidrogênio de moléculas de lipídeos adjacentes, cujo carbono radicalar sofre novo rearranjo, reage com  $\text{O}_2$  e forma outro radical peroxila e assim sucessivamente, caracterizando a reação em cadeia da etapa de propagação. O radical peroxila combina-se com o hidrogênio abstraído, gerando o lipídeo hidroperóxido (LOOH) que, ao sofrer quebra, forma aldeídos como malonaldeído e 4-hidroxinonenalaldeído, entre outros. Na decomposição dos hidroperóxidos lipídicos são gerados radicais peroxila e alcoxila através da reação de Fenton. A terceira e última etapa da peroxidação lipídica, a etapa de terminação instala-se com a neutralização dos radicais formados por ação de antioxidantes lipossolúveis ( $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -caroteno,  $\text{NO}_x$ ) ou pela reação de dois radicais lipídicos formando produtos não radicalares. Nos sistemas biológicos, a peroxidação lipídica pode ocorrer por via enzimática (ciclooxigenases e peroxidases) e por via não enzimática (auto-oxidação) cujo mecanismo supracitado envolve a participação de espécies reativas de oxigênio, metais e outros radicais livres. Pode ocorrer peroxidação de estruturas supramoleculares, como em fosfolipídeos e em

agregados de lipoproteínas [61, 62]. Todas estas modificações oxidativas causam mudanças nas propriedades físicas e químicas das membranas, alterando sua fluidez e permeabilidade, com expansão do líquido intracelular e risco de ruptura das membranas da célula e das organelas, com conseqüente morte celular. Reações envolvendo os vários intermediários entre si levam a novos produtos, por ex., malondialdeído reage com o grupo amina de purinas e hidroxinonenal reage com guanosina, entre outras reações.

### 3.2.3 – INTERAÇÃO COM PARTÍCULAS CARREGADAS

Há na literatura diversos estudos que colocam a corrosão dos biofilmes por partículas com alta energia cinética como um importante mecanismo de ação biocida dos plasmas. Todavia, em um plasma não térmico produzido a pressão atmosférica, a energia média dos elétrons e dos íons é baixa, se comparada à energia média dessas partículas em plasmas produzidos a baixas pressões. Por essa razão, não se espera que o bombardeamento com partículas carregadas tenha um papel importante na inativação dos microrganismos. Apesar disso, há evidências de que, apesar de pouco energéticas, as partículas carregadas podem exercer uma função expressiva na ruptura de membranas de bactérias, não relacionada à corrosão das mesmas [34, 37]. Utilizando um modelo de plasma empoeirado, provou-se que a força eletrostática causada pelo acúmulo de cargas na superfície externa das células pode superar a tensão da membrana e rompê-la [38-40].

# CAPÍTULO 4 - DESCRIÇÃO DO SISTEMA E DOS PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Neste capítulo, são apresentados o sistema de produção do plasma, seus componentes e os procedimentos experimentais.

## 4.1 – A FONTE DE PLASMA.

O sistema utilizado foi inicialmente concebido para estudos de eliminação de gases poluentes com um reator a plasma de descarga corona DC a baixa pressão [63]. Foram aproveitados alguns dados e peças produzidos àquela época; no entanto, a ideia de se utilizar o plasma para estudos de esterilização, a montagem e todas as adaptações do sistema para esse novo tipo de estudo foram feitas durante a realização do presente trabalho [64].

Essencialmente, a descarga ocorre entre dois eletrodos cilíndricos e coaxiais. As dimensões de todas as peças foram determinadas com base em livros especializados e em artigos e reuniões com pesquisadores do Canadá e do Japão [65].

A parte externa da fonte de plasma é composta por uma peça (casca) cilíndrica de latão, com 150 mm de comprimento por 74 mm de diâmetro interno, e 4 mm de espessura; possui seis portas auxiliares laterais com flanges de tipo padrão, *NW10* e *NW25*, que podem ser utilizadas tanto para a conexão de medidores quanto como janelas para espectroscopia óptica. A Figura 4.1 traz uma imagem do artefato.



Figura 4.1 – Peça de latão sobre suporte de madeira com o eletrodo interno inserido.

Nas extremidades da casca cilíndrica, há ranhuras circulares, primeiramente projetadas para o posicionamento de anéis de vedação utilizados na produção de vácuo. Coincidentemente, o diâmetro dessas ranhuras, de 90 mm, é o mesmo das placas de Petri utilizadas na validação microbiológica da esterilização por plasma; portanto, em todas as exposições das amostras biológicas ao plasma, as placas de Petri foram encaixadas na ranhura da casca cilíndrica de latão. A Figura 4.2 traz uma foto da ranhura.



Figura 4.2 – Vista frontal da casca cilíndrica. A borracha preta é um anel de vedação colocado sobre a ranhura onde foram encaixadas as placas de Petri durante a validação microbiológica

da esterilização a plasma. Mais internamente, nota-se a peça cilíndrica de pirex encaixada dentro da casca de latão. Além disso, veem-se o eletrodo ao centro e os flanges laterais que podem ser utilizados na caracterização física do plasma, por exemplo.

O eletrodo interno é de aço inoxidável, cilíndrico, e possui 28 fileiras de pontas piramidais escavadas ao longo de seu comprimento. Suas dimensões são de 91 mm de comprimento por 55 mm de diâmetro (medido entre as extremidades das pontas piramidais). Cada fileira de pontas tem 15 pirâmides, e cada pirâmide tem cerca de 5 mm de altura. A razão pela qual o eletrodo interno tem essa geometria deve-se à necessidade de se ter um campo elétrico acentuadamente não uniforme para a produção da descarga corona, conforme descrito em [20, 21, 66].

O eletrodo interno foi fixado em uma base de acrílico, cujas funções são posicionar o artefato no centro da casca cilíndrica e isolá-lo da casca externa, visto que ele fica conectado ao polo ativo da fonte de tensão e a casca fica aterrada. A Figura 4.3 traz uma foto do eletrodo.

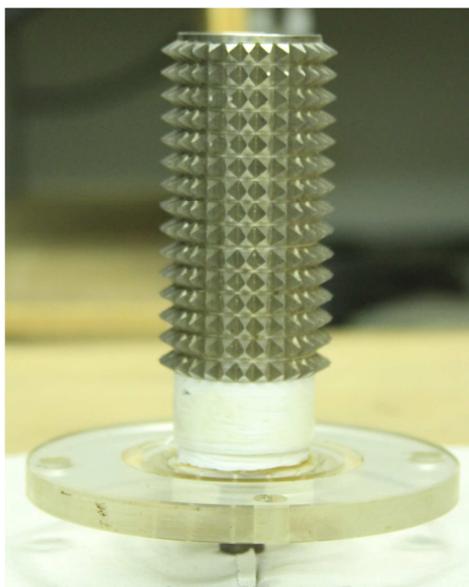


Figura 4.3 – O eletrodo interno, de aço inoxidável, fixado na base de acrílico.

À época da concepção da fonte de plasma [63, 67], foram realizados testes com outro eletrodo interno, que ao invés de pontas tinha diversos gumes, como mostra a Figura 4.4. No entanto, como pode ser observado no gráfico da Figura 4.5, o desempenho do eletrodo com pontas adequou-se melhor às características de tensão e corrente desejadas.

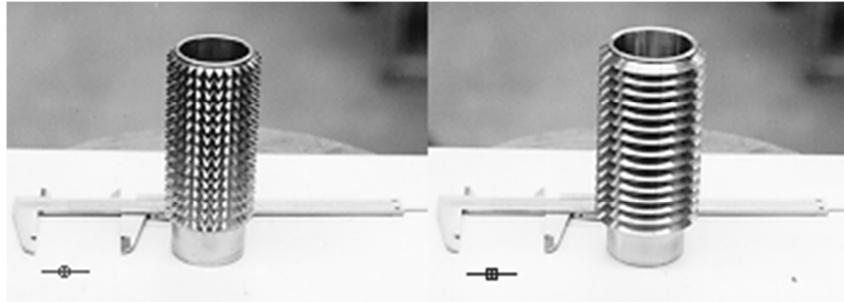


Figura 4.4 – Fotos dos eletrodos internos testados para uso na fonte de plasma. À esquerda, o eletrodo com pontas e à direita, o eletrodo com gumes, denominado “catodo liso”. Reproduzida de [63].

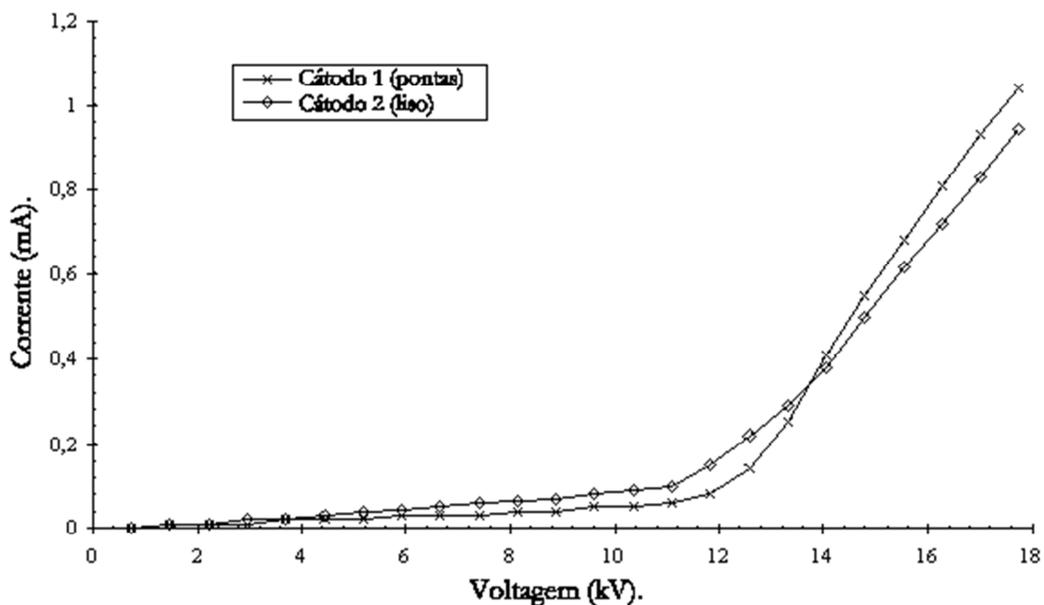


Figura 4.5 - Comparação entre os eletrodos internos testados. Reproduzida de [63].

