

**Maria Salomé Gião Teixeira de Carvalho Marques**

**Monitorização de biofilmes de  
*Pseudomonas fluorescens***

Dissertação apresentada ao Departamento de Engenharia Biológica da  
Universidade do Minho para a obtenção do grau de Mestre em  
Tecnologia do Ambiente

Tese realizada sob orientação da

**Doutora Maria João Vieira**

(Departamento de Engenharia Biológica)

e co-orientação da

**Professora Doutora Maria Irene Montenegro**

(Departamento de Química)



**Universidade do Minho**  
**Escola de Engenharia**

2004

Este trabalho contou com o financiamento da Fundação para a Ciência e  
Tecnologia através do projecto POCTI/34945/QUE/2000

**“A paciência é uma árvore de raízes amargas,  
mas de frutos muito doces”**

Aforismo persa

## Agradecimentos

A execução deste trabalho não teria sido possível sem o apoio científico, técnico e humano prestado por algumas pessoas, a quem eu gostaria de agradecer:

À **Doutora Maria João Vieira** por me ter confiado a realização deste trabalho. A sua grande experiência e sábia orientação ensinaram-me muito e foram fundamentais para o sucesso desta dissertação. Também a sua constante presença e amizade foram determinantes para as decisões que me ajudaram a traçar o caminho para o futuro.

À **Professora Doutora Maria Irene Montenegro** cujos conhecimentos científicos muito me ajudaram a compreender um assunto tão complexo como é a electroquímica. Também as suas palavras de incentivo davam sempre alento para continuar.

À **Doutora Teresa Tavares** por disponibilizar o potenciostato e o laboratório, permitindo a execução deste trabalho no Departamento de Engenharia Biológica.

À **Clélia Milhano** que me ensinou toda a parte laboratorial da técnica de voltametria cíclica. A sua paciência e apoio estiveram sempre presentes quando algum contratempo surgia.

A todos os meus colegas de laboratório que me acolheram com carinho e que rapidamente se tornaram mais do que colegas, mas verdadeiros amigos. A sua amizade e conselhos foram preciosos para a elaboração deste trabalho.

Ao **Manuel** gostaria de agradecer, em particular, por me ter ensinado as técnicas de formação de biofilme e de coloração das células, e ao **Nuno** sempre disponível para me ajudar nalguma tradução.

Às minhas queridas amigas **Sanna** e **Mariana** pela bonita amizade que nos une. Presentes nos momentos coloridos, revelaram-se excelentes pintoras dando cor às horas cinzentas.

Ao **Sr. Manuel Santos** pela inestimável ajuda na manutenção da instalação, sempre disponível para rapidamente reparar uma bomba ou soldar algum eléctrodo que partia.

Gostaria de agradecer ao **Departamento de Engenharia Biológica** da **Universidade do Minho** por ter disponibilizado as instalações e à **Fundação para a Ciência e Tecnologia**, que através do projecto POCTI/34945/QUE/2000 suportou financeiramente este trabalho.

Aos meus **Pais, Irmãos** e **Amigos** (em especial à **Natércia** e à **Olívia**) por todo o apoio incondicional. As suas palavras de compreensão e incentivo estiveram sempre presentes nas horas mais difíceis.

Ao **Jorge** por ser a minha fonte de inspiração, pelo amor e paciência manifestados, principalmente nos piores momentos, e pelo orgulho que demonstra, o qual me faz desejar ir sempre mais longe.

## Resumo

A acumulação de biofilme em equipamentos industriais é problema real com o qual as indústrias se debatem diariamente. Os biofilmes podem ter um impacto negativo na qualidade dos produtos finais e causar corrosão dos equipamentos. Por outro lado, a sua remoção através do uso de produtos químicos, como biocidas, pode causar impactos negativos no decorrer do processo, tais como paragens para limpeza, os elevados custos associados e impactos ambientais. Por esta razão é de extrema importância a sua eliminação atempada e por isso os biofilmes devem ser detectados o mais cedo possível.

Têm sido realizados muitos estudos sobre monitorização de biofilmes. No entanto, ainda nenhum método foi implementado com sucesso à escala industrial. O objectivo deste trabalho foi estudar o comportamento de eléctrodos de platina, após se ter promovido a formação de biofilme na sua superfície, baseado em técnicas electroquímicas – Voltametria Cíclica. Também se estudou uma forma de limpar o eléctrodo *in situ* no final de cada monitorização.

Esta dissertação encontra-se dividida em três partes: detecção de biofilmes na superfície de eléctrodos de platina; estudo do efeito da variação das condições experimentais no desprendimento e viabilidade do biofilme; e estudo da influência da formação de bolhas de hidrogénio no desprendimento do biofilme.

Para estudar a possibilidade de se utilizar a Voltametria Cíclica na detecção da formação de biofilmes promoveu-se o crescimento de biofilme na superfície dos eléctrodos de platina, durante diferentes períodos de tempo. No final mediu-se a altura do pico de dessorção do hidrogénio e determinou-se a percentagem de área do eléctrodo coberta pelo biofilme, tendo sido demonstrado que a altura do referido pico decresce com o aumento da percentagem de área coberta.

Na segunda parte do trabalho estudou-se a influência das condições experimentais, tendo-se variado a velocidade de varrimento, o pH da solução electrolítica e os limites de potencial. Observou-se que o aumento da velocidade de varrimento diminui a remoção celular, alterando o pH da solução electrolítica para pH 4 todas as células aparecem mortas e a remoção é maior, e finalmente, aumentando o limite de potencial positivo até 1.5 V aumenta o número de células mortas, no entanto a remoção total das células só é conseguido aumentando o limite negativo até  $-2.0$  V, em que se forma bolhas de hidrogénio que promovem uma remoção mecânica. Este resultado sugere que para se obter um eléctrodo completamente limpo é necessário promover uma limpeza mecânica, através da formação de bolhas de hidrogénio.

Na terceira parte deste trabalho estudou-se a influência da formação de bolhas de hidrogénio no desprendimento de biofilmes de diferentes idades. Verificou-se que o tempo de formação de bolhas de hidrogénio necessário para remover o biofilme aumenta com a idade deste. Contudo para biofilmes mais velhos (7 dias) não foi possível limpar completamente o eléctrodo.

Pode concluir-se que a técnica de Voltametria Cíclica pode ser usada para monitorizar biofilmes formados em eléctrodos de platina. Pode, também, concluir-se que é possível limpar o sensor *in situ*, através da formação de bolhas de hidrogénio.

## Abstract

The accumulation of biofilms in industrial equipment is a real problem that industry deals every day. The biofilms can have a negative impact in the final product quality and cause equipment corrosion. The use of chemical products, such as biocides, to control them can have negative impacts in the process, like industrial process suspension for cleaning, the high costs associated and the environmental impact. For these reasons it is very important to control biofilms in a prior stage of development, and consequently biofilms must be detected as early as possible.

There are many studies about biofilm monitoring. However no one is still employed in industrial scale with total success. The aim of this work is to study the platinum electrodes behaviour after biofilm growth occurred in its surface, based on electrochemical technique of Cyclic Voltammetry. A mean of cleaning the sensor *in situ* at the end of each monitoring was also studied.

This work is divided in three parts: detection of biofilms on the platinum electrodes surface, study of the effect of experimental conditions on biofilm detachment and viability, and study the influence of hydrogen bubbles formation on the detachment of biofilm.

To study if Cyclic Voltammetry can be used to detect biofilms formation, biofilm with different growth times was promoted on the platinum electrodes surface. Then the height of hydrogen desorption peak was measured and the percentage of electrode covered area by biofilm determined. It was demonstrated that the height of the hydrogen desorption peak decreases with the increase of the covered area.

In the second part the influence of the experimental conditions was studied, by changing sweep rate, electrolytic solution pH and applied potential range. It was observed that a decrease in the sweep rate increases the removal of cells and that by changing the electrolytic solution from pH 7 to pH 4 all the cells appear dead and the removal is more extensive. Finally, increasing the applied potential range up to 1.5 V increases the number of dead cells, conversely a total removal of cells are obtained when the negative potential is increased until  $-2.0$  V, where hydrogen bubbles are formed, promoting a mechanical detachment. This result suggested that to obtain an electrode completely free of cells a mechanical cleaning must be promoted, by hydrogen bubbles formation.

In the third part of this work the influence of hydrogen bubbles formation on the detachment of biofilm growth by different periods of time was study. It was verified that the time of hydrogen bubbles formation needed to obtain a completely clean surface increases with the period of time of biofilm formation. However for older biofilms (growth for 7 days) it was not possible to completely clean the electrode surface.

Therefore it can be concluded that Cyclic Voltammetry can be used as a technique to monitor biofilm formation on platinum electrodes. In addition, it is possible to clean the sensor *in situ* by promoting hydrogen bubbles formation.

# Índice Geral

<i>Agradecimentos</i> .....	i
<i>Resumo</i> .....	iii
<i>Abstract</i> .....	iv
<i>Índice Geral</i> .....	v
<i>Índice de Tabelas</i> .....	viii
<i>Índice de Figuras</i> .....	x
<b>Capítulo I – Introdução</b> .....	<b>1</b>
I.1. Os biofilmes.....	2
I.1.1. Etapas de adesão dos biofilmes.....	5
I.1.2. As <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	9
I.2. Monitorização de biofilmes.....	11
I.2.1. Técnicas microscópicas.....	12
I.2.2. Técnicas espectroquímicas.....	20
I.2.3. Técnicas piezoeléctricas.....	27
I.2.4. Técnicas electroquímicas.....	28
I.2.5. Técnica de eléctrodos vibrantes de varrimento.....	30
I.3. Voltametria Cíclica.....	31
I.3.1. Conceitos fundamentais em electroquímica.....	31
I.3.2. Cinética da reacção de eléctrodos.....	34
I.3.3. Tipos de voltametria.....	41
I.3.4. Variáveis mais importantes em voltametria cíclica.....	43
I.3.5. Parâmetros experimentais.....	44
I.3.6. Dupla camada eléctrica.....	48
I.3.7. Reacções reversíveis e irreversíveis.....	50

I.3.8. Adsorção do hidrogénio e oxigénio.....	51
I.3.9. Problemas mais comuns.....	52
I.3.10. Aplicações da voltametria cíclica.....	53
<b>Capítulo II – Materiais e Métodos.....</b>	<b>56</b>
II.1. Crescimento dos microrganismos.....	57
II.2. Voltametria cíclica.....	60
II.2.1. Monitorização de biofilmes pela técnica de voltametria cíclica.....	62
II.2.2. Influência das condições de voltametria cíclica na viabilidade e remoção do biofilme.....	63
II.2.3. Estudo da influência da formação de bolhas de hidrogénio na remoção do biofilme.....	64
II.3. Observação das superfícies com e sem biofilme.....	66
<b>Capítulo III – Resultados e Discussão.....</b>	<b>67</b>
III.1. Monitorização de biofilmes pela técnica de voltametria cíclica.....	68
III.2. Influência das condições de voltametria cíclica na viabilidade e remoção do biofilme.....	74
III.3. Estudo da influência da formação de bolhas de hidrogénio na remoção do biofilme.....	86
<b>Capítulo IV – Conclusões e propostas de trabalho futuro.....</b>	<b>95</b>
<b>Capítulo V – Bibliografia.....</b>	<b>99</b>
<b>Anexo I – Fotografias e voltamogramas cíclicos.....</b>	<b>112</b>
AI.1. Ensaio 1.....	113
AI.2. Ensaio 2.....	121
AI.3. Ensaio 3.....	129

<b>Anexo II – Valores obtidos para a altura do pico de dessorção do hidrogénio e percentagem de área de eléctrodo coberta.....</b>	<b>137</b>
<b>Anexo III – Cálculos.....</b>	<b>144</b>
AIII.1. Cálculo do tempo total de cada ciclo.....	145
AIII.2. Cálculo do tempo durante o qual o eléctrodo esteve exposto a uma intensidade de corrente negativa.....	145
AIII.3. Cálculo do tempo durante o qual o eléctrodo esteve exposto a uma intensidade de corrente positiva.....	147
AIII.4. Cálculo do tempo durante o qual o eléctrodo esteve exposto a um potencial positivo.....	147
AIII.5. Cálculo do tempo durante o qual o eléctrodo esteve exposto a um potencial negativo.....	148
<b>Anexo IV – Intervalo de tempo durante o qual a intensidade de corrente é negativa e positiva.....</b>	<b>149</b>
<b>Anexo V – Intervalo de tempo durante o qual o potencial é negativo e positivo....</b>	<b>155</b>
<b>Anexo VI – Artigos científicos publicados.....</b>	<b>157</b>

## Índice de Tabelas

<b>Tabela II.1.</b> Composição do meio concentrado, para o crescimento de <i>Pseudomonas fluorescens</i> , e do meio diluído, onde foram imersos os eléctrodos para a formação de biofilme na sua superfície.....	58
<b>Tabela II.2.</b> Condições de operação executados.....	63
<b>Tabela II.3.</b> Composição do tampão fosfato, utilizado na voltametria cíclica.....	64
<b>Tabela II.4.</b> Tempo de formação de bolhas e tempo de varrimento do potencial a uma velocidade de varrimento de $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , entre os limites de potencial de $-0.5$ a $1.0 \text{ V}$ , para cada idade de biofilme formado.....	65
<b>Tabela III.1.</b> Remoção de biofilmes de diferentes idades e condições experimentais aplicadas.....	88
<b>Tabela AII.1.</b> Valores da altura do pico de dessorção do hidrogénio e percentagem de área de eléctrodo coberta, obtidos para o ensaio 1.....	139
<b>Tabela AII.2.</b> Valores da altura do pico de dessorção do hidrogénio e percentagem de área de eléctrodo coberta, obtidos para o ensaio 2.....	140
<b>Tabela AII.3.</b> Valores da altura do pico de dessorção do hidrogénio e percentagem de área de eléctrodo coberta, obtidos para o ensaio 3.....	141
<b>Tabela AII.4.</b> Valores da média e do desvio-padrão, obtidos para a altura do pico de dessorção do hidrogénio e da percentagem de área coberta, em cada idade de biofilme, para o eléctrodo 1.....	142
<b>Tabela AII.5.</b> Valores da média e do desvio-padrão, obtidos para a altura do pico de dessorção do hidrogénio e da percentagem de área coberta, em cada idade de biofilme, para o eléctrodo 2.....	142
<b>Tabela AII.6.</b> Valores da média e do desvio-padrão, obtidos para a altura do pico de dessorção do hidrogénio e da percentagem de área coberta, em cada idade de biofilme, para o eléctrodo 3.....	143

<b>Tabela AII.7.</b> Valores da média e do desvio-padrão, obtidos para a altura do pico de dessorção do hidrogénio e da percentagem de área coberta, em cada idade de biofilme, para o eléctrodo 4.....	143
<b>Tabela AIV.1.</b> Valores de potencial e de tempo durante o qual a intensidade de corrente é negativa e positiva, para cada um dos eléctrodos, para as condições de operação: velocidade de varrimento $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , limites de potencial $-0.5$ e $1.0 \text{ V}$ .....	150
<b>Tabela AIV.2.</b> Valores de potencial e de tempo durante o qual a intensidade de corrente é negativa e positiva, para cada um dos eléctrodos, para as condições de operação: velocidade de varrimento $0.150 \text{ V s}^{-1}$ , limites de potencial $-0.5$ e $1.0 \text{ V}$ .....	151
<b>Tabela AIV.3.</b> Valores de potencial e de tempo durante o qual a intensidade de corrente é negativa e positiva, para cada um dos eléctrodos, para as condições de operação: velocidade de varrimento $0.500 \text{ V s}^{-1}$ , limites de potencial $-0.5$ e $1.0 \text{ V}$ .....	152
<b>Tabela AIV.4.</b> Valores de potencial e de tempo durante o qual a intensidade de corrente é negativa e positiva, para cada um dos eléctrodos, para as condições de operação: velocidade de varrimento $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , limites de potencial $-0.5$ e $1.5 \text{ V}$ .....	153
<b>Tabela AIV.5.</b> Valores médios do tempo durante o qual a intensidade de corrente é negativa e positiva para cada uma das condições de operação.....	154
<b>Tabela AV.1.</b> Valores do tempo durante o qual o potencial (E) é negativo e positivo para cada uma das condições de operação.....	156