Nos primeiros experimentos com a fonte de plasma adaptada para estudos de esterilização, procurou-se utilizar somente a casca cilíndrica de latão como eletrodo externo, tanto que seu aterramento foi pensado com base no desenho original [63, 67]; todavia, a tensão aplicada entre os eletrodos neste trabalho é maior que as aplicadas nos estudos de eliminação de gases poluentes, onde as descargas ocorriam a baixas pressões. Logo, notou-se que a descarga inicial era muito instável, e rapidamente iniciava-se um centelhamento, sinal de ruptura dielétrica do meio. Como descrito em [20], em descargas desse tipo, a corrente elétrica é bastante elevada, de intensidade bem maior que a capacidade das fontes de tensão utilizadas no experimento, e a insistência em utilizar a casca de latão como o único eletrodo externo, fatalmente ocasionaria danos ao circuito de alimentação da fonte.

Uma das adaptações realizadas na fonte de plasma foi a inserção de um material dielétrico entre os polos da descarga, com a finalidade de aumentar a rigidez dielétrica do meio e minimizar a possibilidade de centelhamento [20, 68]. Como o material dielétrico mais adequado disponível era o vidro, utilizou-se um tubo de pirex, com dimensões de 130 mm de comprimento, por 70 mm de diâmetro e 3 mm de espessura, posicionado dentro da casca cilíndrica de latão. Tanto o tubo quanto a casca externa foram aterrados. A distância entre o eletrodo interno e a nova carcaça externa (casca cilíndrica de latão + tubo de pirex) é de 8 mm, aproximadamente. Na Figura 4.2, pode-se identificar o tubo de pirex no sistema.

A Figura 4.6 traz um diagrama da fonte de plasma e do circuito de alimentação do sistema.

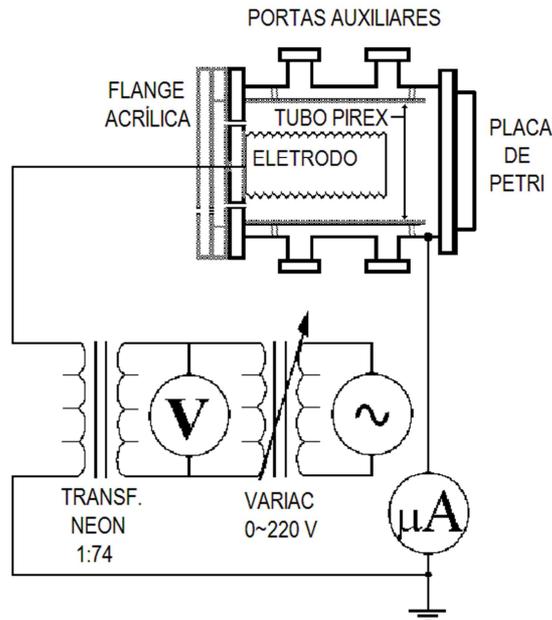


Figura 4.6 - Esquema da fonte de plasma e do circuito de alimentação utilizados no experimento. Os flanges à esquerda são de acrílico especial. A placa de Petri com as amostras biológicas é posicionada na ranhura projetada para o anel de vedação utilizado na produção de vácuo.

O circuito de alimentação elétrica consiste em uma fonte variável de alta tensão, construída a partir de um transformador para lâmpadas de Neon. O controle da tensão na fonte foi feito por meio de um regulador de tensão do tipo *VARIAC*. As leituras de tensão e corrente no circuito foram realizadas com multímetros digitais *Minipa ET-2070* e *ET-2060* nos pontos mostrados no circuito da Figura 4.6. O circuito operava a 60 Hz, na faixa de tensão entre 0 e 16,3 kV.

Na estimativa da tensão elétrica na qual ocorre ruptura dielétrica do ar à pressão atmosférica, foi utilizado o modelo proposto em [20, 66]. Para o produto  $p.d$  de 608 Torr.cm, foi obtida tensão de ruptura de, aproximadamente 18 kV, o que é desejável, considerando que essa intensidade é superior às tensões alcançadas pelo o sistema, de 16,3 kV [64]. Conforme

apresentado no Capítulo 2, para a produção da descarga de barreira dielétrica, é fundamental que não haja a ruptura dielétrica do meio.

De posse dessas informações, foi elaborado o protocolo para a produção do plasma. Após a conferência de todas as conexões mecânicas, elétricas, aterramentos etc. do sistema, zerava-se a tensão no regulador *VARIAC* e conectava-se o sistema à rede elétrica do laboratório. Observando-se as leituras dos multímetros digitais, elevava-se gradualmente o potencial até o valor máximo admissível no regulador de tensão (220 V AC, correspondentes a 16280 V AC entre os polos da descarga). Quando esse valor de tensão era atingido, observava-se a formação da descarga difusa e temporalmente estável.

## 4.2 – PROTOCOLOS PARA A VALIDAÇÃO MICROBIOLÓGICA

Na validação microbiológica da esterilização, foram utilizados como indicadores biológicos esporos de *Geobacillus stearothermophilus*, padrão ATCC 12977, envasados em ampolas com pelo menos  $10^6$  Unidades Formadoras de Colônias (UFC) cada. Todas as amostras foram doadas pela *Advanced Sterilization Products*, empresa da companhia *Johnson & Johnson*.

O tratamento dos microrganismos com plasma incluiu exposições por 2, 5, 10, 15, 20 e 40 minutos. O preparo das amostras seguiu o roteiro abaixo, representado na Figura 4.7:

**1ª Etapa:** A ampola é rompida em Cabine de Segurança Biológica (CSB) Classe IIA1, para que não haja qualquer contaminação.

**2ª Etapa:** O conteúdo é então transferido para uma proveta graduada.

**3ª Etapa:** Adiciona-se solução excipiente até inteirar o volume de 10 mL. Como solução excipiente, foi utilizada água tri-destilada e deionizada, por ser um líquido inócuo às amostras.

**4ª Etapa:** Semeia-se 1 mL da suspensão de esporos homogeneizada em placa de Petri esteril. São semeadas seis placas, uma para cada tempo de exposição. O conteúdo restante da suspensão fica reservado para controle.

**5ª Etapa:** As placas inoculadas são então colocadas para secagem na CSB a 37°C por 30 minutos.

Esse procedimento foi repetido cinco vezes, durante o mês de março de 2009.

Portanto, para cada tempo de exposição, foram expostas cinco placas de Petri inoculadas. Na validação deste procedimento garantiu-se, no mínimo,  $10^5$  UFC em cada placa inoculada.

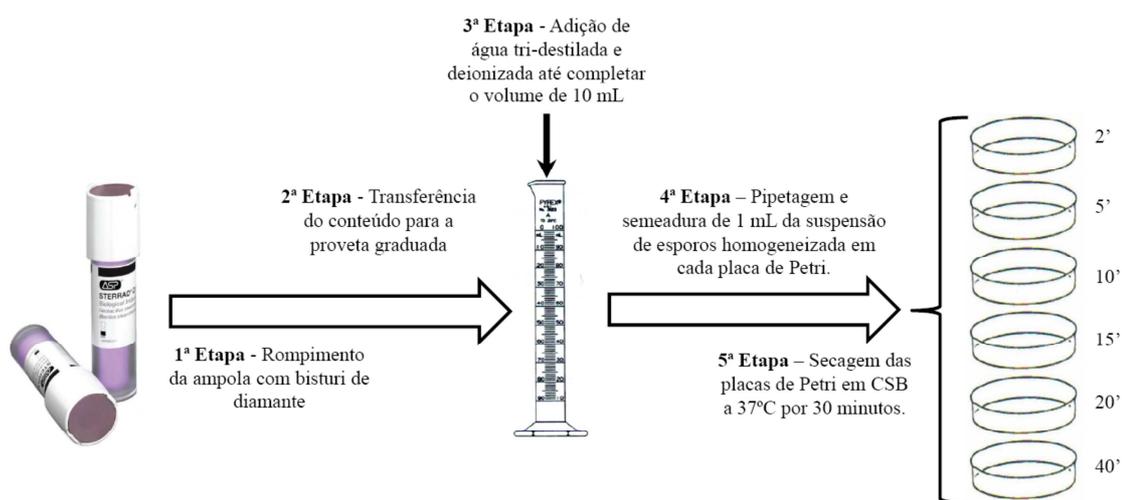


Figura 4.7 – Representação das etapas de preparo das amostras biológicas para exposição ao plasma.

Após a exposição ao plasma, cada placa de Petri é novamente levada para a Cabine de Segurança Biológica. Ela é lavada com a solução excipiente, o conteúdo é transferido para uma proveta graduada e adiciona-se água tri-distilada e deionizada até inteirar o volume de 10 mL.

O tratamento dado à amostra biológica a partir deste momento depende do tempo de exposição ao qual a amostra foi submetida.

Para as amostras expostas por 2 e 5 minutos, pipeta-se 0,01 mL (fator de diluição  $10^{-3}$ ) da nova suspensão de esporos e semeia-se esse conteúdo sobre placa de Petri estéril, a qual é colocada para secar por 30 minutos a 37°C. Após a secagem, a Placa é preenchida com 20 mL de Ágar Triptona Glicose Extrato de Levedura (“*Plate Count Agar*”) [69-71]. Solidificado o meio de cultura, a Placa é incubada invertida a 46°C por 72 horas [69-71].

Para as amostras expostas por 10, 15 e 20 minutos, pipeta-se 0,1 mL (fator de diluição  $10^{-2}$ ) da nova suspensão de esporos e semeia-se esse conteúdo sobre placa de Petri estéril, a qual é colocada para secar por 30 minutos a 37°C. Após a secagem, a Placa é preenchida com 20 mL de Ágar Triptona Glicose Extrato de Levedura (“*Plate Count Agar*”) [69-71]. Solidificado o meio de cultura, a Placa é incubada invertida a 46°C por 72 horas [69-71].

Para as amostras expostas por 40 minutos, como havia a hipótese da inativação da totalidade dos esporos viáveis, não se realizou qualquer diluição, e o meio de cultura foi adicionado diretamente na placa exposta ao plasma.

A Figura 4.8 apresenta um esquema desse procedimento.

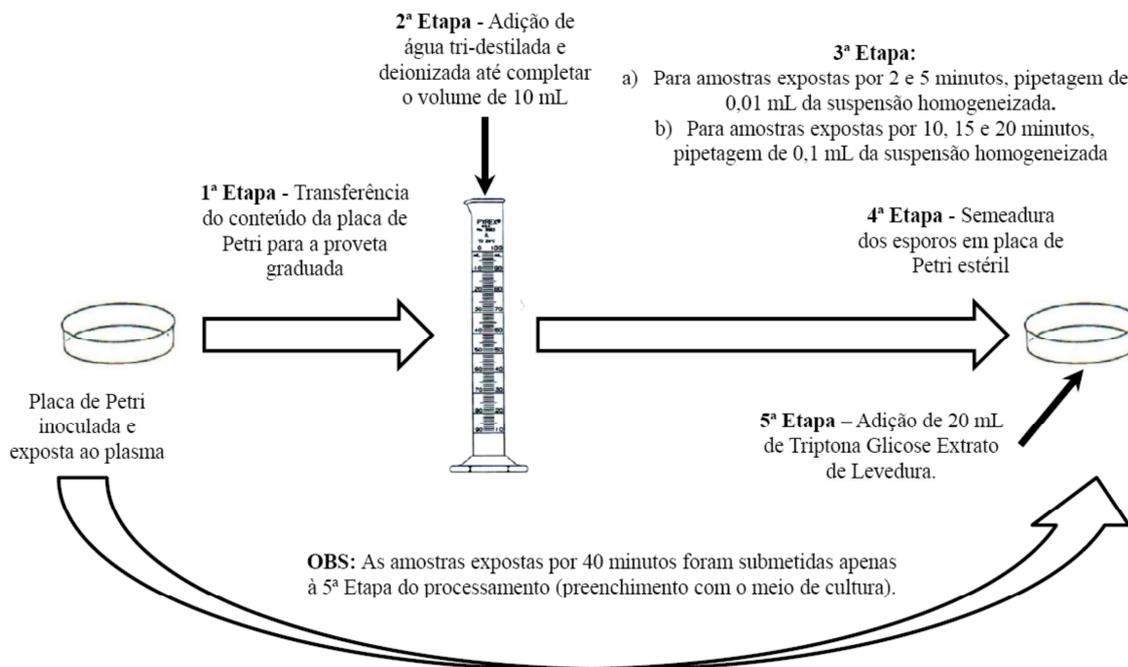


Figura 4.8 – Representação do tratamento dado às amostras biológicas após a exposição ao plasma. As placas de Petri com amostras expostas por 40 minutos eram apenas preenchidas com o meio de cultura, por não necessitarem de diluição dos esporos viáveis.

Passado o período de incubação, a contagem de esporos viáveis foi feita com auxílio de uma lupa 10x.

O protocolo da *Advanced Sterilization Products* para crescimento de esporos de *G. stearothermophilus* recomenda incubação entre 55°C e 60°C por 24 horas; no entanto, a essas temperaturas, o meio de cultura utilizado neste trabalho encontra-se no estado líquido, comprometendo a incubação adequada dos esporos. Portanto, foi feita a opção de se manter os esporos incubados a 46°C, mas compensar a redução da temperatura com um maior tempo de incubação para que os esporos viáveis crescessem adequadamente.

# CAPÍTULO 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 5.1 – DA CLASSIFICAÇÃO DA DESCARGA ELÉTRICA

Conforme relatado no Capítulo 4, a fonte de plasma utilizada neste trabalho foi projetada para produzir descargas do tipo corona DC a baixas pressões para estudos de controle de poluentes [63]. Daí o fato de o eletrodo interno possuir pontas piramidais escavadas em todo o seu comprimento: a produção de campos elétricos altamente não uniformes e intensos.

No entanto, com a inserção do material dielétrico (*pirex*) que reveste o eletrodo externo e com a aplicação de uma tensão AC, ainda que de baixa frequência, a descarga elétrica passa a apresentar características de uma descarga de barreira dielétrica. Isso porque, além da ocorrência de fenômenos como o acoplamento capacitivo do dielétrico e o consequente surgimento da corrente de deslocamento, notou-se que com essas modificações a descarga tornou-se mais estável e difusa, conforme se pode constatar na Figura 5.1.

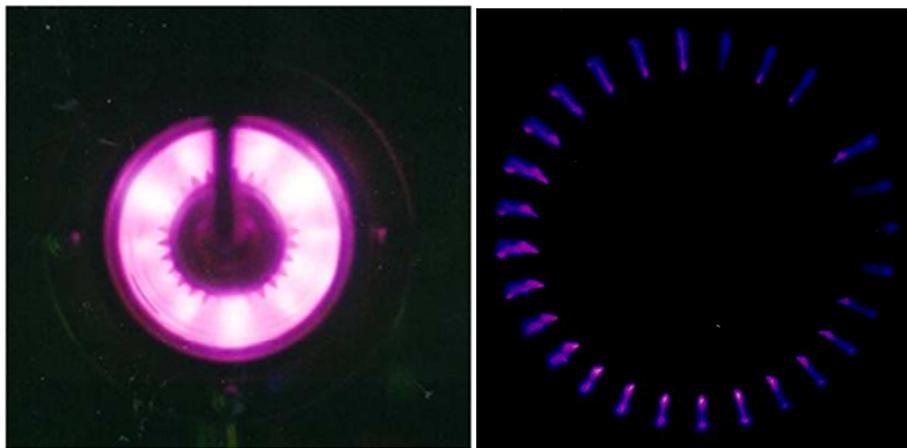


Figura 5.1 – Fotos da fonte de plasma em operação. À esquerda, o sistema está montado para os estudos de esterilização por plasma apresentados neste trabalho e opera conforme o protocolo (16,3 kV a pressão atmosférica). Vale ressaltar que a foto foi corrigida para melhor visualização da luminosidade da descarga. À direita, uma foto do mesmo sistema sendo utilizado para estudos de eliminação de gases poluentes, reproduzida de [63]. Na ocasião, o sistema operava com tensão de 13 kV entre os polos e dentro da faixa de pressão de  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$  Torr. O gás utilizado era o  $\text{NO}_2$ .

Além disso, assegurado o protocolo de produção da descarga estável, a potência média do obtida no sistema foi de 14,6W, para correntes elétricas da ordem de 0,9 mA. Tais importantes propriedades ensejaram temperaturas macroscópicas abaixo de  $50^\circ\text{C}$ , pois, como houve a injeção seletiva de energia nos elétrons, o ambiente e a geometria da fonte foram suficientes para dissipar o calor produzido na descarga.

Um frequente desafio para os profissionais dos Centros de Material e Esterilização é a garantia de esterilidade de produtos para a saúde críticos que não podem ser submetidos ao processamento em autoclaves de vapor d'água sob pressão [1-3]. A disponibilidade de um método de esterilização a baixas temperaturas simples e eficaz representa um grande avanço para a área, haja vista os vários parâmetros que devem ser

controlados nos sistemas hoje disponíveis para a garantia do processo, e os recentes relatos de resistência de alguns microrganismos a agentes esterilizantes químicos como o glutaraldeído, amplamente utilizado no país [4].

## 5.2 – DA CARACTERIZAÇÃO DO PLASMA

Durante a realização deste trabalho, não foi possível realizar medidas diretas para a caracterização do plasma (energia dos elétrons e dos íons, frequência característica de plasma, entre outras). Tentou-se a inserção de uma sonda eletrostática (do tipo Sonda de Langmuir) para a coleta de dados [72]; entretanto, a pequena distância entre os polos da descarga e a ponta da sonda, que é metálica, ocasionou o surgimento de centelhas, impossibilitando a obtenção de resultados experimentais dos parâmetros do plasma produzido.

Ainda assim, é possível discutir características da descarga. Como ela ocorre a pressão atmosférica, a densidade de partículas é da ordem de  $3,0 \cdot 10^{25} \text{ m}^{-3}$  [73]. Utilizando o método proposto em [73], foi obtido livre caminho médio para as partículas de  $1,1 \cdot 10^{-7} \text{ m}$ . Apesar de a energia térmica média das partículas (de aproximadamente 0,04 eV) ser bem inferior à energia de ionização dos átomos e moléculas que constituem o gás precursor (em sua maioria, superiores a 10 eV), algumas partículas possuem elevada energia cinética (aquelas que estão na cauda superior da função distribuição de Maxwell-Boltzmann). A diferença de potencial elétrico entre os eletrodos de 16,3 kV acelera esses elétrons livres mais energéticos a energias suficientes para ionizar outros átomos e moléculas, aumentando a fração de ionização do gás até que este apresente as propriedades de um plasma. As Figuras 5.2, 5.3 e 5.4 trazem algumas das seções de choque de ionização e dissociação por impacto

eletrônico do nitrogênio molecular ( $N_2$ ), oxigênio molecular ( $O_2$ ) e da água ( $H_2O$ ), moléculas mais importantes para os mecanismos de ação biocida do plasma, por poderem originar as espécies reativas discutidas no Capítulo 3. Nota-se que as primeiras energias eletrônicas necessárias para produzir ionizações nessas moléculas são de poucos eV.

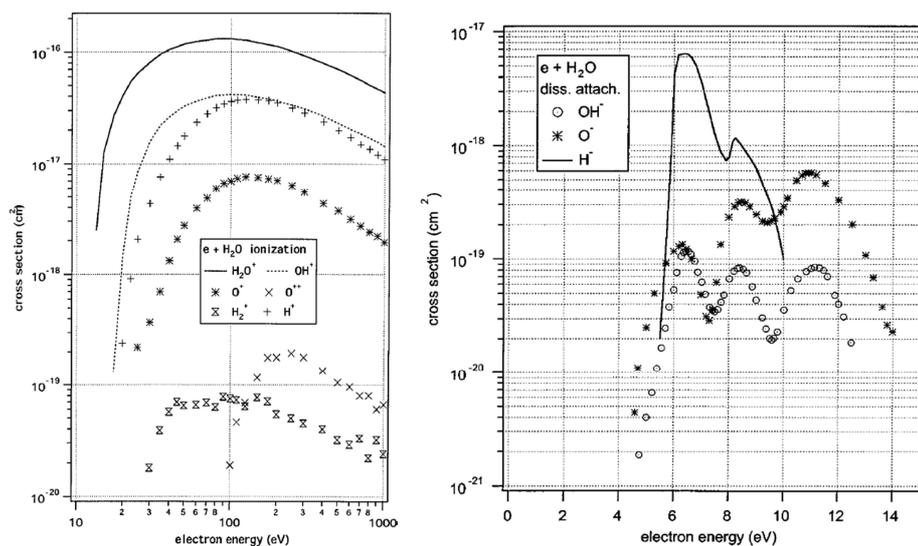


Figura 5.2 – Seções de choque de ionização por impacto eletrônico da água. À esquerda, as seções de choque para a produção dos radicais  $H_2O^+$ ,  $OH^+$ ,  $O^+$ ,  $O^{++}$ ,  $H_2^+$  e  $H^+$ . À direita, as seções de choque para a produção dos radicais  $OH^-$ ,  $O^-$  e  $H^-$ . Reproduzidas de [74].