## Índice de Figuras

<b>Figura I.1.</b> Fotografia de um biofilme formado num sistema de água potável. Nesta imagem é possível observar (a) a superfície onde cresceu o biofilme; (b) o biofilme e (c) protozoários a alimentarem-se do biofilme (imagem cedida por Lúcia Chaves e Nuno Azevedo).....	4
<b>Figura I.2.</b> Etapas da formação de um biofilme: (a) transporte das espécies até às superfícies; (b) adesão inicial; (c) e (d) maturação – produção de polímeros e reprodução celular; (e) desprendimento ( <a href="http://instruct1.cit.cornell.edu">http://instruct1.cit.cornell.edu</a> ).....	5
<b>Figura I.3.</b> Diagrama representativo da formação de um biofilme: 1. Adesão inicial das células à superfície; 2. Produção de polímeros extracelulares (EPS), mantendo as células mais fortemente aderidas; 3. Início da formação da arquitectura do biofilme; 4. Desenvolvimento da arquitectura; 5. Dispersão de células do biofilme ( <a href="http://gnn.tigr.org">http://gnn.tigr.org</a> ) .....	7
<b>Figura I.4.</b> <i>Pseudomonas fluorescens</i> : fotografias obtidas por (a) Microscopia electrónica de varrimento ( <a href="http://www.agr.kuleuven.ac.be">http://www.agr.kuleuven.ac.be</a> ) e (b) por microscopia confocal de varrimento laser ( <a href="http://www.nd.edu">http://www.nd.edu</a> ).....	10
<b>Figura I.5.</b> Fotografia de bactérias púrpuras fototróficas, obtidas por microscopia de campo claro (Madigan et al., 1997).....	13
<b>Figura I.6.</b> Fotografia da mesma amostra de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> observadas por diferentes tipos de microscopia: (a) campo claro; (b) contraste de fase e (c) campo escuro (Madigan et al., 1997).....	14
<b>Figura I.7.</b> Fotografia de uma amostra proveniente da cavidade bucal, obtida por microscopia de fluorescência. As células vivas aparecem coradas de verde e as mortas de vermelho (Talaro & Talaro, 1996).....	15
<b>Figura I.8.</b> Fotografia de microrganismos termófilos, provenientes de uma amostra retirada do Yellowstone National Park, EUA, obtidas por microscopia confocal de varrimento laser ( <a href="http://www.erc.montana.edu">http://www.erc.montana.edu</a> ).....	16
<b>Figura I.9.</b> Fotografia de bactérias em forma de bacilo, obtidas por microscopia electrónica de transmissão (Nester et al., 1998).....	17
<b>Figura I.10.</b> Fotografia de bactérias em forma de bacilo, obtidas por microscopia electrónica de varrimento (Nester et al., 1998).....	18

<b>Figura I.11.</b> Monitor de infravermelhos: (a) esquema do monitor; (b) Correlação entre a espessura do biofilme e o valor da absorvência obtido (Tinham & Bott, 2003).....	22
<b>Figura I.12.</b> Reflectância – absorvência do espectro FTIR de exopolímeros produzidos por <i>Pseudomonas sp.</i> em crescimento contínuo (Beech <i>et al.</i> , 1999).....	23
<b>Figura I.13.</b> Perfil do sinal fotoacústico ( $\lambda = 532$ nm) de um biofilme que se está a desenvolver à superfície do sensor (Schmid <i>et al.</i> , 2003).....	24
<b>Figura I.14.</b> Intensidade da luz emitida por uma superfície sem biofilme e colonizada por um biofilme (Saxena <i>et al.</i> , 2002b).....	25
<b>Figura I.15.</b> Variação da amplitude com a frequência para cada idade de biofilme, obtida para um sensor reflectometria de frequência ultrassónica (Fonseca <i>et al.</i> , 2002).....	26
<b>Figura I.16.</b> (a) Ilustração esquemática do princípio de funcionamento do QCM e variação da frequência obtida: (b) curva de decaimento quando um corpo de massa rígida está aderido e (c) curva de decaimento quando o corpo aderido é de massa viscosa (Rudh <i>et al.</i> , 2002).....	28
<b>Figura I.17.</b> Esquema de um monitor de Biogeo <sup>TM</sup> ( <a href="http://geothermal.id.doe.gov">http://geothermal.id.doe.gov</a> ).....	30
<b>Figura I.18.</b> Voltamograma cíclico obtido para uma solução 6.0 mM $K_3Fe(CN)_6$ e 1.0 M $KNO_3$ (Skoog & Leary, 1992).....	35
<b>Figura I.19.</b> Esquema do transporte dos reagentes e produtos do seio da solução para a superfície do eléctrodo e deste para a solução, respectivamente ( <a href="http://www.bath.ac.uk">http://www.bath.ac.uk</a> ).....	38
<b>Figura I.20.</b> Variação do potencial ao longo do tempo usado em voltametria: a) varrimento linear; b) impulso diferencial; c) onda quadrada e d) forma triangular (Skoog & Leary, 1992).....	42
<b>Figura I.21.</b> Perturbação de forma triangular, usado em voltametria cíclica (Pletcher, 1991).....	43
<b>Figura I.22.</b> Esquema de uma célula electroquímica e compartimentos onde são inseridos os eléctrodos (Greef <i>et al.</i> , 1993).....	47

<b>Figura I.23.</b> Modelo esquemático da distribuição de a) iões; b) potencial e c) de carga na direcção perpendicular do plano do eléctrodo, descrito por 1) Helmholtz; 2) Gouy e Chapman e c) Gouy, Chapman e Sten. Os círculos representam os iões; ---- representam o plano interior de Helmholtz; _._._ é o limite interface-solução (Greef <i>et al.</i> , 1993).....	49
<b>Figura I.24.</b> Exemplo de uma reacção reversível e de uma irreversível (Brett & Brett, 1993).....	51
<b>Figura I.25.</b> Voltamogramas cíclicos em H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1 M a 25 °C; velocidade de varrimento 40 mV s <sup>-1</sup> , num eléctrodo de trabalho de (a) platina; (b) ouro e (c) ródio (Woods, 1976).....	52
<b>Figura II.1.</b> Esquema da instalação.....	59
<b>Figura II.2.</b> Fotografia (a) e esquema (b) da célula de vidro e dos eléctrodos de trabalho (ET), de referência (ER) e secundário (ES).....	60
<b>Figura II.3.</b> Fotografia dos eléctrodos de (a) referência; (b) secundário e (c) trabalho.....	61
<b>Figura III.1.</b> Primeiro varrimento obtido por voltametria cíclica, num eléctrodo de platina coberto com um biofilme de várias idades.....	68
<b>Figura III.2.</b> Fotografias obtidas por microscopia de epifluorescência (ampliação 100X) da superfície de um eléctrodo de platina com um biofilme de (a) 2 horas; (b) 6 horas; (c) 12 horas e (d) 24 horas.....	70
<b>Figura III.3.</b> Relação entre a altura do pico de dessorção do hidrogénio (PDH) e a percentagem de área coberta, obtido para (a) o eléctrodo 1; (b) o eléctrodo 2; (c) o eléctrodo 3 e (d) o eléctrodo 4.....	71
<b>Figura III.4.</b> Voltamograma cíclico obtido num eléctrodo de platina em tampão fosfato pH 7, entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V e a uma velocidade de varrimento de 0.250 V s <sup>-1</sup> , onde cresceu um biofilme de 2 horas. Os voltamogramas representados correspondem ao 1 <sup>o</sup> , 5 <sup>o</sup> e 135 <sup>o</sup> varrimento.....	74
<b>Figura III.5.</b> Fotografias obtidas por microscopia de epifluorescência (ampliação 100X) dum eléctrodo de platina onde cresceu um biofilme de 2 horas: (a) antes e (b) depois da voltametria cíclica em tampão fosfato pH 7, entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V e a uma velocidade de varrimento de 0.250 V s <sup>-1</sup> .....	75

<b>Figura III.6.</b> Fotografias obtidas por microscopia de epifluorescência (ampliação 400X) dum eléctrodo de platina onde cresceu um biofilme de 2 horas, após voltametria cíclica em tampão fosfato pH 7, entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V e a uma velocidade de varrimento de: (a) 0.150 V s <sup>-1</sup> (b) 0.250 V s <sup>-1</sup> e (c) 0.500 V s <sup>-1</sup> .....	77
<b>Figura III.7.</b> Fotografias obtidas por microscopia de epifluorescência (ampliação 400X) dum eléctrodo de platina onde cresceu um biofilme de 2 horas, após (a) o eléctrodo ter sido imerso em tampão fosfato pH 4 durante 30 minutos; após voltametria cíclica a uma velocidade de varrimento de 0.250 V s <sup>-1</sup> , entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V e em tampão fosfato (b) pH 4 e (c) pH 7 (após imersão em pH 4).....	78
<b>Figura III.8.</b> Fotografias obtidas por microscopia de epifluorescência (ampliação 400X) dum eléctrodo de platina onde cresceu um biofilme de 2 horas, após voltametria cíclica em tampão fosfato pH 7, a uma velocidade de varrimento de 0.250 V s <sup>-1</sup> e entre os limites de potencial: (a) -0.5 e 1.0 V; (b) -0.5 e 1.5 V e (c) -2.0 e 1.0 V.....	79
<b>Figura III.9.</b> Voltamogramas cíclicos dum eléctrodo de platina em tampão fosfato pH 7, entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V, a uma velocidade de varrimento de (a) 0.150 V s <sup>-1</sup> ; (b) 0.250 V s <sup>-1</sup> ; (c) 0.500 V s <sup>-1</sup> e (d) entre os limites de potencial -0.5 e 1.5 V, a uma velocidade de varrimento 0.250 V s <sup>-1</sup> .....	81
<b>Figura III.10.</b> Tempo em que cada eléctrodo está a uma intensidade de corrente e a um potencial (a) positivos e (b) negativos. Condições dos vários ensaios: ensaio 1 – velocidade de varrimento: 0.250 V s <sup>-1</sup> , limites de potencial: -0.5 a 1.0 V, em tampão fosfato pH 7; ensaio 2 – velocidade de varrimento: 0.150 V s <sup>-1</sup> , limites de potencial: -0.5 a 1.0 V, em tampão fosfato pH 7; ensaio 3 – velocidade de varrimento: 0.500 V s <sup>-1</sup> , limites de potencial: -0.5 a 1.0 V, em tampão fosfato pH 7; ensaio 6 – velocidade de varrimento: 0.250 V s <sup>-1</sup> , limites de potencial: -0.5 a 1.5 V, em tampão fosfato pH 7.....	82
<b>Figura III.11.</b> Fotografia de parte da célula electroquímica e do eléctrodo de trabalho (a) antes da formação de bolhas; após a formação de bolhas (b) início; (c) ao fim de 1 minuto; e (d) ao fim de 10 minutos.....	86
<b>Figura III.12.</b> Fotografias obtidas por microscopia de epifluorescência (ampliação 100X) dum eléctrodo de platina onde cresceu um biofilme de 4 horas (a) antes da formação de bolhas; após a formação de bolhas (b) durante 1 minuto e (c) durante 2 minutos.....	89
<b>Figura III.13.</b> Fotografias obtidas por microscopia de epifluorescência (ampliação 100X) dum eléctrodo de platina onde cresceu um biofilme de 24 horas (a) antes da voltametria cíclica; após a formação de bolhas durante 4 minutos (b) sem varrer o potencial e (c) após varrer o potencial nas condições do ensaio 1.....	90

<b>Figura III.14.</b> Fotografias obtidas por microscopia de epifluorescência (ampliação 100X) dum eléctrodo de platina onde cresceu um biofilme de 3 dias (a) antes da voltametria cíclica; após a formação de bolhas durante 10 minutos (b) sem varrer o potencial e (c) após varrer o potencial nas condições do ensaio 1.....	91
<b>Figura III.15.</b> Fotografias obtidas por microscopia de epifluorescência (ampliação 100X) dum eléctrodo de platina onde cresceu um biofilme de 5 dias (a) antes da voltametria cíclica; após varrer o potencial nas condições do ensaio 1 e a formação de bolhas durante 10 minutos (b) zona da platina e vidro (c) zona do vidro.....	91
<b>Figura III.16.</b> Fotografias obtidas por microscopia de epifluorescência (ampliação 100X) dum eléctrodo de platina onde cresceu um biofilme de 3 dias após a passagem das bolhas.....	93
<b>Figura III.17.</b> Fotografias obtidas por microscopia de epifluorescência dum eléctrodo de platina onde cresceu um biofilme de 7 dias (a) antes da voltametria cíclica (ampliação 100X); (b) após varrer o potencial nas condições do ensaio 1 e a formação de bolhas durante 15 minutos seguida de nova formação de bolhas durante 15 minutos (ampliação 630X).....	94
<b>Figura AI.1.</b> Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 1 a $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100X) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento (b).....	113
<b>Figura AI.2.</b> Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 2 a $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento (b).....	114
<b>Figura AI.3.</b> Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 3 a $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100X) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento (b).....	114
<b>Figura AI.4.</b> Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 4 a $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento (b).....	115

<b>Figura AI.5.</b> Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 1 a $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento (b).....	115
<b>Figura AI.6.</b> Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 2 a $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento (b).....	116
<b>Figura AI.7.</b> Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 3 a $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento (b).....	116
<b>Figura AI.8.</b> Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 4 a $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento (b).....	117
<b>Figura AI.9.</b> Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 1 a $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento (b).....	117
<b>Figura AI.10.</b> Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 2 a $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento (b).....	118
<b>Figura AI.11.</b> Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 3 a $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento (b).....	118
<b>Figura AI.12.</b> Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 4 a $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento (b).....	119

<b>Figura AI.13.</b> Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 1 a $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento (b).....	119
<b>Figura AI.14.</b> Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 2 a $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento (b).....	120
<b>Figura AI.15.</b> Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 4 a $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento (b).....	120
<b>Figura AI.16.</b> Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 1 a $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento (b).....	121
<b>Figura AI.17.</b> Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 2 a $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento (b).....	121
<b>Figura AI.18.</b> Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 3 a $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento (b).....	122
<b>Figura AI.19.</b> Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 4 a $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento (b).....	122
<b>Figura AI.20.</b> Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 1 a $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento (b).....	123

<b>Figura AI.21.</b> Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 2 a $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento (b).....	123
<b>Figura AI.22.</b> Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 3 a $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento (b).....	124
<b>Figura AI.23.</b> Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 4 a $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento (b).....	124
<b>Figura AI.24.</b> Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 1 a $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento (b).....	125
<b>Figura AI.25.</b> Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 2 a $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento (b).....	125
<b>Figura AI.26.</b> Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 3 a $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento (b).....	126
<b>Figura AI.27.</b> Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 4 a $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento (b).....	126
<b>Figura AI.28.</b> Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 1 a $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento (b).....	127

<b>Figura AI.29.</b> Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 2 a $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento (b).....	127
<b>Figura AI.30.</b> Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 3 a $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento (b).....	128
<b>Figura AI.31.</b> Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 4 a $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento (b).....	128
<b>Figura AI.32.</b> Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 1 a $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento (b).....	129
<b>Figura AI.33.</b> Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 2 a $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento (b).....	129
<b>Figura AI.34.</b> Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 3 a $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento (b).....	130
<b>Figura AI.35.</b> Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 4 a $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento (b).....	130
<b>Figura AI.36.</b> Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 1 a $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento (b).....	131

<b>Figura AI.37.</b> Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 2 a $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento (b).....	131
<b>Figura AI.38.</b> Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 3 a $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento (b).....	132
<b>Figura AI.39.</b> Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 4 a $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento (b).....	132
<b>Figura AI.40.</b> Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 1 a $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento (b).....	133
<b>Figura AI.41.</b> Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 2 a $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento (b).....	133
<b>Figura AI.42.</b> Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 3 a $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento (b).....	134
<b>Figura AI.43.</b> Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 4 a $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento (b).....	134
<b>Figura AI.44.</b> Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 1 a $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento (b).....	135

**Figura AI.45.** Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 2 a  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento (b)..... 135

**Figura AI.46.** Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 3 a  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento (b)..... 136

**Figura AI.47.** Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 4 a  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento (b)..... 136

# Capítulo I

---

## Introdução

Neste capítulo apresentam-se os fundamentos teóricos necessários para a execução deste trabalho. Pretende-se que o leitor apreenda algumas noções básicas nos diversos campos focados no decorrer desta dissertação. Deste modo, tenta-se explicar de forma sucinta e simples, assuntos tão complexos como são os biofilmes e a voltametria cíclica, bem como referenciar as várias técnicas que podem ser utilizadas na detecção de biofilmes.