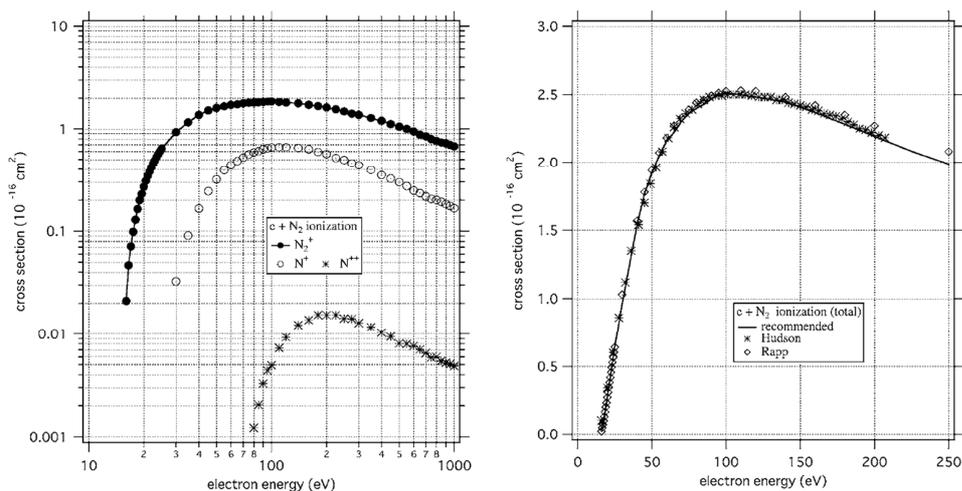


Figura 5.3 - Seções de choque de ionização por impacto eletrônico do nitrogênio molecular ( $N_2$ ). À esquerda, as seções de choque para a produção dos radicais  $N_2^+$ ,  $N^+$  e  $N^{++}$ . À direita, a seção de choque de ionização total do nitrogênio molecular. Reproduzidas de [75].

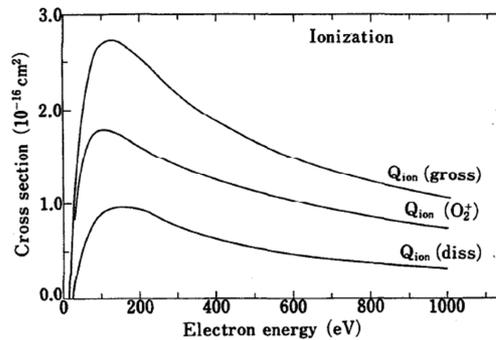


Figura 5.4 - Seções de choque de ionização por impacto eletrônico do oxigênio molecular ( $O_2$ ). Estão representadas as seções de choque total (*gross*), de produção do radical  $O_2^+$ , e de dissociação molecular (*diss*). Reproduzidas de [76].

Sobre os mecanismos de produção do plasma, como a frequência do campo elétrico externo é de 60 Hz, faz-se necessário avaliar sua influencia na inserção de energia seletiva dos elétrons responsáveis pelas ionizações no gás precursor. Sabendo que os energia média dos elétrons (0,04 eV) acarreta velocidade térmica da ordem de  $10^5$  m/s, pode-se concluir que no tempo de uma oscilação do campo elétrico externo (1/60s), o elétron perfaz uma grande quantidade de colisões. Conforme discutido no Capítulo 2, a cada interação entre as partículas, há troca de momento linear, e pode haver mudança de fase da partícula incidente em relação ao campo externo. Portanto, entre as sucessivas colisões entre as partículas, o campo elétrico externo, apesar de ser AC (característica fundamental para a produção da descarga DBD) é “enxergado” e produz os efeitos sobre as partículas constituintes do plasma como se fosse um campo estacionário. Sendo a inserção de energia no sistema seletiva para os elétrons, espera-se que os íons e as partículas neutras apresentem distribuição equitativa de energia.

No tocante aos processos de difusão do plasma até as amostras biológicas, há duas regiões distintas, dominadas por regimes diferentes, representadas na Figura 5.5. Na área 1, região de produção do plasma, onde ocorre o “chuveiro” intermitente de microdescargas com elétrons de altas energias, conforme descrito no Capítulo 3, a função distribuição de energia dessas partículas muda constantemente. Por ser um estado transiente, os íons não ganham energia significativamente. A baixa frequência de oscilação e a intensidade do campo elétrico externo são os principais responsáveis pela dispersão das microdescargas no espaço entre os eletrodos. Na área 2, “fora” da região da descarga, predominam os fenômenos difusivos, onde o campo ambipolar exerce importante papel no transporte das espécies reativas até as amostras biológicas fixadas na placa de Petri, a qual adquire potencial flutuante.

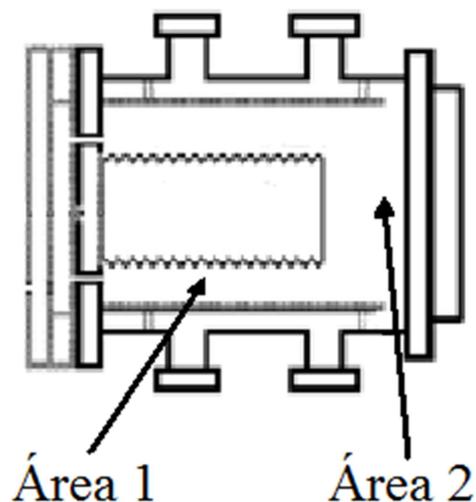


Figura 5.5 – Indicação das áreas onde há regimes distintos de difusão de plasma no sistema.

### 5.3 – DA VALIDAÇÃO MICROBIOLÓGICA

Os valores das contagens de esporos viáveis para cada tempo de exposição estão representados na Tabela 5.1 abaixo:

	Tempo de exposição ao plasma (minutos)					
	2	5	10	15	20	40
<b>Ampola 1</b>	64000	15000	7500	3000	900	-
<b>Ampola 2</b>	61000	13000	6200	2900	700	-
<b>Ampola 3</b>	57000	11000	5500	2600	800	-
<b>Ampola 4</b>	66000	17000	6300	3200	1100	-
<b>Ampola 5</b>	72000	20000	8200	3800	1200	-
<b>Média</b>	<b>64000</b>	<b>15200</b>	<b>6740</b>	<b>3100</b>	<b>940</b>	<b>-</b>

Tabela 5.1 – Valores obtidos na contagem de esporos viáveis para cada tempo de exposição ao plasma. Cada ampola contendo esporos originou um lote de seis amostras. Foram utilizadas cinco ampolas no experimento.

Nota-se que há flutuações da quantidade de esporos viáveis de até 30% do valor médio. Para a análise desse resultado, a Fig. 5.6 apresenta a umidade relativa do ar durante o mês de março de 2009, quando essa etapa do trabalho foi realizada.

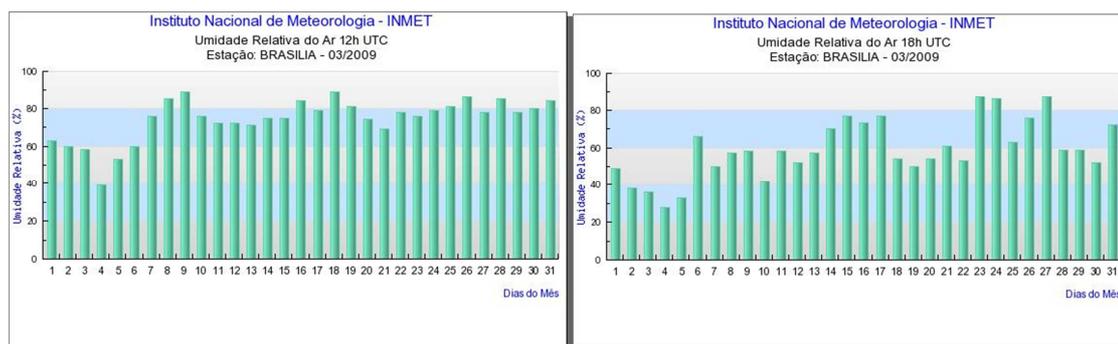


Figura 5.6 – Medidas de umidade relativa do ar às 9h (12h UTC) e às 15h (18h UTC) em Brasília nos mês de março de 2009, período em que foi realizada a validação microbiológica do experimento. Fonte: INMET/MAPA.

A umidade relativa do ar, por definição, é a razão entre a quantidade de água existente no ar (umidade absoluta) e a quantidade máxima que poderia haver à mesma temperatura (ponto de saturação). Como o ponto de saturação do vapor d'água depende da temperatura do ar, conclui-se que a umidade relativa do ar também depende dessa grandeza. Sabendo que a temperatura no Laboratório de Plasmas da UnB é controlada por meio de sistema de climatização, a umidade relativa do ar indiretamente representa a quantidade de vapor d'água presente no ar que foi utilizado na produção do plasma. A Fig. 5.6 mostra que a umidade relativa do ar em Brasília variou significativamente ao longo dia no período da validação microbiológica da esterilização. Considerando que as amostras foram tratadas em diferentes horários, e que os demais parâmetros da descarga foram reprodutíveis, pode-se concluir que em horários de umidade relativa mais alta, é maior a probabilidade de produção de espécies reativas de oxigênio derivadas da molécula de água, como a hidroxila, aumentando a capacidade biocida do plasma, conforme amplamente descrito na literatura [38-41, 52-62]. Consequentemente, a contagem de esporos viáveis deverá ser inversamente proporcional ao valor da umidade relativa do ar utilizado na produção do plasma, para um mesmo tempo de exposição.

A Fig. 5.7 é o gráfico da contagem de esporos viáveis versus o tempo de exposição ao plasma. Cada ponto no gráfico é a média dos cinco valores apresentados na Tabela 5.1.

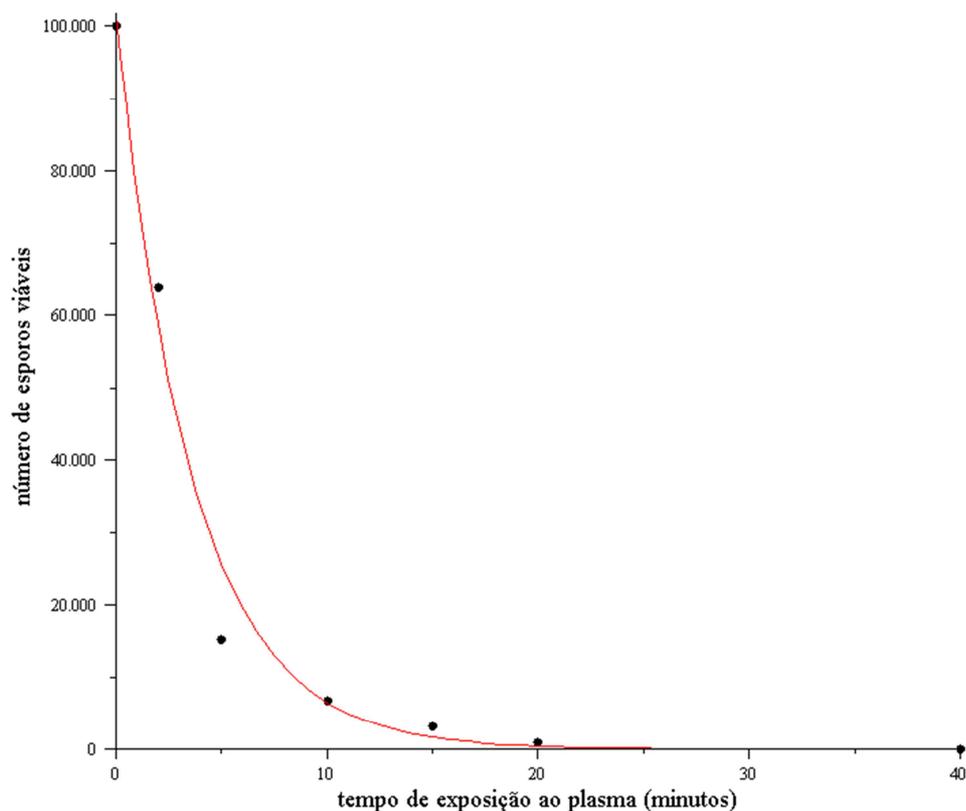


Figura 5.7 – Representação gráfica dos valores obtidos na contagem dos esporos viáveis *versus* tempo de exposição ao plasma. A linha sólida é a curva de ajuste do tipo

$$y = a + b \cdot \exp(c \cdot t).$$

Nota-se que o padrão de morte microbiana representado no gráfico é muito próximo de um decaimento exponencial, o que está de acordo com o relatado na literatura para amostras puras fixadas sobre material dielétrico e sem meio de cultura [38-41, 49]. O valor de redução decimal (valor-D) obtido a partir do ajuste dos dados experimentais foi de 8,40 minutos [77]. É um tempo relativamente maior que os relatados por outros pesquisadores [38-41]; no entanto, há de se analisar as características da fonte de plasma utilizada neste trabalho. Além de a potência aplicada ter sido bem menor que as utilizadas em outros experimentos, o circuito de alimentação AC aqui utilizado opera a 60 Hz, ao invés das fontes de alta frequência, da ordem de kHz, utilizadas em outros trabalhos. Sabe-se que a taxa de

energia depositada em uma descarga AC é diretamente proporcional à frequência da fonte de alimentação [78]. Assumindo que aproximadamente a mesma densidade de energia é necessária para a inativação microbiana, conclui-se que o tempo demandado para a esterilização é inversamente proporcional à frequência da fonte de alimentação.

Além disso, outro fator relevante que pode ter contribuído para um valor-D alto é o posicionamento das amostras biológicas no dispositivo [39]. Diversos autores que trabalham com descargas de barreira dielétrica relatam posicionar as placas de Petri inoculadas como a camada dielétrica sobre o eletrodo, o que faz com que a amostra biológica fique literalmente dentro da descarga. Neste experimento, a placa de Petri está ao lado dos eletrodos (exposição remota dos microrganismos ao plasma), e o processo de esterilização depende de fenômenos como a difusão ambipolar para acontecer. Consequentemente, é necessário um tempo maior de interação entre o plasma e as amostras biológicas para inativar os microrganismos. Não obstante, foi observada a eliminação de todos os esporos viáveis após 40 minutos de exposição ao plasma [77].

## CAPÍTULO 6 - CONCLUSÃO

Apesar da variedade de tecnologias disponíveis aos serviços de saúde para o processamento dos produtos para a saúde, as especificidades de cada instrumental são determinantes na escolha do método mais indicado. Atualmente, o desafio da área tecnológica é desenvolver métodos eficazes para o processamento de materiais que não podem ser submetidos a grandes estresses físicos, como temperatura e pressão. Nesse sentido, a esterilização por plasma a baixas temperaturas é uma tecnologia que chama muito a atenção pela rapidez, segurança e efetividade.

O Laboratório de Plasmas da Universidade de Brasília desenvolve fontes de plasma para estudos de eliminação de gases poluentes. Neste trabalho, montou-se uma dessas fontes, concebida para operar a baixas pressões e cuja descarga (do tipo corona DC) acontece entre dois eletrodos metálicos, cilíndricos e coaxiais. Ao se aplicar as tensões AC previstas para operação da fonte a pressão atmosférica (16,3 kV a 60 Hz), verificou-se a formação de descargas transientes do tipo centelhamento, indesejadas para o propósito deste experimento. Então, visando a aumentar a rigidez dielétrica do meio e a proteger o circuito de alimentação, adicionou-se ao eletrodo externo uma camada de vidro pirex. Após vários testes, concluiu-se que essa modificação, além de permitir o alcance de tensões mais elevadas entre os eletrodos, alterou as características da descarga, tornando-a difusa e estável, comportamento típico das descargas do tipo barreira dielétrica (DBD). Outra característica desse tipo de descarga são as baixas correntes elétricas, da ordem de miliampères. Por esse motivo, a potência média obtida no sistema foi de 14,6W.

Na validação microbiológica, foram utilizados esporos de *G. stearothermophilus*, considerados os mais resistentes ao processo de esterilização por plasma. Como se desejava verificar a cinética da morte microbiana, e não apenas se a fonte de plasma era capaz de inativar os microrganismos, optou-se por expor amostras biológicas com, pelo menos,  $10^5$  esporos viáveis cada por 2, 5, 10, 15, 20 e 40 minutos. Verificou-se, ao representar os resultados em um gráfico contagem de esporos viáveis *versus* tempo de exposição ao plasma, que a disposição dos pontos foi muito próxima de um decaimento exponencial. A literatura científica relata que a cinética de morte microbiana depende do tipo de microrganismo utilizado, do tipo de suporte onde os microrganismos estão fixados e do tipo de exposição: se os microrganismos estão dentro da descarga ou se a exposição é remota. Os resultados aqui obtidos vão ao encontro dos obtidos por autores que trabalharam com descargas e microrganismos semelhantes, a saber: esporos de *G. stearothermophilus* fixados diretamente sobre placa de Petri sem meio de cultura, e exposição remota ao plasma. O valor de redução decimal dos esporos viáveis, ou valor-D obtido foi de 8,40 minutos.

Para o tratamento das amostras, referências nacionais e internacionais subsidiaram a escolha do meio de cultura mais adequado para o crescimento dos esporos de *G. stearothermophilus*. Foram realizados testes para se avaliar o crescimento dos microrganismos e compatibilizar a temperatura de incubação desses esporos com a temperatura de fusão do meio escolhido (Tryptona Glicose Extrato de Levedura). Além disso, para o manejo das amostras pós-exposição ao plasma, foi ajustado o fator de diluição da suspensão de esporos e o tempo de exposição ao plasma, uma vez que, quanto maior o tempo de exposição, menor a quantidade de esporos viáveis. Para as amostras expostas por 2 e 5 minutos, utilizou-se fator de diluição  $10^{-3}$ , ao passo que para as amostras expostas por 10, 15 e 20 minutos, utilizou-se fator de diluição  $10^{-2}$ . Para as amostras expostas por 40 minutos, como

havia a hipótese da inexistência de esporos viáveis, não se realizou qualquer diluição, e o meio de cultura foi adicionado diretamente na placa exposta ao plasma. De fato, comprovou-se a esterilização para esse tempo de exposição.

Não obstante os parâmetros da descarga serem todos reprodutíveis, houve variações de até 30% na contagem de células viáveis, para cada tempo de exposição ao plasma. Associou-se este fato à variação da umidade relativa do ar no período em que o experimento foi realizado. Sabendo que os parâmetros que alteram a pressão de saturação do vapor d'água estavam controlados, as mudanças da umidade relativa do ar ocasionaram diferentes concentrações de espécies reativas oriundas da dissociação da molécula de água no plasma, como a hidroxila e alguns óxidos, alterando, assim, a capacidade biocida do plasma.

## 6.1 – PERSPECTIVAS FUTURAS

Apesar de significativos, os resultados aqui obtidos são os primeiros do Laboratório de Plasmas da Universidade de Brasília na área de aplicações tecnológicas de plasmas na área da saúde. Há uma extensa lista de estudos que podem ser realizados nessa fonte de plasma, a fim de se aperfeiçoar o processo de esterilização aqui comprovado: a caracterização do plasma e da descarga, por meio da obtenção da figura de Lissajous, por exemplo; estudos de espectrometria de massa e de espectroscopia óptica, com o intuito de se identificar quais em qual quantidade as espécies reativas estão presentes no plasma; um estudo controlado da influencia da umidade relativa do ar na eficácia do processo; o estudo de outras geometrias e condições de descarga, confinamento magnético e a suas influências sobre a capacidade biocida do plasma.

Além desses, a validação de uma tecnologia dessa natureza carece de estudos multidisciplinares, como a compatibilidade com embalagens para materiais estéreis; estudo da funcionalidade dos produtos para a saúde pós-exposição ao processo e estudos de custo-efetividade, por exemplo.

Finalmente, esse sistema é um experimento riquíssimo para o estudo de fenômenos fundamentais da física de plasmas, como oscilações, propagação de ondas, difusão e transporte de partículas em plasmas atmosféricos.