I.1. Os biofilmes.....	2
I.2. Monitorização de biofilmes.....	11
I.3. Voltametria Cíclica.....	31

## I.1. Os biofilmes

A deposição indesejada de materiais em superfícies é designada por “fouling” (que em português significa “sujamento”), o qual se pode dividir em vários tipos: fouling mineral (devido à deposição de material inorgânico), fouling orgânico (deposição de material orgânico, como óleos, gorduras, proteínas, etc.), fouling de partículas (deposição de partículas provenientes da água, como substâncias húmicas, argila, sílica) e o biofouling (adesão e crescimento de microrganismos) (Flemming and Schaule, 1996).

O biofouling resulta de uma tendência natural que os microrganismos têm de aderir às superfícies. O desenvolvimento e crescimento destes microrganismos originam a excreção de produtos de origem polimérica, os quais envolvem as células, formando uma matriz que as protege das agressões exteriores. Esta matriz é fundamentalmente constituída por água (diz-se que é uma matriz hidratada, já que contém cerca de 80 a 95% de água) e por substâncias poliméricas extracelulares (“extracellular polymeric substances” – EPS). Ao conjunto dos microrganismos e da respectiva matriz dá-se o nome de biofilme (Flemming, 1996, Flemming & Schaule, 1996, McFeters *et al.*, 1984, <http://www.aquadyntech.com>). Dentro dos biofilmes as células estão mais protegidas do que se estivessem em suspensão, uma vez que a matriz EPS actua como uma barreira, onde prevalece o transporte por difusão relativamente ao transporte por convecção, através de poros, canais e áreas de densidade menor. Deste modo, apenas moléculas muito grandes têm dificuldade em se moverem no interior do biofilme enquanto, os nutrientes, que normalmente são moléculas de pequenas dimensões chegam facilmente até às células (Flemming & Schaule, 1996).

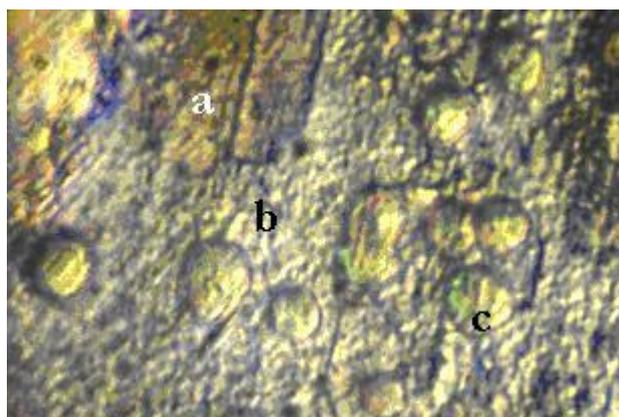
Os biofilmes podem ser constituídos por uma única espécie microbiana (como por exemplo alguns biofilmes associados a infecções e biofilmes que crescem na superfície de implantes médicos), ou, mais frequentemente, por várias espécies, formando aquilo que se designa por consórcio, que engloba fungos, algas e bactérias. No interior destes biofilmes podem ainda encontrar-se partículas de matéria inorgânicas (partículas abióticas) e substâncias dissolvidas adsorvidas. Quanto maior for a diversidade de nutrientes (na forma de carbono orgânico) disponível, maior será a diversidade desse consórcio (O'Toole *et al.*, 2000, Flemming, 2003).

Dependendo do ponto de vista, os biofilmes podem ser benéficos ou nocivos. Os biofilmes utilizados nas estações de tratamento de águas residuais, os que se acumulam nos leitos dos rios, lagos e ambientes marinhos e os biofilmes presentes nos reactores de biofilmes, por contribuírem grandemente para a remoção de contaminantes orgânicos e inorgânicos da água, são considerados biofilmes benéficos. Também são exemplos de biofilmes benéficos os utilizados nas indústrias de fermentação e farmacêutica (Characklis & Wilderer, 1989). No entanto, quando alojados em locais indesejáveis podem trazer sérios problemas, tais como:

- Nos permutadores de calor aumentam a resistência à transferência de calor, o que implica uma elevação dos custos com limpeza e biocidas, paragens para limpeza e sobredimensionamento do sistema para compensar as perdas (Characklis & Wilderer, 1989, Flemming, 1996, McFeters *et al.*, 1984);
- Em sistemas membranares e outros meios porosos causam problemas de colmatação e de contaminação microbiológica (Characklis & Wilderer, 1989, Flemming, 1996);

- Podem originar problemas de corrosão, a qual pode ser causada por diferentes motivos: formação de colónias localizadas que se alimentam do próprio material onde estão aderidas, produção de minerais, de ácidos orgânicos e de amónia e redução do sulfato, entre outros (Flemming, 1996, Sand, 1996, McFeters *et al.*, 1984, <http://www.aquadyntech.com>);
- O seu aparecimento em catéteres, implantes internos e lentes de contacto pode causar infecções graves (Characklis & Wilderer, 1989; Overman, 2000);
- São também os maiores responsáveis pela contaminação da água potável, com consequências a nível de saúde pública e elevados custos associados (Characklis & Wilderer, 1989, Flemming, 1996, McFeters *et al.*, 1984). Na Figura I.1 pode ser observado um biofilme obtido num sistema de água potável.

Para além dos biofilmes indesejáveis acima mencionados, podem ainda ocorrer no interior de oleodutos, na aquicultura e nos sistemas de ar condicionado (Characklis & Wilderer, 1989).

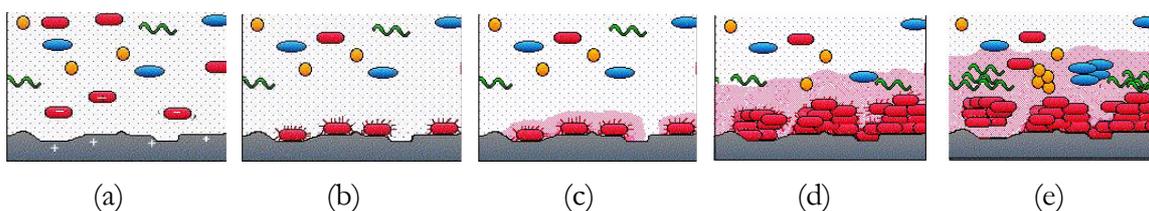


**Figura I.1.** Fotografia de um biofilme formado num sistema de água potável. Nesta imagem é possível observar (a) a superfície onde cresceu o biofilme; (b) o biofilme e (c) protozoários a alimentarem-se do biofilme (imagem cedida por Lúcia Chaves e Nuno Azevedo).

Os biofilmes podem ser controlados através do uso de biocidas, biodispersantes e da minimização do nutriente limitante. Actualmente, também se recorre ao uso de tecnologias enzimáticas, que no entanto são técnicas caras e que podem deixar resíduos que podem contaminar o produto final (<http://www.aquadyntech.com>).

### I.1.1. Etapas de adesão dos biofilmes

Nos ecossistemas terrestres e aquáticos as bactérias aparecem como células livres (estado plantónico) ou sob a forma de biofilmes ligados a suportes sólidos. A formação e desenvolvimento dos biofilmes ocorrem em várias etapas, tal como está esquematizado na Figura I.2.



**Figura I.2.** Etapas da formação de um biofilme: (a) transporte das espécies até às superfícies; (b) adesão inicial; (c) e (d) maturação – produção de polímeros e reprodução celular; (e) desprendimento (<http://instruct1.cit.cornell.edu>).

#### ❖ Transporte até às superfícies

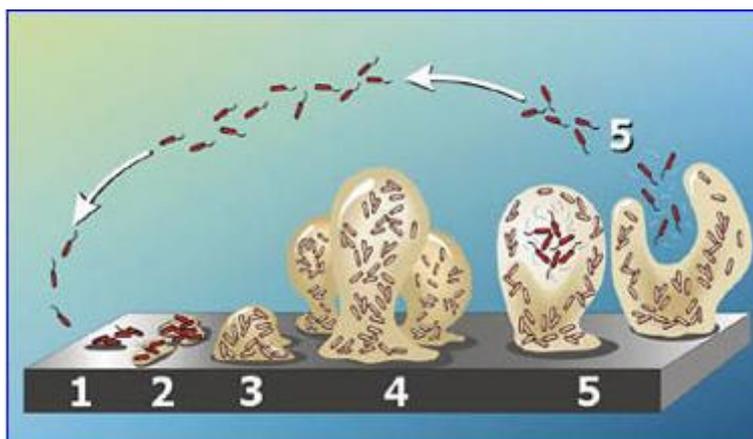
O transporte das bactérias até às superfícies pode ocorrer de diferentes modos: difusão através de movimentos brownianos, transporte por convecção devido ao fluxo de líquido e transporte activo promovido pelas estruturas de locomoção celulares, como flagelos. Em determinadas condições, também a sedimentação pode ser uma forma de transporte a considerar (Ganzer *et al.*, 1989, Quiryne & Bollen, 1995).

### ❖ Adesão inicial

A adesão microbiana apenas pode ser definida em termos de forças estabelecidas entre as células e a superfície. A adesão inicial começa quando as bactérias e as superfícies interagem entre si a uma certa distância, através de forças de longo e curto alcance. As forças de longo alcance (também designadas por forças DLVO) englobam as forças de van der Waals e as forças resultantes da interacção da dupla camada eléctrica. As forças de curto alcance (também designadas por forças não DLVO) agrupam as forças de repulsão de Born, as forças de hidratação, as interacções hidrofóbicas, as interacções estéricas e as pontes poliméricas (Freter *et al.*, 1984, Quirynen & Bollen, 1995, Oliveira, 1992, Robb, 1984).

### ❖ Maturação

Após a adesão inicial, as células aderidas podem crescer e reproduzir-se. Na fase de maturação ocorre um rearranjo na arquitectura do biofilme, com o desenvolvimento de uma estrutura mais complexa, que engloba a formação de canais, poros e a redistribuição das bactérias (Stoodley *et al.*, 2002). É nesta fase que se dá a produção de grandes quantidades de exopolímeros, os quais formam a matriz de EPS que protege o biofilme, altamente hidratada, conferindo-lhe estabilidade e resistência aos biocidas e antibióticos (Bryers, 2000, Fletcher, 1984, O'Toole *et al.*, 2000). Na Figura I.3 as etapas 2 a 4 representam as várias fases de desenvolvimento da etapa de maturação.



**Figura I.3.** Diagrama representativo da formação de um biofilme: 1. Adesão inicial das células à superfície; 2. Produção de polímeros extracelulares (EPS), mantendo as células mais fortemente aderidas; 3. Início da formação da arquitetura do biofilme; 4. Desenvolvimento da arquitetura; 5. Dispersão de células do biofilme (<http://gmn.tigr.org>).

#### ❖ Desprendimento

Nesta última fase ocorre a libertação das células (individuais ou em grupo) do biofilme, as quais podem voltar ao seu estado plântico de crescimento (Stoodley et al., 2002).

De uma forma geral, a libertação das células pode ocorrer por dois motivos: erosão e libertação de porções de biofilme. A erosão é um processo contínuo pelo qual pequenas partículas são removidas da superfície do biofilme, resultando em pequenas variações na espessura do biofilme e no fluxo de substrato para o seu interior. A libertação de porções de biofilme é um processo acidental, intermitente e abrupto, pelo qual se perdem grandes secções do biofilme, resultando em variações drásticas na espessura local e dos valores de fluxo (Gantzer *et al.*, 1989).

As causas do desprendimento podem ser físicas, químicas ou biológicas. A erosão pode ser causada fisicamente pelos movimentos brownianos ou pela tensão de corte exercida na superfície do biofilme pelo fluxo do fluido. O desprendimento de porções de biofilme também pode ser influenciado por factores físicos. De facto, a tensão de corte normal exercida ao longo de fendas presentes na matriz do biofilme pode ser a força motriz deste processo. Um segundo factor associado a este tipo de desprendimento é a formação de bolhas de gás em certas zonas, criando estruturas fracas na matriz. Finalmente pode ainda estar relacionado com a existência de gradientes de pressão osmótica no interior do biofilme (Gantzer *et al.*, 1989). Quimicamente, a libertação de porções de biofilme pode ser ocasionada por uma destabilização da matriz polimérica, devida à perda ou quelação de cationes polivalentes (especialmente cálcio), troca iónica, mudanças de pH, mudança na concentração de substrato (podendo originar situações de stress, provocadas por fome (Stoodley *et al.*, 2002)), mudança da força iónica ou por alterações químicas do substrato (Gantzer *et al.*, 1989). Finalmente, as causas biológicas estão relacionadas com modificações na superfície celular, libertação de microrganismos por surfactantes e divisão celular. Em culturas policelulares, pode ainda acontecer que determinadas espécies excretem enzimas que degradem polímeros extracelulares de outras. Pode também haver incompatibilidade entre polímeros e superfícies microbianas levando à criação de fendas, criando zonas susceptíveis à ocorrência de desprendimento de biofilme (Gantzer *et al.*, 1989).

A fase de maturação pode ocorrer em simultâneo com a fase de desprendimento, estabelecendo-se um equilíbrio entre o processo de crescimento e reprodução das células e o de libertação do biofilme. Deste modo, a quantidade de biofilme que permanece na superfície aderente mantém-se aproximadamente constante a partir de uma certa idade (Vieira *et al.*, 1993, Bryers, 2000)

### I.1.2. As *Pseudomonas fluorescens*

As *Pseudomonas fluorescens* são células procariontes Gram-negativas, aeróbias, quimiorganotróficas ou quimiolitotróficas facultativas da família das pseudomonadaceae. Têm requisitos nutricionais muito simples (podem utilizar entre 60 e 80 compostos diferentes como fonte de carbono e azoto), apresentam um crescimento a pH neutro e a temperaturas mesófilas; a sua temperatura óptima de crescimento situa-se entre os 25 e os 30°C, embora se tenha detectado crescimento a 4°C (Madigan *et al.*, 1997, Singleton & Sainsbury, 2001, Gerhardt *et al.*, 1981, Prescott *et al.*, 1999).

Em determinadas condições (como em situações de carência de ferro) as *Pseudomonas fluorescens* são capazes de produzir pioverdina, que é um pigmento fluorescente amarelado e solúvel em água (Singleton & Sainsbury, 2001, Prescott *et al.*, 1999)

Esta espécie não é formadora de esporos, podendo encontrar-se células livres no solo e em habitats aquáticos. Raramente é patogénica, pois dificilmente se desenvolve a 37°C; pode, porém, crescer e multiplicar-se no sangue ou em produtos sanguíneos refrigerados (<http://www.health.gov.au>, Madigan *et al.*, 1997, Singleton & Sainsbury, 2001). Esta bactéria pode também contaminar carne, leite (mesmo após pasteurização), ovos e alimentos marítimos (peixe, frutos do mar) refrigerados, uma vez que cresce a 4°C e degrada lípidos e proteínas (Hayes *et al.*, 2002, Prescott *et al.*, 1999). Para se ter uma ideia da resistência destas bactérias a ambientes extremos, salienta-se o facto de se ter detectado crescimento de *Pseudomonas fluorescens* em meteoritos (Mautner, 2002).