## REFERÊNCIAS

- [1] J. F. Possari, *Esterilização por plasma de Peróxido de Hidrogênio*. 1st. Ed. São Paulo, Brasil: Iátria, 2005.
- [2] Brasil. Ministério da Saúde. Orientações gerais para Central de Esterilização. Brasília: Ministério da Saúde, 2001.
- [3] Center for Disease Control, W. A. Rutala (org.). *Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities* (2008 ed.) [Online]. Available: <http://www.cdc.gov/>. 2008.
- [4] Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Relatório descrito de investigação de casos de infecções por micobactérias não tuberculosas de crescimento rápido (MCR) no Brasil no período de 1998 a 2009*. [Online]. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/>. Fev. 2011.
- [5] Brasil. Comissão Nacional de Energia Nuclear. Radiações ionizantes e a vida. Rio de Janeiro: Comissão Nacional de Energia Nuclear, 2006.
- [6] Brasil. Comissão Nacional de Energia Nuclear. Resolução CNEN nº112 – Dispõe sobre o licenciamento de instalações radiativas que utilizam fontes seladas, fontes não-seladas, equipamentos geradores de radiação ionizante e instalações radiativas para produção de radioisótopos. Brasília: Diário Oficial da União, Imprensa Nacional, 2011.
- [7] Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada nº. 91 – Proíbe o uso isolado de produtos que contenham paraformaldeído ou formaldeído, para desinfecção e esterilização, regulamenta o uso de produtos que contenham tais substâncias em equipamentos de esterilização e dá outras providências. Brasília: Diário Oficial da União, Imprensa Nacional, 2008.
- [8] M. Moisan. “Plasma sterilization. Methods and mechanisms”. *Pure Appl. Chem.*, Vol. 74, No. 3, pp. 349-358. 2002.
- [9] W. P. Menashi, “Treatment of surfaces” U.S. Patent 3 383 163, May, 14, 1968.
- [10] R. E. Peebles *et al.* “Microwave coupled plasma sterilization and depyrogenation II. Mechanisms of action”. *J. Parenter. Sci. Technol.* 39, 9–14. 1985.
- [11] Ashman, L.E., Menashi, W.P. Treatment of surfaces with low pressure plasmas. US Patent 3 701 628, 1972.
- [12] Boucher (Gut), R.M. Seeded gas plasma sterilization method. US Patent 4 207 286. 1980.
- [13] Bithell, R.M. Package and sterilizing process for same. US Patent 4 321 232. 1982.
- [14] Boucher (Gut), R.M. “State of the art in gas plasma sterilization”. *Med. Device Diagnost. Indust.* Vol. 7, 51–56. 1985.
- [15] Jacobs, P.T., Lin, S.M. Hydrogen peroxide plasma sterilization system. US Patent 4 643 876. 1987.

- [16] M. C. Krebs *et al.* “Gas–plasma sterilization: relative efficacy of the hydrogen peroxide phase compared with that of the plasma phase”. *Int. J. Pharm.* Vol. 160 pp. 75-81. 1998.
- [17] Cariou-Travers, S., Darbord, J.C. “Validation biologique de sterilisation plasma: cas du Sterrad®”. *Le Vide: Sci. Tech. Applic.* 299, 34–46. 2001.
- [18] Chen, Francis F. *Introduction to plasma physics and controlled fusion*. 2. ed. New York: Plenum, 1985. 2 v.
- [19] Bittencourt, J. A. *Fundamentals of plasma physics*. 3. ed. Springer-Verlag, New York, 2004.
- [20] Y. P. Raizer. *Gas discharge physics*. 1st. Ed. New York, NY: Springer-Verlag, 1991.
- [21] M. A. Lieberman *et al.* *Principles of Plasma Discharges and Materials Processing*. 2<sup>nd</sup> Ed. Wiley-Interscience, EUA. 2005.
- [22] F. Reif. *Fundamentals of Statistical and Thermal Physics*. 1<sup>st</sup> Ed. McGraw Hill. 1965
- [23] H. Goldstein. *Classical Mechanics*. 3<sup>rd</sup> Ed. Addison-Wesley. 2001.
- [24] R.C. Weast *et. al.* *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 64th ed., CRC Press Inc., Boca Raton Florida, 1983–1984.
- [25] F. Paschen, *Weid. Annalen der Physik*. Vol. 37 p. 69. 1889.
- [26] J. Lux, “Paschen’s Law”. Disponível online em: <http://home.earthlink.net/~jimlux/hv/paschen.htm>.
- [27] H.S. Uhm *et. al.* “Electrical Breakdown Voltage In a Mixed Gas”. *Jap.J.Appl.Phys.* Vol. 40 p.295, 2001.
- [28] G. Bingang, *et. al.* “Breakdown Voltage Research of Penning Gas Mixture in Plasma Display Panel”. *Plasma Sci.&Technol.* Vol. 7 p. 3127, 2005.
- [29] M.A. Herlin, *et al.* “Breakdown of a Gas at Microwave Frequencies”. *Phys. Rev.* Vol. 74, p. 291, 1948.
- [30] S.C. Brown. “Microwave gas discharge breakdown”. *Appl. Sci. Res. Section B* Vol. 5 pp.97-108, 1955.
- [31] J. Park, *et. al.* “Gas breakdown in an atmospheric pressure radio-frequency capacitive plasma source”. *J. Appl. Phys.* Vol. 89, p.15, 2001
- [32] S. Nijdam. *Experimental investigations on the physics of streamers*. 1st. ed. Eindhoven University of Technology Print Service. 2011.
- [33] L. Bardós *et. al.* “Cold atmospheric plasmas: Sources, processes and applications”. *Thin Solid Films*. Vol. 518, pp. 6705-6713, 2010.
- 
- [34] M. Laroussi, “Nonthermal decontamination of biological media by atmospheric-pressure

- plasmas: review, analysis, and prospects” *IEEE Trans. Plasma Sci.*, vol. 30, pp. 1409-1415, 2002.
- [35] M. Moisan et al, “Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms” *Int. J. Pharm.* Vol. 226 pp. 1–21. 2001.
- [36] U. Kogelschatz, “Filamentary, patterned and diffuse barrier discharges,” *IEEE Trans. Plasma Sci.*, vol. 30, no. 4, pp. 1400–1408, Aug. 2002.
- [37] L. Gaunt *et al.* “Bactericidal Action of the Reactive Species Produced by Gas-Discharge Nonthermal Plasma at Atmospheric Pressure: A Review” *IEEE Trans. Plasma Sci.* vol. 34, no.4, pp. 1257-1269, Aug. 2006.
- [38] S. Lerouge *et al.* “Plasma Sterilization: A Review of Parameters, Mechanisms, and Limitations” *Plasmas and Polymers*, vol. 6, no. 3, pp. 175-188, Sep. 2001.
- [39] M. Laroussi *et al.*, “Biological Decontamination by Nonthermal Plasmas” *IEEE Trans. Plasma Sci.* Vol. 28 no. 1, Feb. 2000.
- [40] K. G. Kostov *et al.*, “Bacterial sterilization by a dielectric barrier discharge (DBD) in air” *Surf. Coat. Tech.* 204, pp. 2954-2959, 2010.
- [41] M. Korachi *et. al.* “An investigation into the biocidal effect of high voltage AC/DC atmospheric corona discharges on bacteria, yeasts, fungi and algae” *J. Electrostat.* Vol. 67, pp. 678-685, 2009.
- [42] M.M. Kekez, *et.al.* “Spark channel formation”, *J.Phys.D:Appl.Phys* Vol. 3 p. 1886, 1970.
- [43] M.R. Wertheimer, *et. al.*, *Proc. 12th Int. Symp. On Electrets., ISE-12*, September 2005, p. 231, <http://ieeexplore.ieee.org/>, digital object identifier: 10.1109/ISE.2005.1612363.
- [44] J. Ráhel, *et. al.* “The transition from a filamentary dielectric barrier discharge to a diffuse barrier discharge in air at atmospheric pressure”. *J.Phys.D:Appl.Phys.* Vol. 38, p. 547, 2005.
- [45] Q. Wang, *et. al.*, “Experimental and theoretical study of the effect of gas flow on gas temperature in an atmospheric pressure microplasma”. *J. Phys. D: Appl. Phys.* Vol. 40, p. 4202, 2007.
- [46] Q. Li, *et. al.* “Effects of gas flow rate on the length of atmospheric pressure nonequilibrium plasma jets”, *Appl.Phys.Lett.* Vol. 95, p. 1-3, 2009.
- [47] S. Kanazawa, *et. al.*. “Stable glow plasma at atmospheric pressure”. *J.Phys.D:Appl.Phys.* Vol. 21, p. 838, 1988.
- [48] S. Okazaki, *et. al.* “Appearance of stable glow discharge in air, argon, oxygen and nitrogen at atmospheric pressure using a 50 Hz source”, *J.Phys.D:Appl.Phys.* Vol. 26, p. 889, 1993.
- [49] A. D. Russel, *et al.* *Russell, Hugo & Ayliffe's Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization.* 4th Ed., Malden, MA: Blackwell, 2004.

- [50] S. S. Block, "Sterilization," in *Encyclopedia of Microbiology*. New York: Academic, 1992, vol. 4, pp. 87–103.
- [51] T. N. Nazina, et al.. "Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. th.*". *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 433-446. 2001.
- [52] K. Ban. "Antibacterial effect of Oxygen/Nitrogen Radicals and UV-radiation in Microwave-excited plasmas". *Taipei: IEEE International Conference on Systems, Man, and Cybernetics*. pp. 1431-1436. IEEE, 2006.
- 
- [53] Y. Ma *et al.*, "Chemical Mechanisms of Bacterial Inactivation Using Dielectric Barrier Discharge Plasma in Atmospheric Air" *IEEE Trans. Plasma Sci.* Vol. 36, pp. 1615-1620, 2008.
- [54] X.M. Shi *et al.*, "Research on the Inactivation Effect of Low-Temperature Plasma on *Candida Albicans*" *IEEE Trans. Plasma Sci.* Vol. 36, pp. 498-503, 2008.
- [55] S. G. Joshi *et al.* "Control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in planktonic form and biofilms: A biocidal efficacy study of nonthermal dielectric-barrier discharge plasma" *Am. J. Infect. Control*, vol. 38, pp. 293-301, 2010.
- [56] M. K. Boudam *et al.* "Bacterial spore inactivation by atmospheric-pressure plasmas in the presence or absence of UV photons as obtained with the same gas mixture" *J. Phys. D: Appl. Phys.* vol.39, pp. 3494–3507, 2006.
- [57] S. M. L. Vasconcelos *et al.* "Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação". *Quím. Nova*, Vol. 30, No. 5, 1323-1338, 2007.
- [58] F. Schafer *et al.* "Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/ glutathione couple". *Free Radical Biol. Med.* Vol. 30, n<sup>o</sup>. 11, pp. 1191-1212. 2001.
- [59] T. Finkel *et al.* "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing". *Nature*. Vol. 408 pp. 239-247. 2000
- [60] H. Wiseman. "Dietary influences on membrane function: Importance in protection against oxidative damage and disease". *J. Nutr. Biochem.* Vol. 7, n<sup>o</sup>. 1, pp. 2-15. 1996.
- [61] A. L. B. S. Barreiros *et al.* "Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo". *Quím. Nova*. Vol. 29, n<sup>o</sup>. 1, pp. 113-123. 2006.
- [62] G. J. Tortora *et al.* *Microbiology: an introduction*. 7th ed. San Francisco: Benjamin/Cummings, 2001.
- [63] K. M. F. P. Monteiro. *Estudo experimental da eliminação de gases poluentes em um reator a plasmas por descarga corona*. Brasília. 105 F. Dissertação (mestrado) - Universidade de Brasília. 1999.
- [64] J. H. C. Souza; J. L. Ferreira. "Development and Characterization of a plasma source for sterilization procedures at atmospheric pressure". *Anais do Nuclear and Plasma Sciences Society 36<sup>th</sup> International Conference on Plasma Science (ICOPS) and 23<sup>rd</sup> Symposium on*

*Fusion Engineering (SOFE)*. IEEE, EUA. 2009.