Uma das características inerentes às *Pseudomonas fluorescens* é a capacidade que esta espécie apresenta para formar biofilme em quase qualquer condição de crescimento e, por ser referida muitas vezes como espécie presente em diferentes ambientes, foi a espécie utilizada neste trabalho. É claro que as características do biofilme formado pela bactéria estão directamente ligadas a factores como temperatura, composição do meio, pressão osmótica, pH, ferro e oxigénio dissolvido (O'Toole *et al.*, 2000). Na Figura I.4 podem ser observados exemplos de biofilmes de *Pseudomonas fluorescens*. As fotografias foram obtidas por dois tipos de microscopia, como se refere na legenda da Figura I.4.



(a)

(b)

**Figura I.4.** *Pseudomonas fluorescens*: fotografias obtidas por (a) microscopia electrónica de varrimento (<http://www.agr.kuleuven.ac.be>) e (b) por microscopia confocal de varrimento laser (<http://www.nd.edu>).

## I.2. Monitorização de biofilmes

Tal como foi referido anteriormente a formação de biofilmes indesejados em sistemas industriais pode ser muito problemática, com custos associados muito elevados. Deste modo, a sua monitorização atempada é de elevada importância e essencial para a adopção das melhores técnicas para os controlar. Assim, torna-se necessário dispor de técnicas que permitam determinar *in situ*, em tempo real e de forma não destrutiva a formação de biofilmes. Para Flemming (2003), os sistemas de monitorização de biofilmes em linha podem ser divididos em três níveis:

- **Nível 1:** São sistemas que detectam a cinética da deposição do material e a variação da espessura da camada de material depositado. Os sistemas classificados neste nível são de grande utilidade, pois permitem obter informação em tempo real da formação de depósitos em superfícies submersas. No entanto, não são capazes de distinguir os microrganismos dos compostos abióticos dos depósitos.
- **Nível 2:** Nestes sistemas os componentes bióticos dos depósitos podem ser distinguidos dos abióticos, o que pode ser efectuado através da detecção específica de sinais provenientes das biomoléculas.
- **Nível 3:** Os sistemas inseridos neste nível são capazes de providenciar informação detalhada sobre a composição química dos depósitos ou mesmo do local exacto onde os microrganismos estão alojados.

No futuro, poderá ser desenvolvido ainda um quarto nível, no qual será possível distinguir células vivas de mortas (Flemming, 2003).

De seguida descrevem-se sucintamente as várias técnicas referidas na literatura para a monitorização de biofilmes, incluindo não só aquelas que permitem recolher informação sobre a acumulação do depósito de uma maneira não destrutiva, como outras que obrigam à recolha de placas com biofilme formado, que são analisadas em laboratório.

### I.2.1. Técnicas microscópicas

Em diversas situações constroem-se derivações da corrente líquida e o biofilme forma-se em reactores especificamente desenhados para o efeito como é o caso do “Robbins Device” (Blenkinsopp *et al.*, 1992) e da célula de fluxo (Pereira *et al.*, 2002). Em alguns casos, as superfícies onde os biofilmes se formaram são removidas do reactor e o biofilme é investigado por técnicas destrutivas (determinação de massa, por exemplo) e por métodos microbiológicos, bioquímicos e microscópicos. Noutras situações é possível observar microscopicamente o biofilme directamente na câmara onde é formado, como é o caso da câmara de fluxo paralelo (Azevedo *et al.*, 2003). Como no decurso do trabalho executado no âmbito desta tese se observou o biofilme por microscopia, estas técnicas são detalhadas a seguir.

- **Microscopia de campo claro:** É a forma mais comum de microscopia óptica. As imagens são obtidas devido à diferença de contraste entre as células e o meio que as rodeia (o qual aparece brilhante). Esta diferença resulta do facto das células absorverem ou dispersarem luz em várias graduações. O facto de determinadas células serem translúcidas pode, por esta razão, comprometer a sua visualização através desta técnica microscópica, devido à falta de contraste com o meio

circundante. No entanto, este problema pode ser resolvido através da coloração das células (Madigan *et al.*, 1997, Prescott *et al.*, 1999, Singleton & Sainsbury, 2001).

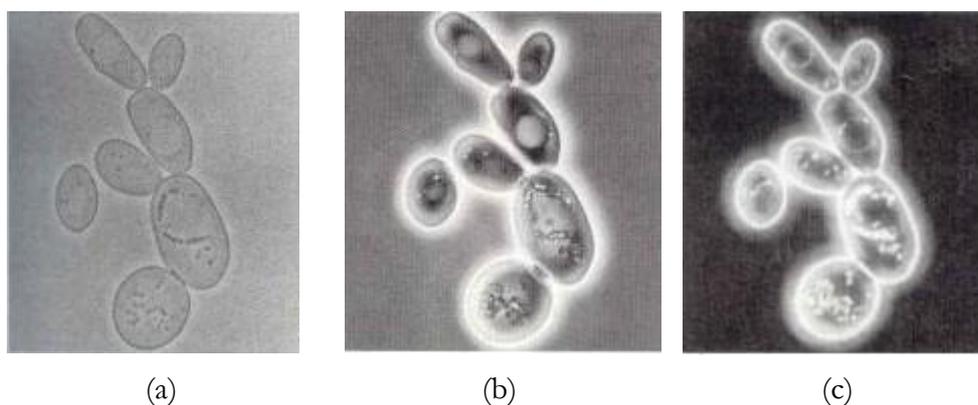


**Figura I.5.** Fotografia de bactérias púrpuras fototróficas, obtidas por microscopia de campo claro (Madigan *et al.*, 1997)

- **Microscopia de contraste de fase:** Este tipo de microscopia foi desenvolvida para tentar ultrapassar as dificuldades derivadas da falta de contraste entre as células e o meio, tornando possível a visualização das células sem ser necessário corá-las. Baseia-se no princípio de que as células diferem do meio relativamente ao índice refractário e, conseqüentemente, na direcção dos raios luminosos que passam através das células. É muito utilizada em investigação pois permite a visualização de amostras vivas e húmidas. É aplicada fundamentalmente, na contagem de bactérias, protozoários e esporos e na determinação da forma e estruturas internas das células (Gerhardt *et al.*, 1981, Madigan *et al.*, 1997, Prescott *et al.*, 1999). Uma variação deste tipo de microscopia é a **microscopia de contraste de interferência diferencial**, pela qual é possível observar objectos que difiram significativamente ou no índice refractário ou na espessura, resultando numa retardação diferencial da luz que muda de fase. As diferenças de fase são convertidas em diferentes intensidades por

objectivas e condensadores especiais. Deste modo é possível observar objectos não corados e células vivas (<http://www.tulane.edu>).

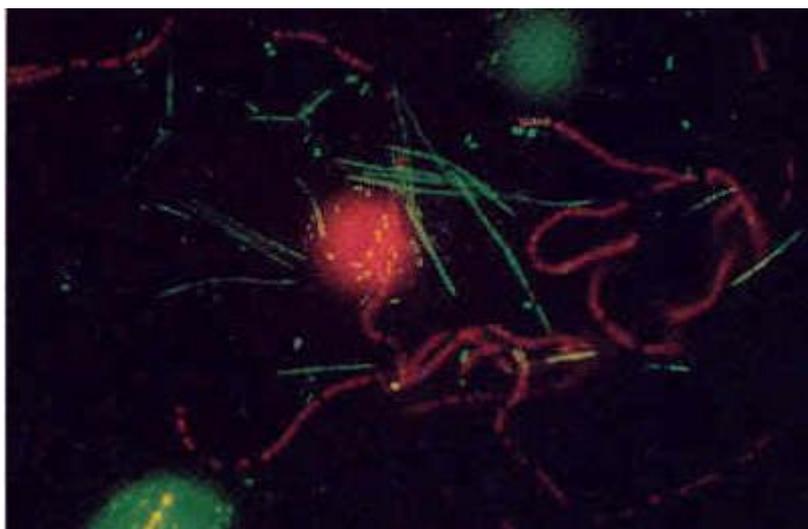
- **Microscopia de campo escuro:** O sistema de campo claro foi modificado de forma a que a luz incida apenas nos lados das espécies. Deste modo a única luz captada pelas lentes é aquela que é dispersa pelas células, levando a que estas apareçam brilhantes num fundo escuro. É uma boa opção para objectos que não podem ser visualizados pelos dois tipos de microscopia anteriores e um excelente meio para o estudo da mobilidade dos microrganismos (Madigan *et al.*, 1997, Singleton & Sainsbury, 2001, Prescott *et al.*, 1999).



**Figura I.6.** Fotografia da mesma amostra de *Saccharomyces cerevisiae* observadas por diferentes tipos de microscopia: (a) campo claro; (b) contraste de fase e (c) campo escuro (Madigan *et al.*, 1997).

- **Microscopia de fluorescência:** é utilizada para observar espécies que fluorescem, isto é, amostras que emitem luz de uma determinada cor quando luz de outra cor incide sobre elas. Esta fluorescência ocorre quer porque dentro das células existem substâncias (tais como clorofila) que fluorescem naturalmente (neste caso designa-

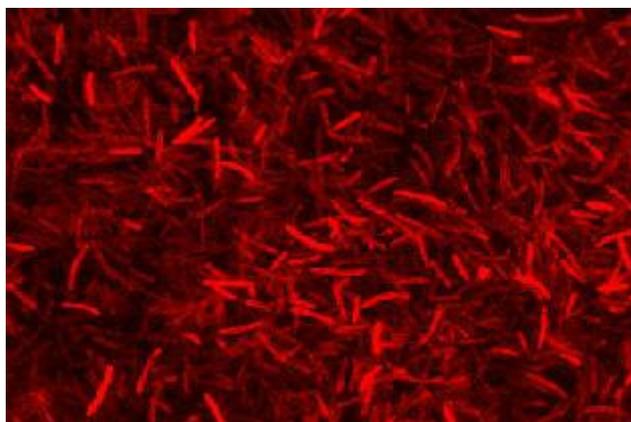
se por autofluorescência), quer porque as células foram previamente tratadas com corantes fluorescentes (fluorocromos). Esta técnica é muito utilizada em microbiologia, em diagnósticos clínicos e em ecologia microbiana (Allen, 2001, Gerhardt *et al.*, 1981, Madigan *et al.*, 1997). Descrever-se-á mais detalhadamente este tipo de técnica na Página 18, uma vez que foi utilizada no âmbito deste trabalho.



**Figura I.7.** Fotografia de uma amostra proveniente da cavidade bucal, obtida por microscopia de fluorescência. As células vivas aparecem coradas de verde e as mortas de vermelho (Talaro & Talaro, 1996).

- **Microscopia confocal de varrimento laser:** é um desenvolvimento muito importante da microscopia óptica, em que é utilizado o conceito de varrimento, neste caso concreto de radiação laser (<http://www.coppe.ufrj.br>). A sua utilização permite a análise tridimensional das amostras, bem como obter dados quantitativos relativamente à espessura, área e volume das estruturas celulares. A grande vantagem desta técnica é permitir visualizar várias secções das células (cortes), sem que seja necessário fragmentar o material celular. É muito aplicada em biologia

molecular, investigação veterinária, tecnologia alimentar, microbiologia, citogenética, etc. (Keevil, 2003, Rowland & Nickless, 2000). Esta técnica tem sido largamente aplicada no estudo de biofilmes vivos pois, devido ao seu carácter não evasivo e não destrutivo, permite a reconstituição tridimensional da estrutura de biofilmes microbianos *in vivo*, bem como o desenvolvimento detalhado do biofilme, a partir da captação de imagens do mesmo local ao longo do tempo (Beer & Kühl, 2001, Nivens *et al.*, 1995, Packroff *et al.*, 2002, White *et al.*, 1999, Xavier *et al.*, 2003).



**Figura I.8.** Fotografia de microrganismos termófilos, provenientes de uma amostra retirada do Yellowstone National Park, EUA, obtidas por microscopia confocal de varrimento laser (<http://www.erc.montana.edu>).

O outro grande grupo de microscopia é a microscopia electrónica, a qual é muito utilizada para estudar em detalhe a estrutura da célula e de depósitos. Divide-se, essencialmente, em duas categorias:

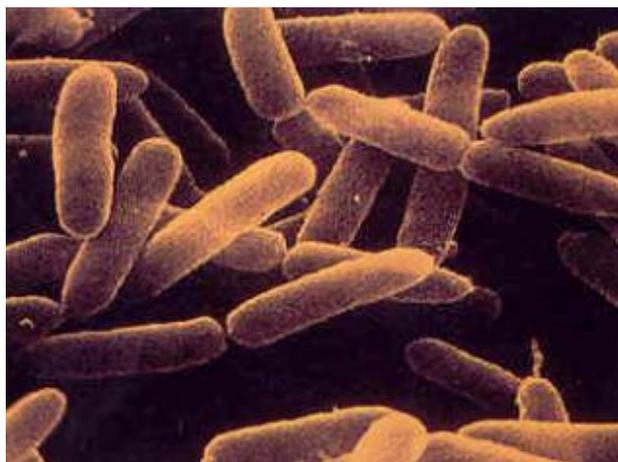
- **Microscopia electrónica de transmissão (TEM):** Nesta técnica os electrões são usados em substituição dos raios de luz e os electromagnetes funcionam como lentes, sendo todo o sistema operado em vácuo, pois caso contrário os electrões

seriam absorvidos pelas partículas do ar. Os electrões emitidos atravessam a amostra, o que implica que esta tenha de ser previamente preparada; para tal a amostra deve ser seccionada num slide fino e rígido, permitindo, assim, que sejam observadas estruturas internas da célula, como núcleo e mitocôndrias. O poder de resolução é muito mais elevado do que em microscopia óptica, o que permite observar espécies de baixo peso molecular, como proteínas e ácidos nucleicos, ou mesmo átomos (Madigan *et al.*, 1997, Gerhardt *et al.*, 1981, <http://www.denniskunkel.com>).



**Figura I.9.** Fotografia de bactérias em forma de bacilo, obtidas por microscopia electrónica de transmissão (Nester *et al.*, 1998)

- **Microscopia electrónica de varrimento (SEM):** Neste caso as amostras têm de ser cobertas por um filme fino de um metal pesado, normalmente ouro. Em SEM um electrão é emitido directamente para a amostra e reflectido pela sua superfície, obtendo-se uma imagem a 3 dimensões. Os electrões dispersos pelo metal são recolhidos e activam um monitor de visualização para produzir a imagem. Embora a amplificação seja muito boa, esta técnica apenas permite a visualização da superfície do objecto (Madigan *et al.*, 1997, Gerhardt *et al.*, 1981).



**Figura I.10.** Fotografia de bactérias em forma de bacilo, obtidas por microscopia electrónica de varrimento (Nester *et al.*, 1998).

### Microscopia de fluorescência

A microscopia de fluorescência foi utilizada neste trabalho como técnica auxiliar da técnica principal desenvolvida para monitorizar biofilmes (voltametria cíclica), ou seja, este tipo de microscopia foi utilizado para observar o comportamento do biofilme antes e após a aplicação da técnica de voltametria cíclica. Por esta razão, julga-se conveniente realizar uma descrição mais profunda da microscopia de fluorescência.

A fluorescência é um tipo de luminescência em que é emitida luz, num curto intervalo de tempo, por moléculas que absorveram luz (Taylor *et al.*, 1989). A fluorescência ocorre quando o electrão excitado regressa à sua órbita de energia (isto é, a um nível energético mais baixo) emitindo um fóton de luz (Nivens *et al.*, 1995, Angell *et al.*, 1993).