- [65] Higashi, M.; Suzuki, N. e Fujii, K. “Soot Elimination and NO<sub>x</sub> and SO<sub>x</sub> Reduction in Diesel Engine Exhaust by a Combination of Discharge Plasma and Oil Dynamics”. *IEEE Trans. Plasma Sci.*, vol. 20, n<sup>o</sup> 1, pág. 01, 1992.
- [66] C. Tender *et al.* “Atmospheric plasmas: a review” *Spectrochim. Acta B*, vol. 61, pp. 2-30, 2006.
- [67] J. L. Ferreira *et al.* “Magnetic Field Enhanced Plasma Reactor for Pollutant Gases Control by Corona Discharge”. *Combust. Sci. Technol.*, v.140, n.1, p.1 - 11, 1998.
- [68] D. J. Griffiths. *Introduction to Electrodynamics*, 3<sup>rd</sup> Ed. Addison Wesley. New York 1998
- [69] São Paulo (estado). Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Norma Técnica P2.111. *Avaliação da eficiência de sistemas de tratamento térmico sem combustão de resíduos contaminados biologicamente através do teste com bioindicadores Bacillus atropheus e Geobacillus stearothermophilus*. Junho, 2007.
- [70] A. B. Vermelho *et al.* *Práticas de Microbiologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
- [71] Environment Agency (2007). *The Microbiology of Drinking Water (2007) - Part 7 - Methods for the enumeration of heterotrophic bacteria* (2007 ed.) [Online]. Available: <http://www.environment-agency.gov.uk>.
- [72] W. Lochte-Holtgreven (editor) *Plasma diagnostics*. North Holland Publishing company, 1968.
- [73] S.G. Jennings. “The mean free path in air”. *J. Aerosol Sci.*, Vol, 19, No. 2, pp. 159-166, 1988.
- [74] Y. Itikawa *et. al.* “Cross sections for electron collisions with water molecules”. *J. Phys. Chem. Ref. Data*. Vol. 34, no. 1, pp. 1-22, 2005.
- [75] Y. Itikawa. “Cross sections for electron collisions with nitrogen molecules”. *J. Phys. Chem. Ref. Data*. Vol. 35, no. 1, pp. 31-53, 2006.
- [76] Y. Itikawa *et. al.* “Cross sections for collisions of electrons and photons with oxygen molecules”. *J. Phys. Chem. Ref. Data*. Vol. 18, no. 1, pp. 23-42, 1989.
- [77] J. H. C. Souza; J. L. Ferreira. “G. *stearothermophilus* spores` inactivation by a single dielectric barrier discharge in air at atmospheric pressure”. *IEEE Trans. Plasma Sci.* Vol. 40, n<sup>o</sup>. 12. 2012.
- [78] S. C. Bushong. *Ciência Radiológica Para Tecnólogos*. 9<sup>a</sup> Ed.. Elsevier. São Paulo 2010.

## ANEXO A:

Artigo:

J. H. C. Souza; J. L. Ferreira. “*G. stearothermophilus* spores` inactivation by a single dielectric barrier discharge in air at atmospheric pressure”. *IEEE Trans. Plasma Sci.* Vol. 40, n<sup>o</sup>. 12. 2012.

## ***G. stearothermophilus* Spores` Inactivation by a Single Dielectric Barrier Discharge in Air at Atmospheric Pressure**

João Henrique Campos de Souza and José Leonardo Ferreira

**Abstract** – In this work, we present some results of a plasma source developed at the Plasma Laboratory of the University of Brasilia for sterilization studies at atmospheric pressure. This source was primarily conceived to produce a corona-type discharge to be used on pollutant control experiments. We used ordinary air as the precursor gas. Our apparatus consists of two coaxial cylindrical tubes with different radii connected to a high voltage power source. We used *G. stearothermophilus* spores as the biological indicators. We counted the viable spores after the exposure to the plasma with the pour plate technique. Finally, we studied the biocide mechanisms of the plasma and related the inactivation of the microorganisms to plasma induced chemical and physical processes.

**Index Terms** – Bacteria, plasma, sterilization.

### **I. INTRODUCTION**

Sterilization refers to any process that effectively kills or eliminates transmissible agents (such as fungi, bacteria, viruses, prions, spore forms, etc.) from a surface, equipment, foods, medications, or biological culture media [1, 2]. In general, surgical instruments and medications that enter an already sterile part of the body (such as the blood, or beneath the skin) must have a high sterility assurance level (SAL) [2]. In order to reach this SAL, several sterilization agents have been applied: heat, steam under pressure, radiation, electron beam, and chemical products. However, none of the sterilization methods available has a universal application, and the choice of the ideal technique depends on the physical and chemical properties of the materials that are going to be sterilized. The use of non-thermal plasmas on sterilization has been recognized as a successful technology for it congregates safety, effectiveness and quickness [1, 2].

Since the first patented prototype for plasma sterilization [3], various plasma production techniques and sources have been tested, from low pressure microwave discharges to atmospheric pressure corona and dielectric barrier discharges [4-8]. In this work, we assembled a single dielectric barrier discharge (SDBD) to function at atmospheric pressure, using ordinary air as the precursor gas.

The dielectric barrier discharge (DBD) is a non-equilibrium plasma source that can be operated with different gases at elevated pressures. The plasma is created between two conductive electrodes connected to an AC or pulsed power supply. At least one of DBD electrodes is covered by a dielectric layer, which prevents the arc formation. Despite the high breakdown voltage in gases at atmospheric pressure (several kV), the average electric current is low. During the DBD treatment the photons, electrons, ions and active chemical species from the plasma reach the surface of a biologically contaminated object and can eventually lead to its sterilization, as widely described [4, 9-11]

In order to ensure the sterilization procedure, standardized samples of specially chosen spores are used as biological indicators. The choice of spore-forming microorganisms is based on several criteria: resistance to the kind of process used, absence of pathogenicity and ease of culture. They are characterized by the species, the reference of the reference culture collection origin, the number of viable spores and the decimal reduction time (D-value) [12]. Since 1999, *B. stearothermophilus* spores have been recognized as one of the standard biological indicators for plasma sterilization [12]. The D-value (decimal reduction time (DRT)) is

defined as the time in minutes at a particular constant temperature to reduce the viable population to 10% of the initial value, or by 90%. In general, the kinetics of the inactivation of a microbial population by a biocide presents an exponential decay pattern, although the rate of biocide-induced inactivation of a microorganism depends on the type and quantity of the microorganisms, also called the bioburden, the temperature of the exposure, the presence of organic matter, among other factors [1, 12, 13].

## II. EXPERIMENTAL PROCEDURES

The plasma source used in the present work was primarily conceived for pollutant elimination studies [14]. Our discharge occurs between two coaxial cylindrical electrodes. The outer one was grounded, and was projected to fit the Petri dishes with the biological indicators. The inner electrode has several pyramidal spikes, to produce a highly non-uniform electric field, which favors the production of the discharge [15].

Our apparatus works at atmospheric pressure with ordinary air, and due to the high voltage necessary to produce the discharge in this experiment, few adaptations were required to avoid arcing and other undesired phenomena. We coated the outer electrode with *Pyrex* glass and worked with AC voltages below 18kV, the dielectric breakdown voltage measured for the ordinary air in our laboratory at atmospheric pressure and the 8mm-distance between the electrodes. The power supply device consists of an AC VARIAC voltage regulator connected to a high voltage neon lamp transformer, which outputs 60Hz AC voltages up to 16.5kV, approximately. Fig. 1 shows the schematics of the device, and Fig. 2 shows the inner and the outer electrodes.

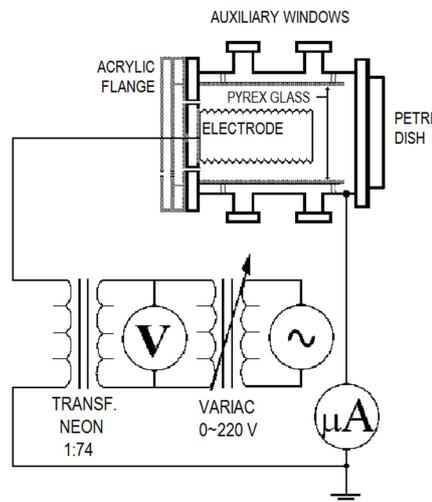


Fig. 1 – Schematics the plasma source and power circuit used in the experiment.

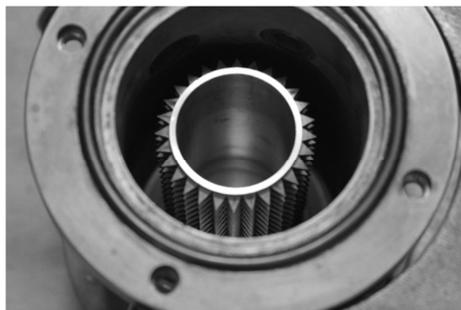


Fig. 2 – Picture of the basis of the plasma source. We see the outer and the inner electrodes, the Pyrex glass, and the slot where the Petri dishes were positioned during the biological validation of the plasma sterilization.

Inside the air plasma discharge, there are many known biocide agents, like reactive oxygen species (ROS), ultraviolet (UV) radiation, energetic ions and charged particles. Among the ROS are included ozone, atomic oxygen, superoxides, peroxides, and hydroxyl radicals [5, 8, 10]. In atmospheric pressure plasmas, because of the high particle density, most of the UV radiation is reabsorbed in the plasma volume, and does not reach the desired surface sufficiently. Studies have shown that the kinetics of the microbial inactivation during atmospheric plasmas exposure is not directly related to the UV radiation [5, 8, 10].