As amostras (células) são normalmente tratadas com fluorocromos e irradiadas com raios ultravioleta, emitidos por uma lâmpada de arco de mercúrio ou de tungsténio. A luz

emitida passa então por um filtro de excitação que transmite apenas a radiação de excitação, a qual é direccionada para a amostra, que pode estar num nível inferior (microscopia de fluorescência de luz transmitida) ou superior (microscopia de fluorescência de luz incidente ou epifluorescência). A imagem da amostra é obtida pela luz que esta emite. Salienta-se o facto de que o filtro transmite luz de comprimento de onda largo e retêm a luz de comprimento de onda curto, protegendo, deste modo, os olhos e a película fotográfica. Os fluorocromos são substâncias muito sensíveis à luz branca, perdendo rapidamente fluorescência; para evitar a deterioração das amostras, estas devem ser sempre manuseadas no escuro, mesmo durante a observação ao microscópio (Gerhardt *et al.*, 1981, Prescott *et al.*, 1999, Singleton & Sainsbury, 2001).

Existem vários tipos de corantes que podem ser usados em microscopia de epifluorescência, tais como CTC (5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride), Acridine Orange (AO), DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) e LIVE/DEAD (LD), entre outros.

O CTC é um corante que fluoresce de vermelho quando é reduzido química ou biologicamente. Deste modo, apenas é possível visualizar células vivas, as quais aparecem coradas de vermelho (Yu *et al.*, 1994; Maukonen *et al.*, 2000). Os fluorocromos Acridine orange (AO) e DAPI identificam bactérias vivas e mortas, mas não as diferenciam, tendo como base a cor (no caso de se utilizar Acridine orange as células são coradas de laranja, enquanto que com DAPI aparecem verdes), tamanho e forma, o que é importante na distinção de bactérias, uma vez que não existe nenhum fluorocromo específico para cada tipo de células bacterianas (Kepner *et al.*, 1994).

O LIVE/DEAD BacLight Viability Kit, desenvolvido por Molecular Probes Inc., é composto por uma mistura de dois fluorocromos que se ligam aos ácidos nucleicos das células: SYTO 9 e propidium iodide (PI). Estes diferem entre si devido às suas características espectrais e à sua capacidade de penetrarem em células viáveis. De facto, enquanto o SYTO 9 é capaz de corar todas as células (de verde), o propidium iodide apenas consegue penetrar células cuja membrana esteja danificada (células inviáveis ou mortas), corando-as de vermelho, ou seja, a utilização deste corante permite distinguir células viáveis (que aparecem coradas de verde) de células não viáveis (que fluorescem vermelho); o fundo normalmente não é fluorescente, não interferindo deste modo com a observação (Maukonen *et al.*, 2000; Boulos *et al.*, 1999).

Os fluorocromos BacLight têm várias vantagens relativamente aos outros corantes, nomeadamente por serem fidedignos, rápidos e simples, permitindo contar células viáveis e totais num só passo. As amostras são fáceis de ler, devido ao elevado contraste entre a cor verde das células viáveis e a vermelha das células mortas (Boulos *et al.*, 1999).

### **I.2.2. Técnicas espectroquímicas**

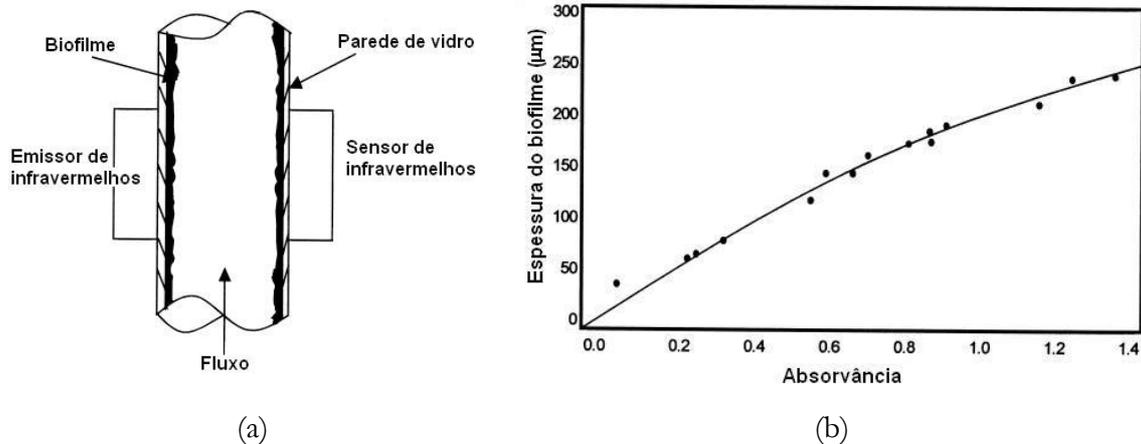
Este tipo de técnica baseia-se no facto de que a matéria é capaz de absorver, dispersar e/ou emitir luz que incida sobre si. Este tipo de interacções pode fornecer informações qualitativa e quantitativa sobre os sistemas biológicos. Embora a absorção de radiação de elevada energia (raios gama, raios X e ultravioleta) possa causar fotodecomposição de biomoléculas ou mesmo morte celular, a radiação na região visível, infravermelhos ou na

frequência rádio tem sido largamente utilizada em espectrometria de absorção para detectar microrganismos vivos em ambientes aquosos (Nivens *et al.*, 1995).

- **Espectrometria de absorção de Infravermelhos (IV):** Este método é utilizado para estudar as interacções que ocorrem entre a radiação IV e a estado energético das moléculas. De um modo geral, a radiação IV é absorvida por uma molécula quando a energia da radiação é igual à que seria necessária para promover o seu estado de excitação vibracional. A quantidade de radiação absorvida é proporcional ao número de moléculas presentes. O facto da absorção depender da frequência origina um modelo ou espectro de absorvência único definido pela estrutura da molécula, ou seja, o espectro infravermelho de qualquer estrutura, como por exemplo, de células microbianas, é altamente específico, funcionando como uma espécie de impressão digital. Para sistemas complexos, como por exemplo biofilmes, o espectro é a soma de todas as assinaturas espectrais de cada biomolécula presente na amostra (Naumann *et al.*, 2000, Nivens *et al.*, 1995). De facto, a frequência de radiação que é absorvida por uma molécula é maioritariamente determinada pelos seus grupos de átomos específicos (grupos funcionais) e não tanto pela estrutura final da molécula. A frequência individual de radiação que é absorvida por cada grupo de átomos é definida como frequência característica, as quais têm sido compiladas de forma a auxiliar na identificação das bandas de absorvência de IV (Lin-Vien *et al.*, 1991, Naumann *et al.*, 1991).

O princípio do monitor de infravermelhos está ilustrado na Figura I.11. Este monitor está projectado para determinar a acumulação de biofilme numa tubagem, dentro do qual circula o fluido contaminado por microorganismos. A radiação

infravermelha dum emissor passa através de uma parede de vidro transparente, através do biofilme e da parede de vidro do próprio sensor e é recolhida por este, que absorve a radiação que não foi absorvida. Para calibrar o sistema recolhe-se em primeiro lugar a radiação após passar pelo sistema, com o fluido em circulação, antes de se começar a formar biofilme (Tinham & Bott, 2003).

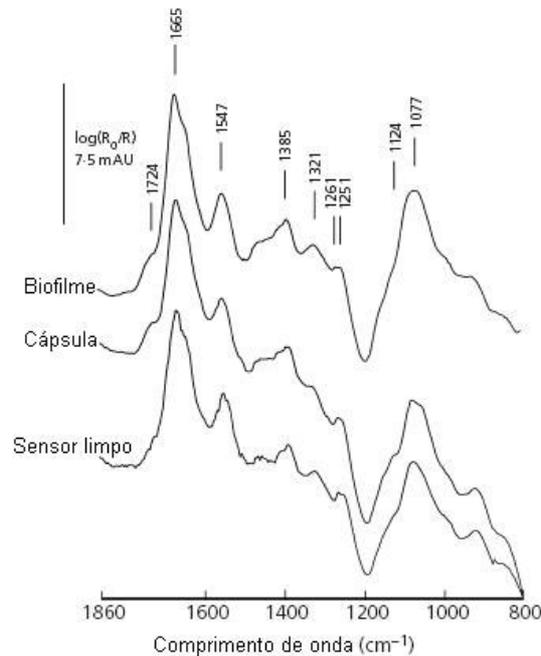


**Figura I.11.** Monitor de infravermelhos: (a) esquema do monitor; (b) Correlação entre a espessura do biofilme e o valor da absorvência obtido (Tinham & Bott, 2003).

Este monitor consegue operar em contínuo, dando informação sobre a acumulação do depósito ao longo do tempo (Nível 1, segundo Fleming).

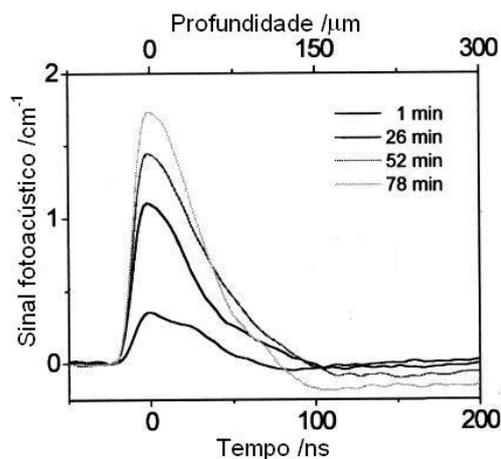
A aplicação da transformada de Fourier à espectroscopia de IV, veio desenvolver uma outra técnica (espectroscopia de infravermelhos – transformada de Fourier (FTIR)), uma vez que apresenta várias vantagens relativamente à espectroscopia IV convencional: aumento da velocidade de análise, melhoramento do sinal quando há ruído, frequência mais exacta e melhoramento do sinal de saída com a mesma

resolução (Beech *et al.*, 1999, Naumann *et al.*, 2000, Nivens *et al.*, 1995) (Nível 2, segundo Fleming).



**Figura I.12.** Reflectância – absorvência do espectro FTIR de exopolímeros produzidos por *Pseudomonas* sp. em crescimento contínuo (Beech *et al.*, 1999).

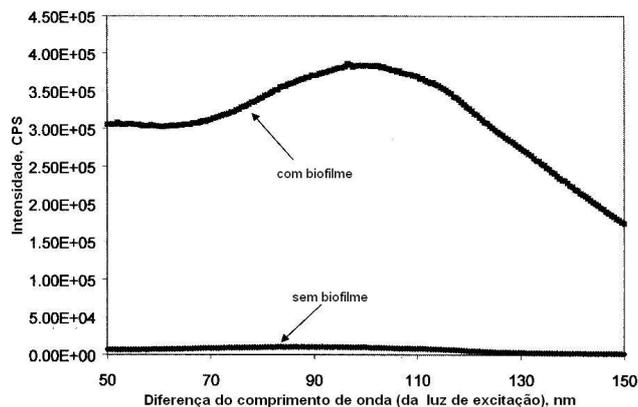
- **Espectroscopia fotoacústica:** É também uma técnica que permite detectar em linha e de forma não destrutiva a formação de biofilmes. Tem como princípio base o facto de que a energia da radiação electromagnética absorvida no interior de uma amostra pode ser convertida em calor, por processos de relaxamento não radiactivos que ocorrem nessa amostra. É então originada uma curva de pressão, a qual depende da expansão térmica do meio, e que pode ser detectada em microfones ou por transdutores piezoeléctricos (Rosencwaig, 1980, Schmid *et al.*, 2003) (Nível 1, segundo Fleming).



**Figura I.13.** Perfil do sinal fotoacústico ( $\lambda = 532$  nm) de um biofilme que se está a desenvolver à superfície do sensor (Schmid *et al.*, 2003).

- **Espectroscopia de fluorescência:** Como já foi referido, quando uma molécula absorve radiação visível ou ultravioleta, é promovida a transição de um electrão do estado electrónico mais baixo para o estado electrónico excitado. Quando o electrão volta ao seu estado inicial é emitido um fóton, provocando fluorescência. Normalmente este fóton tem uma energia inferior (maior comprimento de onda) à da radiação que provocou a excitação, uma vez que a molécula perde energia vibracional no estado excitado. Muitas biomoléculas, tais como triptofano, fenilalanina, tirosina, pigmentos fotossintéticos, riboflavina, NAD reduzido e oxidado, etc., emitem uma fluorescência capaz de ser detectada. O espectro de fluorescência pode fornecer informações quantitativas e qualitativas da estrutura (Nivens *et al.*, 1995). A fluorescência é detectada em aparelhos denominados por fluorímetros, os quais são fundamentalmente constituídos por uma fonte de radiação, no qual é possível seleccionar o comprimento de onda de excitação, e um detector da fluorescência emitida pela amostra a analisar (Nivens *et al.*, 1995) (Nível 2, segundo Fleming).

Uma técnica de fluorescência também muito utilizada é a sonda de fibra óptica. A fibra óptica detecta marcadores bioquímicos que apenas estão presentes em células vivas. A extremidade deste sensor é introduzido cuidadosamente junto do biofilme e emite uma luz de excitação que incide nas células, causando autofluorescência das células. A autofluorescência retorna através da mesma fibra óptica e é captada por fotodetectores. Quando existe biofilme a luz emitida é diferente (tem maior intensidade) daquela que é emitida quando não há presença de células. Por outro lado, quanto maior for a quantidade de células presentes, maior é a intensidade da fluorescência emitida (MacCraith, 1993, Philip-Chandy *et al.*, 2000, Saxena *et al.*, 2002a, Saxena *et al.*, 2002b) (Nível 3, segundo Fleming).

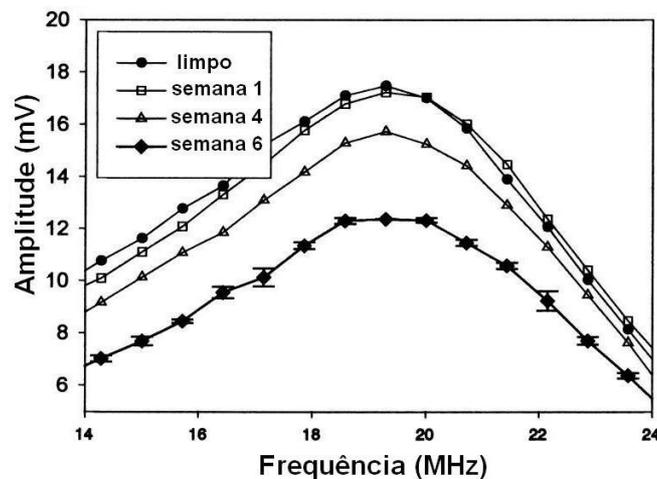


**Figura I.14.** Intensidade da luz emitida por uma superfície sem biofilme e colonizada por um biofilme (Saxena *et al.*, 2002b)

- **Bioluminescência:** A bioluminescência é a luz produzida por certos organismos, tais como pirilampos e alguns tipos de bactérias, e assim utilizada como uma forma espectroscopia de emissão de luz. Contudo, ao contrário do que acontece na fluorescência não necessita de uma fonte de radiação, uma vez que *in vivo*, as reacções bioquímicas inerentes ao organismo, induzem à excitação de biomoléculas

com subsequente emissão de fótons (Nivens *et al.*, 1995, Angell *et al.* 1994) (Nível 3, segundo Fleming).

- **Técnica de reflectometria de frequência ultra-sónica:** É uma técnica relativamente recente de detecção de biofilmes, de forma não destrutiva. Nesta técnica é utilizado um microscópio acústico para detectar o biofilme. A detecção do biofilme é realizada a partir de modificações nas características acústicas reflectidas. À medida que o biofilme se forma verifica-se uma variação do sinal de amplitude da frequência, ou seja, quanto mais velho é o biofilme e conseqüentemente quanto maior é a sua espessura, menor é a amplitude do sinal emitido, como mostra o gráfico da Figura I.15 (Fonseca *et al.*, 2002).

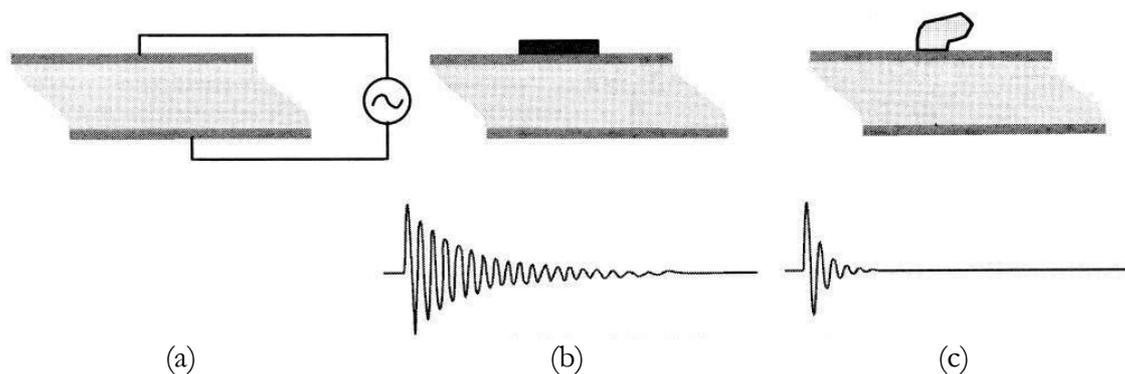


**Figura I.15.** Variação da amplitude com a frequência para cada idade de biofilme, obtida para um sensor reflectometria de frequência ultra-sónica ( Fonseca *et al.*, 2002).

### I.2.3. Técnicas piezoeléctricas

A aplicação de campos eléctricos em alguns materiais (como determinados cristais, cerâmicas, polímeros e plásticos) pode originar realinhamento dos átomos, resultando em deformações – tais como, flexões, curvas, contracções e expansões. Este fenómeno é conhecido por efeito piezoeléctrico (Cady, 1964). Um campo eléctrico alternado pode, por outro lado, causar uma deformação de trás para a frente ou movimentos vibracionais no seio do material, sendo esta a base dos sensores piezoeléctricos (Nivens *et al.*, 1995) (Nível 1, segundo Fleming).

A Microbalança de Cristal de Quartzo (MCQ) é um sensor piezoeléctrico que mede a variação da frequência de ressonância provocada por alterações na massa do material da superfície de discos de quartzo, resultando num método bastante sensível (Nivens *et al.*, 1995, Rudh *et al.*, 2002, Hartman *et al.*, 2002). Uma deposição de massa à superfície do eléctrodo irá causar uma diminuição da frequência de vibração (Figura I.16), a qual será monitorizada com um contador simples de frequência (Marx *et al.*, 2001, Rudh *et al.*, 2002, Hartman *et al.*, 2002). Se o material depositado tiver propriedades acústicas similares às do quartzo, a alteração da massa é proporcional à variação da frequência (Hartman *et al.*, 2002) (Nível 1, segundo Fleming).



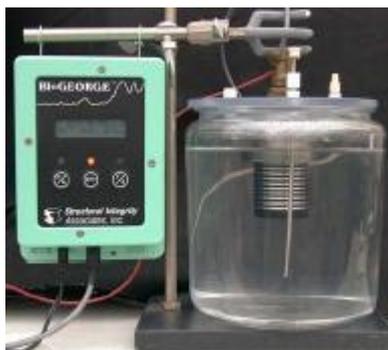
**Figura I.16.** (a) Ilustração esquemática do princípio de funcionamento do QCM e variação da frequência obtida: (b) curva de decaimento quando um corpo de massa rígida está aderido e (c) curva de decaimento quando o corpo aderido é de massa viscosa (Rudh *et al.*, 2002).

#### I.2.4. Técnicas electroquímicas

As técnicas electroquímicas são uma outra forma não destrutiva e contínua de monitorizar biofilmes. Nesta técnica estudam-se as variações do potencial ao longo do tempo. Podem dividir-se em três tipos:

- **Eléctrodos de metal de grande área:** As variações de potencial ocorrem em eléctrodos de elevada área metálica, tipicamente superior a 1 cm de diâmetro. O potencial é medido como uma diferença de potencial entre o eléctrodo onde ocorre deposição de matéria (eléctrodo de trabalho) e um eléctrodo de referência. São a química interfacial e a química do eléctrodo que determinam o potencial do sistema. A presença de biofilme é capaz de alterar a química interfacial e, deste modo, alterar o potencial do sistema, cuja magnitude e direcção está dependente do tipo de metal, do consórcio e tipo de microrganismos e condições ambientais (temperatura, luz, salinidade, etc.) (Nivens *et al.*, 1995) (Nível 1, segundo Fleming).

- **Microelétrodos de análise selectiva:** Os microelétrodos têm uma dimensão normalmente inferior a 50  $\mu\text{m}$  e são utilizados para determinar a actividade (concentração) de várias espécies químicas, a partir de variações na intensidade de corrente ou no potencial dentro do sistema de eléctrodos (Nivens *et al.*, 1995). São capazes de detectar oxigénio (Baumgåard & Lübbers, 1983, Revsbech, 1989), pH (Revesbech & Jorgensen, 1986, vanHoudt *et al.*, 1992), nitratos (de Beer & Sweerts, 1989), glucose (Cronenberg *et al.*, 1991), etc. A utilização deste tipo de eléctrodos em sistemas em linha tem sido muito útil para a compreensão de muitos processos fisiológicos que ocorrem no interior dos biofilmes (Nivens *et al.*, 1995) (Nível 2, segundo Fleming).
- **Biogeorge:** O Biogeorge<sup>™</sup> é um sistema electroquímico de monitorização da actividade do biofilme, o qual tem sido desenvolvido para monitorizações em linha (Garrett & Licina, 1995, Licina *et al.*, 1993). O sensor consiste numa série de discos metálicos onde estão inseridos dois eléctrodos nominalmente idênticos e electricamente isolados. Um dos eléctrodos é polarizado relativamente ao outro por um curto período de tempo, normalmente um hora por dia. A aplicação deste potencial de polarização causa uma corrente que circula entre os eléctrodos. Quando um biofilme se acumula nos sensores, origina uma via mais condutora para a corrente aplicada, aumentando significativamente o fluxo de corrente em relação ao valor de base (Bruijs *et al.*, 2001, <http://geothermal.id.doe.gov>) (Nível 1, segundo Fleming).



**Figura I.17.** Esquema de um monitor de Biogeochemistry™ (<http://geothermal.id.doe.gov>).

### I.2.5. Técnica de eléctrodos vibrantes de varrimento

Existem pequenos microeléctrodos de platina que são utilizados para varrer a superfície metálica de cupões, onde cresceu biofilme, de forma a determinar o campo de potencial. Nesta técnica, é inserido um eléctrodo vibrante de platina 100  $\mu\text{m}$  acima da superfície dos cupões, criando um sinal de potencial alternado, o qual pode ser filtrado e transformado em ruído. Obtém-se então um mapa que mostra as regiões anódicas e catódicas, estando as regiões anódicas relacionadas com corrosão (Angell *et al.*, 1994, Nivens *et al.*, 1995).

### I.3. Voltametria Cíclica

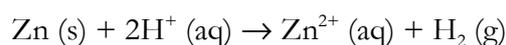
A voltametria cíclica foi a técnica electroquímica seleccionada para desenvolver um monitor no decurso deste trabalho. Devido à complexidade desta área, torna-se, assim, fundamental fazer uma pequena introdução ao que é a electroquímica.

#### I.3.1. Conceitos fundamentais em electroquímica

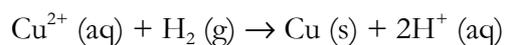
A electroquímica consiste em utilizar a electricidade para promover alterações químicas e/ou em utilizar reacções químicas para produzir electricidade, sendo, em qualquer dos casos, o reagente principal o electrão. As reacções electroquímicas ocorrem em dispositivos denominados células electroquímicas. Estas podem dividir-se em células galvânicas ou electrolíticas (Atkins & Beran, 1992, Brady, 1990, Chang, 1991).

Nas células galvânicas ocorrem reacções químicas espontâneas, que são aproveitadas para produzir corrente eléctrica. O seu nome deriva de Luigi Galvani, fisiologista italiano que estudou a electricidade a partir da observação da reacção dos músculos de sapo quando lhes era aplicada corrente. Uma célula galvânica é constituída por dois eléctrodos (condutores metálicos que estabelecem o contacto eléctrico com o conteúdo da célula) e por um electrólito (meio condutor iónico). Nestas células, a oxidação ocorre num eléctrodo (ânodo), para o qual as espécies que são oxidadas libertam electrões. A redução ocorre no outro eléctrodo (cátodo), o qual liberta electrões que são captados pelas espécies reduzidas (Atkins & Beran, 1992, Brady, 1990, Chang, 1991).

Nestas células é muito importante considerar o potencial, que representa a capacidade que a reacção tem de atrair ou repulsar os electrões através do circuito. Por esse motivo, este potencial é muitas vezes denominado por força electromotriz. O potencial padrão de redução refere-se ao potencial quando todas as espécies se encontram nos seus estados padrão, geralmente 1 atm para gases e 1 mol L<sup>-1</sup> para iões. Por outro lado, o potencial padrão de redução de um eléctrodo é o potencial padrão relativamente ao eléctrodo de hidrogénio. Isto permite determinar em que sentido uma reacção é espontânea; assim, quando o potencial padrão de redução é negativo significa que, nas condições padrão, essa espécie tem tendência a reduzir os iões de hidrogénio a hidrogénio gasoso. Por exemplo, no caso do zinco, cujo potencial padrão de redução é -0.76 V, a reacção espontânea é:



Por outro lado, um potencial padrão de redução positivo indica que o hidrogénio tende a reduzir os iões dessa espécie. No caso do cobre, cujo potencial padrão de redução é +0.34 V, a reacção espontânea ocorre no sentido:



As reacções redox que não ocorrem espontaneamente podem ser promovidas electroquimicamente. Uma reacção que ocorra no sentido não-espontâneo através da passagem de uma corrente eléctrica designa-se por electrólise. Estas reacções ocorrem no interior de células electrolíticas, nas quais a corrente eléctrica é proveniente de uma fonte externa, de forma a conduzir a reacção no sentido não espontâneo. Estas células diferem das células galvânicas, principalmente no facto dos dois eléctrodos compartilharem o

mesmo compartimento e das concentrações e pressões das espécies se afastarem bastante dos valores padrão (Atkins & Beran, 1992, Brady, 1990, Chang, 1991).

Para promover a electrólise é necessário que a fonte de corrente externa produza um potencial superior àquele que a reacção inversa (reacção espontânea) produz. Por exemplo, no caso da água o potencial para a reacção espontânea é  $-1.23$  V. Para que a reacção inversa ocorra:



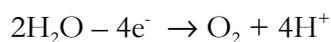
é necessário aplicar uma corrente no mínimo de  $1.23$  V. Deve, contudo, ser aplicado um potencial adicional, cujo valor depende do eléctrodo utilizado. Este potencial denomina-se por sobretensão. No caso dos eléctrodos de platina o valor de sobretensão para a produção de água a partir de hidrogénio e oxigénio é cerca de  $0.6$  V, ou seja é necessário cerca de  $1.8$  V ( $0.6 + 1.23$  V) para se dar a electrólise da água. Quando existe mais do que uma espécie redutível/oxidável em solução, aquela que tem maior potencial de redução/oxidação é a que é preferencialmente reduzida/oxidada (Atkins & Beran, 1992, Brady, 1990, Chang, 1991).

Industrialmente, a electrólise pode ser utilizada para produzir alumínio e magnésio, extrair metais dos seus sais, preparar cloro, fluorina e hidróxido de sódio, na purificação de cobre e em processos de cromagem (Atkins & Beran, 1992, Brady, 1990, Chang, 1991).

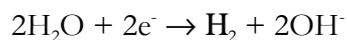
### I.3.2. Cinética das reacções de eléctrodo

#### ❖ Natureza das reacções de eléctrodo

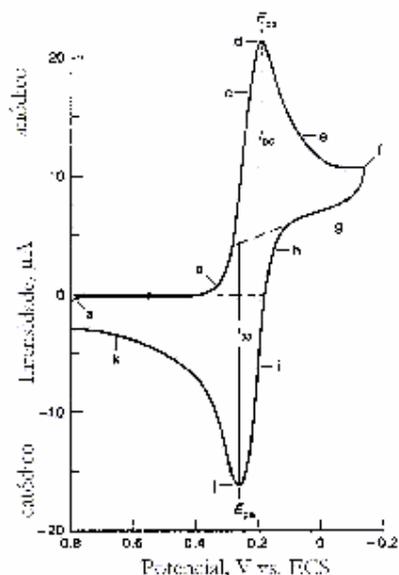
A reacção de eléctrodo é um processo químico heterogéneo que envolve a transferência de electrões de ou para uma superfície, a qual pode ser um metal ou um semiconductor. Esta reacção pode ser um processo anódico onde as espécies são oxidadas pela perda de electrões do eléctrodo. Por exemplo,



No caso de reacções catódicas as espécies são reduzidas pelo ganho de electrões no eléctrodo



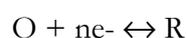
Por convenção a intensidade de corrente é positiva nos processos anódicos e negativa nos catódicos, como é possível ver na Figura I.18. Salienta-se ainda o facto de que quando ocorre uma reacção anódica no eléctrodo de trabalho ocorre a reacção catódica no secundário e vice-versa (Greef *et al.*, 1993, Stewart *al.*, 1999, Skoog & Leary, 1992).



**Figura I.18.** Voltamograma cíclico obtido para uma solução 6.0 mM  $K_3Fe(CN)_6$  e 1.0 M  $KNO_3$  (Skoog & Leary, 1992).

Tal como foi referido anteriormente, os eléctrodos encontram-se ligados a um circuito externo que permite o controlo dos eléctrodos, isto é, a extensão e o sentido em que uma reacção de eléctrodo ocorre. De facto, para que ocorra uma redução o potencial tem de ser suficientemente negativo, de forma a assegurar que os electrões a transferir tenham a energia mínima para que a transferência ocorra. Por outro lado, se é pretendida a ocorrência de uma oxidação, é necessário a aplicação de um potencial (em volts) suficientemente positivo, de forma a que o nível desocupado no eléctrodo tenha uma energia máxima e, deste modo, possa receber os electrões das espécies em solução (Brett & Brett, 1993).

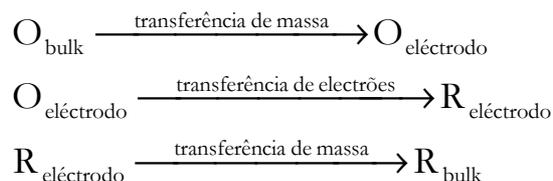
A equação geral de transferência de electrões numa redução pode ser representada da seguinte forma:



onde O é a espécie oxidada e R a espécie reduzida. No caso de uma oxidação, então a equação toma a seguinte forma:



No entanto, as reacções de eléctrodo não podem ser consideradas de uma forma tão simplista, devendo ter-se em consideração outros factores, tais como o facto de o reagente poder ser inorgânico, orgânico ou biorgânico, poder ser sólido (incluindo o próprio eléctrodo), gasoso ou a existência de espécies dissolvidas, entre outros factores. Deste modo, as reacções de eléctrodo ocorrem em vários passos fundamentais, tais como transferência de electrões e transporte de massa. Por exemplo, a equação de redução pode ocorrer em três passos (Greef *et al.*, 1993, <http://www.bath.ac.uk>, Pletcher, 1991):



Os passos fundamentais que também podem ocorrer incluem:

**Reacções químicas:** A transferência de electrões pode originar um composto instável no meio electrolítico, o qual, por essa razão, dará origem ao produto final, mais estável.

**Adsorção:** As reacções ocorrem na superfície do eléctrodo e como tal é necessário que reagentes, intermediários e produtos adsorvam à superfície do eléctrodo, para que a reacção de oxidação ou redução ocorra.