On the other hand, lethal damage to the cell membranes' structures caused by electrostatic disruption and oxidation of the membrane components are reported [10, 12]. In the first mechanism, the accumulation of electric charge on the surface of the microorganisms leads to electrostatic forces that exceed the tensile force of the membrane. In the second case, oxidation and damage of membrane or cellular components are caused by the energetic particles generated in the discharge. Free radicals are produced in plasma and diffuse to the cell surface, often inducing the production of secondary radicals. Various authors reported that ROS have profoundly damaging effects on cells through reactions with various biomacromolecules [10, 12].

Our plasma processing protocol included exposures of the biological samples for 2, 5, 10, 15, 20 and 40 minutes. We used *G. stearothermophilus* (ATCC 12977) spores as the biological indicators. We seeded the spores on Petri dishes and ensured, at least,  $10^5$  CFU on each dish. After drying for 30 minutes inside a Laminar Airflow Cabinet at  $37^\circ\text{C}$ , the samples were exposed to the plasma. After the treatment, we applied the pour plate technique to count the viable cells [13]. The Petri dishes were filled with nutrient solid agar and incubated upside down at  $46^\circ\text{C}$  for 72 hours. For each exposure time, we treated five inoculated Petri dishes.

### III. RESULTS AND DISCUSSION

The average power of our device was of 14.6W, since the measured electric currents were of few miliAmpères. This important characteristic led to macroscopic temperatures below  $50^\circ\text{C}$ , for the apparatus and the ambience were enough to disperse the heat produced by the discharge. This is a basic feature of the plasma discharge to qualify it to compatibility studies of the technology with materials that cannot tolerate high temperatures, such as the majority of plastic materials and catheters, for instance [1,2,12].

The Fig. 3 shows the viable spores counting versus the exposure time to the plasma. The values presented on the graph are the average number of viable spores counted on the inoculated Petri dishes exposed for each exposure time. We clearly notice an exponential-type curve. We obtained a D-value of 8.40 minutes. Such long time appeared because of the low power of our device, which entails a low ionization fraction of the particles [11, 15]. Consequently, a longer interaction time between the plasma and the biological samples is necessary to inactivate the microorganisms. Besides that, another relevant factor that may have raised our D-value is the position of our inoculated Petri dishes in our apparatus. Some authors that have worked with dielectric barrier discharges used the Petri dish as the dielectric layer over the electrode, and hence, the biological sample was inside the discharge [4, 16]. In our experiment, as shown on Fig. 1, the Petri dish lies beside the electrodes. Notwithstanding, we observed the elimination of all viable spores after a 40-minute exposure to the plasma.

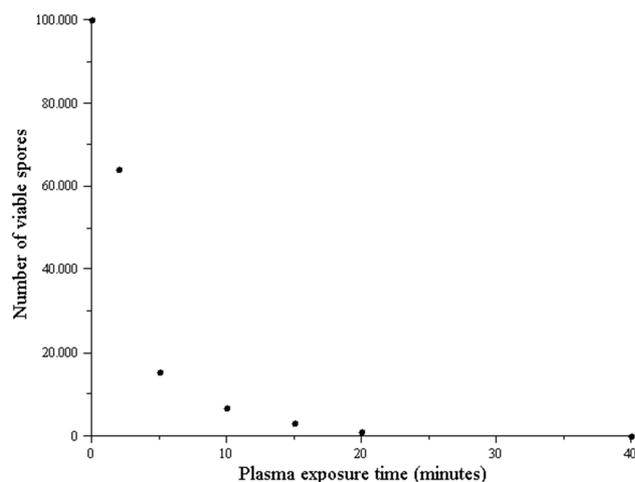


Fig. 3 – Viable spores counting versus plasma exposure time. Each point represented on the graph is the mean value of the viable spores counted for five inoculated Petri dishes. We obtained a D-value of 8.40 minutes.

Several authors that work with plasma discharges at atmospheric pressure report shorter times to sterilize the biological samples, when compared to the results obtained in the present work [4, 16-18]. It has to be considered that in this work we used a 60Hz power supply instead of power source operated in the kHz range, as employed by most authors. Considering that approximately the same energy density is required for microbial inactivation, at different treatment frequencies then, the sterilization time should be inversely proportional to the source frequency. Therefore, for low frequency power sources, bacterial inactivation times in order of several minutes should be expected [4].

It is now widely accepted that in case of atmospheric pressure air plasma in DBD the contribution of the heat and the UV radiation for the bacterial killing is not fundamental, and plasma induced physical and chemical processes perform the sterilization [18, 19]. Since the voltage applied in our experiment is high (16.5 kV), the kinetic energy of the positive and negative ions may become high enough to produce some structural damage on the spores' cell walls and membranes. Furthermore, the accumulation of electric charge on the cells' membranes induces electrostatic stress, which can eventually rupture them [1, 4, 8]. Besides the etching processes related to the bombardment of energetic particles over the microorganisms, air plasmas are also excellent sources of reactive oxygen and nitrogen species such as ionized oxygen, ozone, hydroxyl group, NO, NO<sub>2</sub>, among others. When these reactive atoms and molecules enter the metabolic cycle of the microorganisms, they can cause metabolic chain reactions that culminate in apoptosis [18].

#### IV. CONCLUSION

In this work, we presented the use of a single dielectric barrier discharge in bacterial spores' inactivation. We showed that our apparatus sterilized *G. stearothermophilus* spores within 40 minutes, and that the mortality of these biological samples followed an exponential-type pattern. The decimal reduction time obtained was 8.40 minutes. We associate this long time with the low power applied and to the positioning of the biological samples in our device. We also noticed that the macroscopic temperature did not overcome 50°C, which means that this technology may be suitable for sterilization of materials that cannot tolerate high temperatures. Finally, we associate the inactivation of the microorganisms to plasma-induced physical and chemical processes.

## REFERENCES

- [1] W. A. Rutala, (2008). *Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities* (2008 ed.) [Online]. Available: <http://www.cdc.gov/>
- [2] J. F. Possari, *Esterilização por plasma de Peróxido de Hidrogênio*. 1st. Ed. São Paulo, Brazil: Iátria, 2005.
- [3] W. P. Menashi, "Treatment of surfaces" U.S. Patent 3 383 163, May, 14, 1968.
- [4] K. G. Kostov *et al.*, "Bacterial sterilization by a dielectric barrier discharge (DBD) in air" *Surf. Coat. Tech.* 204, pp. 2954-2959, 2010.
- [5] M. Laroussi *et al.*, "Biological Decontamination by Nonthermal Plasmas" *IEEE Trans. Plasma Sci.* Vol. 28 no. 1, Feb. 2000.
- [6] S. Lerouge *et al.* "Plasma Sterilization: A Review of Parameters, Mechanisms, and Limitations" *Plasmas and Polymers*, vol. 6, no. 3, Sep. 2001.
- [7] M. Korachi *et al.* "An investigation into the biocidal effect of high voltage AC/DC atmospheric corona discharges on bacteria, yeasts, fungi and algae" *J. Electrostat.* Vol. 67, pp. 678-685, 2009.
- [8] M. Moisan *et al.* "Plasma sterilization: Methods and mechanisms" *Pure Appl. Chem.*, Vol. 74, No. 3, pp. 349–358, 2002.
- 
- [9] X.M. Shi *et al.*, "Research on the Inactivation Effect of Low-Temperature Plasma on *Candida Albicans*" *IEEE Trans. Plasma Sci.* Vol. 36, pp. 498-503, 2008.
- [10] Y. Ma *et al.*, "Chemical Mechanisms of Bacterial Inactivation Using Dielectric Barrier Discharge Plasma in Atmospheric Air" *IEEE Trans. Plasma Sci.* Vol. 36, pp. 1615-1620, 2008.
- [11] C. Tender *et al.* "Atmospheric plasmas: a review" *Spectrochim. Acta B*, vol. 61, pp. 2-30, 2006.
- [12] A. D. Russel, W. D. Hugo and G. A. J. Ayliffe . *Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization*. 4th Ed., Malden, MA: Blackwell, 2004.
- [13] Environment Agency (2007). *The Microbiology of Drinking Water (2007) - Part 7 - Methods for the enumeration of heterotrophic bacteria* (2007 ed.) [Online]. Available: <http://www.environment-agency.gov.uk>.
- [14] J. L. Ferreira *et al.* "Magnetic Field Enhanced Plasma Reactor for Pollutant Gases Control by Corona Discharge". *Combust. Sci. Technol.*, v.140, n.1, p.1 - 11, 1998.
- [15] Y. P. Raizer. *Gas discharge physics*. 1st. Ed. New York, NY: Springer-Verlag, 1991.
- [16] S. G. Joshi *et al.* "Control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in planktonic form and biofilms: A biocidal efficacy study of nonthermal dielectric-barrier discharge plasma" *Am. J. Infect. Control*, vol. 38, pp. 293-301, 2010.
- [17] M. K. Boudam *et al.* "Bacterial spore inactivation by atmospheric-pressure plasmas in the presence or absence of UV photons as obtained with the same gas mixture" *J. Phys. D: Appl. Phys.* vol.39, pp. 3494–3507, 2006.
- [18] L. Gaunt *et al.* "Bactericidal Action of the Reactive Species Produced by Gas-Discharge Nonthermal Plasma at Atmospheric Pressure: A Review" *IEEE Trans. Plasma Sci.* vol. 34, no.4, pp. 1257-1269, Aug. 2006.
- 
- [19] M. Laroussi, "Nonthermal decontamination of biological media by atmospheric-pressure plasmas: review, analysis, and prospects" *IEEE Trans. Plasma Sci.*, vol. 30, pp. 1409-1415, 2002.

	<p><b>Joao Henrique Campos de Souza</b> graduated and concluded his master's degree and PhD courses in Experimental Plasma Physics at the University of Brasilia. He has worked with the development and characterization of plasma sources for sterilization studies and space propulsion. Currently he works as a Specialist in Regulation and Health Surveillance (Area: Physics) for the National Health Surveillance Agency (Anvisa).</p>
	<p><b>Jose Leonardo Ferreira</b> graduated in Physics at the University of Brasilia, Mastered in magnetic confinement of plasmas in tokamaks at the University of São Paulo, and concluded his PhD in Spatial Sciences with emphasis in geophysics and space plasmas simulation space laboratory by the National Institute for Space Research. He has worked with the development of several plasma sources for various purposes: space propulsion, pollutant control and magnetic confinement. Currently, he is an associate professor of the Institute of Physics of the University of Brasilia.</p>