**Formação de fase:** Por vezes as reacções que ocorrem nos eléctrodos são acompanhadas pela mudança de fase dos produtos, como por exemplo formação de bolhas de gás (Greef *et al.*, 1993, Pletcher, 1991).

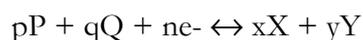
#### ❖ Transferência de electrões

Para que uma reacção de eléctrodo ocorra é fundamental que seja aplicado ao eléctrodo um potencial (Volt). De facto, se considerarmos as unidades que estão na base do volt

$$\text{Volt} = \frac{\text{Joule}}{\text{Coulomb}}$$

Verifica-se que 1 volt é a energia (em Joule) necessária para mover carga (em Coulomb). Isto significa que uma vez que as cargas possuem energia, então a aplicação de uma potencial pode alterar a energia dos electrões que estão inseridos num eléctrodo de metal ou semiconductor, originando a que esse eléctrodo ceda ou receba electrões (Greef *et al.*, 1993, <http://www.bath.ac.uk>).

Quando as reacções de eléctrodo atingem o equilíbrio não há variação na concentração das espécies oxidadas e reduzidas. Este equilíbrio é normalmente detectado a partir do valor do potencial do eléctrodo de trabalho, o qual passa a ser constante. Para a reacção de eléctrodo geral:



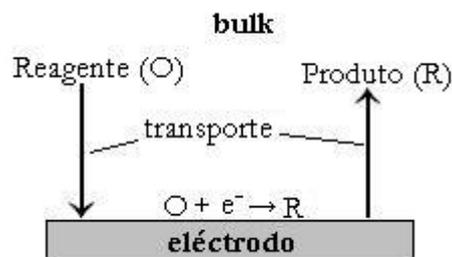
o valor do potencial no equilíbrio ( $E_e$ ) pode ser calculado a partir da equação de Nerst:

$$E_e = E_e^0 + \frac{2.3RT}{nF} \log \frac{(a_p)^p (a_Q)^q}{(a_X)^x (a_Y)^y}$$

em que  $E_e^0$  é o potencial padrão de redução (potencial de equilíbrio em que todos os reagentes e produtos estão nos seus estados padrão),  $R$  é a constante dos gases ideais,  $T$  a temperatura,  $F$  a constante de Faraday e  $a$  concentração das várias espécies (Greef *et al.*, 1993).

### ❖ Transporte de massa

Tal como foi visto anteriormente, uma reacção electroquímica típica envolve a transferência de carga entre o eléctrodo e as espécies em solução, a qual se realiza em vários passos, como está esquematizado na Figura I.19.



**Figura I.19.** Esquema do transporte dos reagentes e produtos do seio da solução para a superfície do eléctrodo e deste para a solução, respectivamente (<http://www.bath.ac.uk>).

De uma forma geral, nos sistemas electroquímicos é necessário considerar três modelos de transporte de massa: difusão, convecção e migração.

A **difusão** é o movimento de espécies a favor do gradiente de concentração, isto é, de meios mais concentrados para meios mais diluídos. Deste modo, as espécies que se formam vão sendo removidas da superfície do eléctrodo (onde estão mais concentradas) e as espécies que se gastam vão sendo transportadas para a mesma superfície (onde estão em menor concentração do que no seio da solução electrolítica). A difusão é o processo de transferência de massa mais significativo na maioria das reacções de electrólise (Greef *et al.*, 1993, <http://www.bath.ac.uk>, Pletcher, 1991).

A **migração** é o movimento de espécies carregadas a favor de um gradiente de potencial (campo eléctrico), sendo este o mecanismo através do qual as cargas passam através do electrólito. É a forma de transferência de massa que está directamente dependente da aplicação de potencial aos eléctrodos, onde é criada uma interface carregada nos eléctrodos. Nesta interface qualquer espécie carregada é atraída ou repelida pelas forças electrostáticas. É deste modo, necessário haver um equilíbrio entre a corrente de electrões que passa no circuito externo e os iões que passam na solução entre os eléctrodos (os catiões para o cátodo e os aniões para o ânodo) (Greef *et al.*, 1993, <http://www.bath.ac.uk>, Pletcher, 1991).

Finalmente, a **convecção** é o movimento das espécies devido a forças mecânicas. Pode ser devida a vibrações, agitação ou borbulhamento de gás. Contudo, é uma situação dificilmente reprodutível e, conseqüentemente, as experiências devem ser preferencialmente realizadas sem que haja convecção, de forma a que sejam efectuadas sempre nas mesmas condições de operação (Greef *et al.*, 1993, <http://www.bath.ac.uk>, Pletcher, 1991).

As concentrações das espécies oxidadas e reduzidas, são diferentes na superfície do eléctrodo e no seio da solução electrolítica. Existe uma zona perto da superfície do eléctrodo (denominada camada limite), a qual vai aumentando com o tempo até encontrar um estado estacionário, que demora cerca de 10 segundos a ser alcançado. Isto significa que até se atingir este estado estacionário a variação das concentrações perto da superfície do eléctrodo é resultado de difusão, enquanto que depois deste estado ser atingido as concentrações passam a ser controladas por convecção (se existir) (Greef *et al.*, 1993).

O tipo de transferência que ocorre nas experiências electroquímicas é determinante da reversibilidade das reacções. De facto, se uma reacção é controlada pelo transporte de massa, a reacção é reversível, pois o transporte das espécies para a superfície do eléctrodo é lenta comparada com o transporte electrónico. Pelo contrário, se a reacção é controlada pela transferência de electrões, então ocorre uma reacção irreversível, à qual não pode ser aplicada a lei de Nerst. Todavia, uma reacção pode ser inicialmente controlada pela transferência de electrões e posteriormente pela transferência de massa (Greef *et al.*, 1993; Pletcher, 1991).

#### ❖ Aplicabilidade dos eléctrodos

Os eléctrodos são cada vez mais utilizados em investigação *in vivo* e *in vitro*. Nos últimos anos a sua aplicação na biologia e medicina tem alcançado grande destaque, nomeadamente no que diz respeito a eléctrodos selectivos de iões (Schlue *et al.*, 1997, Günzel & Schlue, 1997, Lewandowski *et al.*, 1993, Scheller *et al.*, 1997, Holthoff & Witte, 1997), na detecção de capacidade antioxidante e de compostos de baixo peso molecular em plasma ou soro de

doentes renais, permitindo avaliar a eficácia da hemodiálise (Psotová *et al.*, 2001), na imobilização de sondas de DNA ou enzimas em eléctrodos, para identificação de bactérias e processos bacterianos (Cordes & Rechnitz, 1999, Poitry *et al.*, 1997), no desenvolvimento de sondas que permitam detectar compostos e medir o pH no interior de biofilmes (de Beer *et al.*, 1997, Horn, 1994, Ruan *et al.*, 2002; VanHoudt *et al.*, 1992, Xu *et al.*, 1998 ) e na detecção de crescimento de células em suspensão (Subrahmanyam *et al.*, 2001a, Subrahmanyam *et al.*, 2001b).

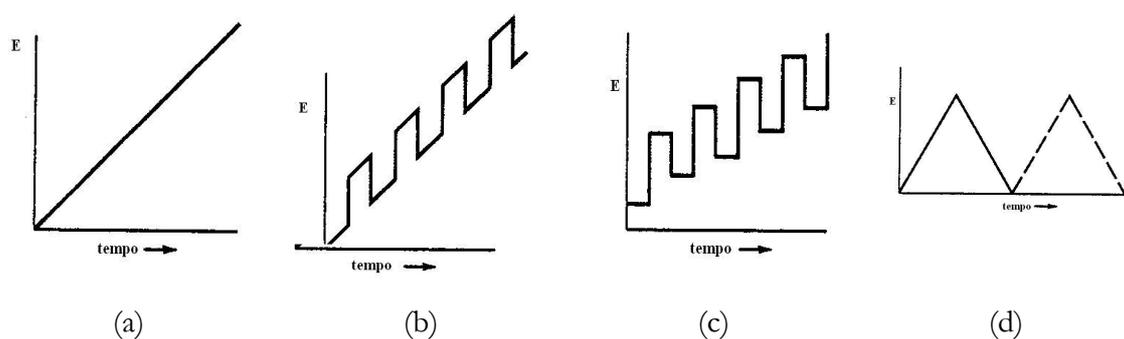
### **I.3.3. Tipos de voltametria**

Define-se voltametria como sendo uma técnica electroquímica, cuja informação sobre a solução a analisar é obtida a partir da variação da intensidade de corrente, em função do potencial aplicado, que em determinadas condições promove a polarização do eléctrodo de trabalho, isto é, é aplicado um potencial ou série de potenciais, monitorizando-se em seguida a intensidade de corrente correspondente (<http://www.bath.ac.uk>, Skoog & Leary, 1992, Pletcher, 1991).

A voltametria é amplamente usada em química inorgânica, física e biológica com objectivos não analíticos, incluindo estudos fundamentais dos processos de oxidação e redução em vários meios, processos de adsorção em superfícies e mecanismos de transferência de electrões em superfícies de eléctrodos modificados quimicamente (Skoog & Leary, 1992).

Em voltametria, aplica-se uma variação de potencial ao eléctrodo ou microeléctrodo. A perturbação origina uma resposta característica na forma de intensidade de corrente, na qual o método é baseado. De facto, o perfil do potencial aplicado define as quatro formas

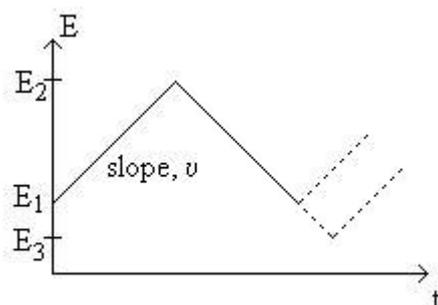
de voltametria mais comuns, como pode ser visto na Figura I.20. De uma forma sucinta tem-se: o **varrimento linear**, que origina a voltametria hidrodinâmica e a polarografia. Neste caso o potencial aplicado na célula aumenta em função do tempo, começando num potencial inicial e terminando num potencial final, como pode ser observado na Figura I.20 (a) (Skoog & Leary, 1992, <http://www.bath.ac.uk>, <http://www-biol.paisley.ac.uk>). A perturbação em impulso pode ser um **impulso diferencial** ou uma **onda quadrada**, como se pode verificar na Figura I.20. (b) e (c). No primeiro caso temos a polarografia de impulso diferencial e no segundo a voltametria de onda quadrada. Em ambos os casos a intensidade de corrente é avaliada em diversos tempos durante o curso de vida desses impulsos (Skoog & Leary, 1992). Finalmente, a voltametria cíclica fundamenta-se por uma variação do potencial de **forma triangular**, representada na Figura I.20 (d), e pode ser considerada como uma extensão da voltametria de varrimento linear. Neste caso o potencial é varrido entre dois valores, aumentando, primeiro, linearmente até um valor máximo e, posteriormente, decrescendo linearmente, com o mesmo declive, até ao valor original (<http://www.bath.ac.uk>, Fisher, 1996, Skoog & Leary, 1992, Pletcher, 1991).



**Figura I.20.** Variação do potencial ao longo do tempo em voltametria: a) varrimento linear; b) impulso diferencial; c) onda quadrada e d) forma triangular (Skoog & Leary, 1992).

### I.3.4. Variáveis mais importantes em voltametria cíclica

Tal como foi referido anteriormente em voltametria cíclica o potencial varia linearmente em função do tempo, tendo a perturbação a forma triangular (Figura I.21). De uma forma geral, o potencial é varrido entre os limites de potencial, entre os quais ocorrem as reacções de eléctrodo antes de se inverter o sentido do varrimento, de forma a que o produto resultante da transferência de electrões seja estável ou então de forma a que os intermediários da reacção ou o produto final sejam electroactivos. Para tal é possível controlar os limites de potencial ( $E_1$ ,  $E_2$  e  $E_3$ ), a direcção inicial do varrimento (pode ser varrimento directo ou inverso) e a velocidade de varrimento ( $v$ ), como se pode observar na Figura I.21 (Pletcher, 1991). A grande vantagem desta técnica é a de permitir que os produtos resultantes da transferência de electrões ocorrida no varrimento anterior voltem ao seu estado primitivo (reagentes) no varrimento seguinte (<http://www-biol.paisley.ac.uk>, Pletcher, 1991).



**Figura I.21.** Perturbação de forma triangular, usado em voltametria cíclica (Pletcher, 1991).

Dos três limites de potencial acima referidos, dois definem as reacções que podem ocorrer no eléctrodo. Normalmente as experiências são iniciadas num potencial em que não haja

reações de eléctrodo (Intensidade de corrente = 0) e varridas no sentido positivo para estudar oxidações ou no negativo para estudar reduções. A velocidade de varrimento está relacionada com a escala de tempo em que a reacção química em estudo ocorre (Evans *et al.*, 1983; Pletcher, 1991). Quando a velocidade de varrimento é muito baixa as espécies reduzidas e oxidadas difundem-se para o seio da solução e conseqüentemente não podem ser novamente oxidadas e reduzidas, respectivamente, no varrimento inverso (Greef *et al.*, 1993).

Nas experiências de voltametria cíclica também é muito importante a consideração do número de varrimentos. O resultado obtido quando se pára um varrimento num potencial seleccionado durante um certo período de tempo e depois se recomeça o varrimento é diferente daquele que é obtido com uma série de varrimentos ininterruptos. Do mesmo modo, o primeiro varrimento é diferente do iésimo. Apenas o primeiro pode ser utilizado no cálculo dos parâmetros cinéticos, já que apenas é possível definir as condições iniciais para o primeiro varrimento. Por outro lado o iésimo varrimento é caracterizado por apresentar picos normalmente maiores, devidos à acumulação de produtos dentro da zona de reacção (Greef *et al.*, 1993, Pletcher, 1991). Podem ainda ser alteradas outros parâmetros de reacção, tais como reagentes, pH, temperatura, etc. (Pletcher, 1991).

### **I.3.5. Parâmetros experimentais**

#### **❖ Os eléctrodos**

Em voltametria cíclica é necessário a utilização simultânea de três tipos de eléctrodos: referência (ER), secundário (ES) e trabalho (ET).

Os **eléctrodos de referência** têm um potencial fixo e servem como referência da variação do potencial de outros eléctrodos, sendo o valor apresentado como uma diferença de potencial (Greef *et al.*, 1993; Brett & Brett, 1993; Lohrengel, 1997). Este eléctrodo deve ter um valor de potencial extremamente estável com o tempo, temperatura e a pequenas alterações do sistema. Os ER podem dividir-se em dois grupos: potencial fixo (como é o caso do eléctrodo de hidrogénio, eléctrodo de calomelanos e o eléctrodo Ag/AgCl) e indicadores (como eléctrodo de vidro, eléctrodo de metal/iões metálicos, eléctrodo de iões selectivos) (Greef *et al.*, 1993; Brett & Brett, 1993).

O eléctrodo de hidrogénio é o ER mais importante, por ser muito reprodutível (eléctrodos de hidrogénio diferentes têm diferenças de potencial inferiores a 10  $\mu$ V) e são os utilizados para definir a escala de potenciais dos eléctrodos padrão (Brett & Brett, 1993).

O **eléctrodo secundário** (ou auxiliar) tem como função passar a corrente para o eléctrodo de trabalho sem influenciar a resposta da célula (Greef *et al.*, 1993; Brett & Brett, 1993; Lohrengel, 1997). Inicialmente esta função estava atribuída ao ER, no entanto em certas situações originava problemas de variação do seu potencial e, por isso, foi criado um sistema de três eléctrodos, em que o ET passa a corrente para o ES (com área maior) e o ER serve exclusivamente como potencial de referência. O ES pode ser um fio de platina enrolado em espiral, ou uma folha ou rede de platina (Brett & Brett, 1993).

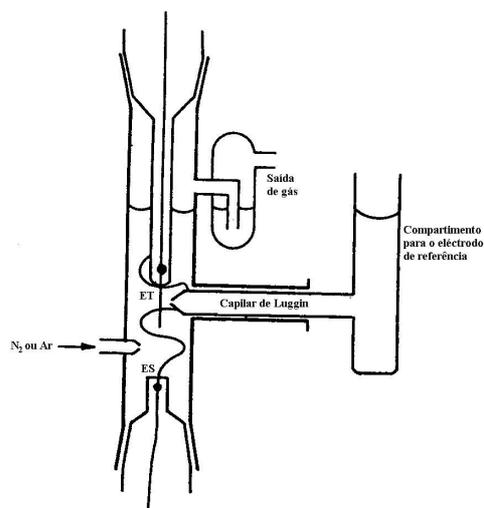
É no **eléctrodo de trabalho** que ocorrem as reacções que se pretendem estudar (Skoog & Leary, 1992). Estes eléctrodos podem ter a forma de pequenas esferas, pequenos discos ou a forma de um fio curto, ou também podem ser um simples cristal de um semiconductor ou

metal, uma película fina evaporada ou discos e pellets de pó prensado. Contudo, os eléctrodos mais comuns são feitos de material sólido, inerte, nomeadamente de metais nobres (tal como platina, ouro, ródio, paládio, entre outros, pois têm uma elevada resistência à corrosão) ou carbono vítreo (Greef *et al.*, 1993; Woods, 1976).

Os eléctrodos de trabalho devem receber um tratamento especial de modo a serem obtidos resultados consistentes, ou seja, devem apresentar uma superfície de morfologia e estado de oxidação reprodutíveis e livres de impurezas. Para tal os eléctrodos devem ser polidos numa camurça impregnada com partículas de alumina de tamanho inferior a 1  $\mu\text{m}$  e posteriormente com alumina de diâmetro inferior a 0.05  $\mu\text{m}$ . Finalmente o eléctrodo deve ser colocado num banho de ultra-sons para remover partículas abrasivas que possam ter ficado à sua superfície, e que poderiam afectar a cinética da reacção (Greef *et al.*, 1993; Brett & Brett, 1993).

#### ❖ Células electroquímicas

As células electroquímicas são normalmente construídas de vidro, mas, ocasionalmente, podem ser de quartzo. No entanto, para trabalhos efectuados em meios corrosivos e em electrólitos com sais dissolvidos, as células podem ser construídas numa gama variada de polímeros. Na Figura I.22 está representado o esquema de uma célula electroquímica (Greef *et al.*, 1993, Brett & Brett, 1993)



**Figura I.22.** Esquema de uma célula electroquímica e compartimentos onde são inseridos os eléctrodos (Greef *et al.*, 1993).

Para que a resistência entre os eléctrodos de trabalho e de referência seja mínima e deste modo o potencial seja controlado com precisão, a distância entre estes dois eléctrodos deve ser a mínima possível. A proximidade dos dois eléctrodos nem sempre é possível e, nestes casos, é utilizado o **capilar de Luggin** (Figura I.22), o qual consiste num tubo de vidro com uma ponta alongada. No seu interior é inserido o ER e a ponta conflui para o ET, podendo ser facilmente ajustado (Greef *et al.*, 1993; Brett & Brett, 1993; Heinze, 1984).

#### ❖ Solução electrolítica

A solução electrolítica é o meio que está no interior da célula electroquímica entre os eléctrodos. Consiste num solvente com uma elevada concentração de sais ionizados e espécies electroactivas. Pode também conter outros materiais como agentes complexantes, tampões, etc.

Esta solução tem essencialmente três funções:

- Aumentar a condutividade da solução e assim diminuir a resistência entre os eléctrodos de trabalho e secundário;
- Minimizar a variação do potencial, suprimindo o efeito da dupla camada eléctrica na cinética da reacção;
- Eliminar a migração como modo de transferência de massa das espécies electroactivas.

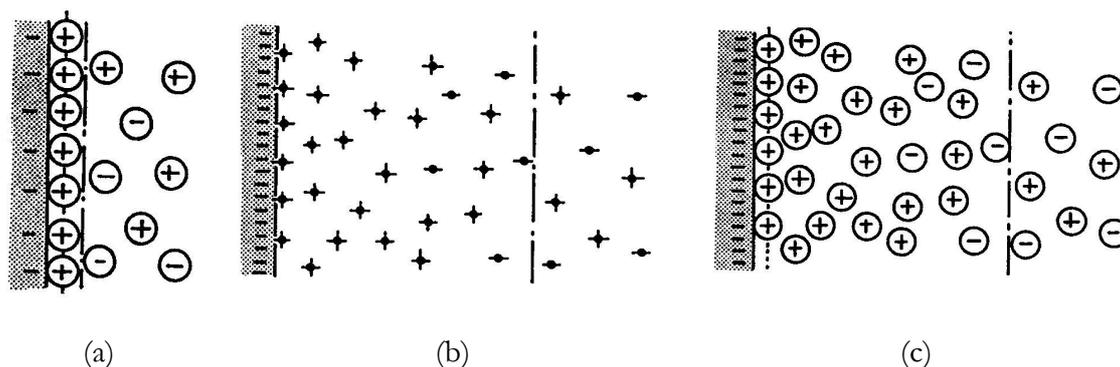
Salienta-se ainda o facto das reacções de eléctrodo serem extremamente sensíveis à presença de impurezas, pelo que se deve ter o máximo de cuidado na preparação das soluções electrolíticas (Greef *et al.*, 1993; <http://www.bath.ac.uk>; Evans *et al.*, 1983).

### 1.3.6. Dupla camada eléctrica

Já foi anteriormente referida a existência de uma interface entre a solução electrolítica e o eléctrodo. Esta interface “rasga” a solução electrolítica, já que as interacções que ocorrem entre o sólido e o electrólito são consideravelmente diferentes das interacções que ocorrem em solução. Nos eléctrodos que são controlados por potenciostatos existe uma influência adicional nas cargas que estão no eléctrodo. Estes diferentes factores resultam em interacções fortes que se estabelecem entre os iões e as moléculas da solução e a superfície do eléctrodo, originando uma região denominada “**dupla camada eléctrica**” (Greef *et al.*, 1993; <http://www.bath.ac.uk>).

Existem vários modelos que descrevem a dupla camada eléctrica, os quais vão ser descritos sucintamente de seguida:

O modelo mais simples pertence a Helmholtz, e defende a ideia de que o excesso de carga do metal deve ser neutralizada por uma monocamada de iões de carga oposta (Figura I.23 (a)). Este modelo foi mais tarde desenvolvido por Gouy e Chapman que verificaram que as cargas são livres para se moverem na solução electrolítica, as quais estão sujeitas a movimentos térmicos. Estes autores permaneceram com a teoria electrostática para descrever as interacções iónicas dos metais, mas introduziram a noção de que os iões se moviam (Figura I.23 (b)). Isto resultou numa teoria em que a camada eléctrica era constituída por cargas difusas, em que a concentração de iões era superior perto da superfície do eléctrodo e diminuía à medida que se afastava para o seio da solução. A falha desta teoria estava no facto de se negligenciar o tamanho finito dos iões. Foi Sten que postulou não ser possível as cargas aproximarem-se do eléctrodo, cobrindo-o totalmente, exactamente devido ao seu tamanho (Figura I.23 (c)) (Greef *et al.*, 1993; <http://www.bath.ac.uk>).



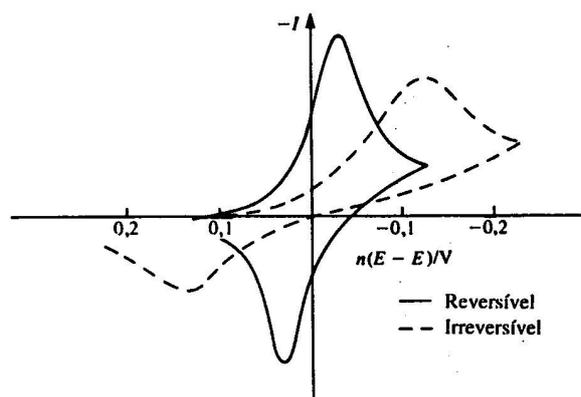
**Figura I.23.** Modelo esquemático da distribuição de a) iões; b) potencial e c) de carga na direcção perpendicular do plano do eléctrodo, descrito por 1) Helmholtz; 2) Gouy e Chapman e c) Gouy, Chapman e Sten. Os círculos representam os iões; ---- representam o plano interior de Helmholtz; \_.\_.\_ é o limite interface-solução (Greef *et al.*, 1993).

### I.3.7. Reacções reversíveis e irreversíveis

A equação seguinte representa uma reacção geral de transferência de um único electrão



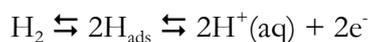
em que  $k_{\text{red}}$  e  $k_{\text{ox}}$  representam a constante de velocidade da transferência electrónica de redução e oxidação, respectivamente. Estes dois parâmetros definem o tipo de reacção que está a decorrer no eléctrodo. Se  $k_{\text{red}}$  e  $k_{\text{ox}}$  são elevados a reacção diz-se **reversível**, já que a energia de activação é baixa ou nula para ambos os sentidos, manifestando-se num equilíbrio no sistema redox. Supondo que apenas O está presente, no início da voltametria cíclica começa por ocorrer a redução desta espécie. Quando o varrimento é invertido, então a espécie R presente à superfície do eléctrodo vai ser oxidada – a reacção ocorre em ambos os sentidos descritos. Isto significa que uma ligeira alteração no potencial aplicado leva a grandes mudanças na intensidade de corrente medida. Inversamente, quando é necessário uma grande alteração no valor do potencial para se verificar alterações nos valores da intensidade de corrente, então a barreira de energia de activação é muito elevada e as taxas de oxidação e redução são baixas. Isto significa que as reacções são lentas, ocorrendo adsorção dos produtos e reagentes, não permitindo que ocorra a segunda etapa da reacção (reacção inversa). Estas reacções chamam-se por isso **irreversíveis**. Existe ainda uma reacção de comportamento intermédio, a qual se denomina por **quasi-reversível** (<http://www.bath.ac.uk>, <http://www-biol.paisley.ac.uk>, Greef *et al.*, 1993; Brett & Brett, 1993, Heinze, 1984, Pletcher, 1991). Na Figura I.24 pode observar-se o exemplo de uma reacção reversível e de uma reacção irreversível.



**Figura I.24.** Exemplo de uma reacção reversível e de uma irreversível (Brett & Brett, 1993).

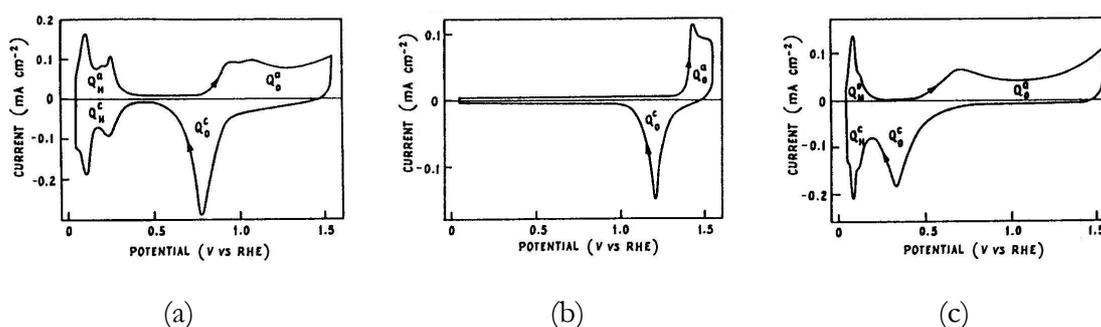
### I.3.8. Adsorção do hidrogénio e oxigénio

Os voltamogramas obtidos quando se aplica voltametria cíclica são sempre idênticos para as mesmas condições (velocidade de varrimento, limites de potencial aplicado, electrólito, eléctrodos construídos com o mesmo material), representando uma espécie de “impressão digital” do eléctrodo. Na Figura I.25 estão representados alguns voltamogramas de metais nobres obtidos em ácido sulfúrico de concentração  $1 \text{ mol dm}^{-3}$ . Como o potencial varia de uma região onde não há adsorção até uma região onde ocorre a adsorção, então pode dizer-se que a corrente flui devido ao processo de transferência de carga envolvido, isto é, devido à adsorção do hidrogénio segundo a reacção da direita para a esquerda



O registo da corrente nestes voltamogramas é causado pelo rompimento das moléculas de água, formando-se hidrogénio ou oxigénio na superfície do eléctrodo (Woods, 1976). Na realidade estes eléctrodos funcionam como ânodo e cátodo consoante a intensidade de corrente é positiva ou negativa, como se pode observar na Figura I.18. Na Figura I.25.

Estão representados os picos inerentes às cargas  $Q_H^c$  e  $Q_H^a$ , as quais estão associadas com a adsorção e dessorção do hidrogénio, e as cargas  $Q_O^c$  e  $Q_O^a$ , associadas com a adsorção e dessorção do oxigénio (Woods, 1976).



**Figura I.25.** Voltamogramas cíclicos em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M a 25 °C; velocidade de varrimento 40 mV s<sup>-1</sup>, num eléctrodo de trabalho de (a) platina; (b) ouro e (c) ródio (Woods, 1976).

### I.3.9. Problemas mais comuns

Os problemas mais comuns que podem afectar os resultados em voltametria cíclica dividem-se, principalmente, em duas categorias:

**Ruído:** de forma a minimizar os problemas associados ao ruído todas as ligações da célula e do potenciostato devem ser o mais curtas possível, a resistência do eléctrodo de referência e do capilar de Luggin deve ser baixa e, em último caso, deve colocar-se a célula dentro de uma gaiola de Faraday (caixa de material paramagnético) (Greef *et al.*, 1993).

**Não se observa resposta ou a resposta observada é incorrecta:** deve proceder-se a testes com a célula de simulação, devem testar-se os crocodilos de ligação aos eléctrodos

(sofrem facilmente corrosão o que aumenta a resistência), as ligações do eléctrodo (nomeadamente a ligação do fio de cobre ao de platina, por exemplo, que partem facilmente), o eléctrodo de referência (pode ocorrer bloqueamento deste) e o capilar de Luggin (pode ter bolhas de ar ou estar tapado) (Greef *et al.*, 1993)

### **I.3.10. Aplicações da voltametria cíclica**

Tal como já foi referido, a passagem de corrente eléctrica através do eléctrodo de trabalho é detectada num potenciostato, o qual detecta como resposta uma intensidade de corrente eléctrica. Os gráficos obtidos denominam-se por voltamogramas cíclicos, os quais são característicos de um determinado eléctrodo em certas condições. A forma destes voltamogramas pode ser usada para detectar variações nas características da superfície dos eléctrodos durante o processo de activação (Heinze, 1984; Woods, 1996). De facto, a voltametria cíclica é uma técnica muito popular, nomeadamente no que diz respeito a estudos iniciais de novos sistemas, como determinação de parâmetros cinéticos, devido à rapidez e facilidade do tratamento de dados (sem ser necessário recorrer a cálculos muito complexos) obtidos a partir desta técnica (Evans *et al.*, 1983; Greef *et al.*, 1993; <http://www-biol.paisley.ac.uk>; Pletcher, 1991). Pode ainda ser utilizada para detectar reacções químicas que precedem as reacções electroquímicas ou determinar o potencial redox (<http://www-biol.paisley.ac.uk>).

A voltametria cíclica tem sido amplamente utilizada no estudo de vários tipos de processos interfaciais que dependem do potencial, dos quais se destacam processos de adsorção, fenómenos de electrocristalização e reacções de transferência de carga em eléctrodos semicondutores ou em electrólitos imiscíveis (Heinze, 1984).

Na prática esta técnica tem sido utilizada na detecção de compostos e no estudo do desenvolvimento de reacções (Malgor *et al.*, 1998, Nolan & Kounaves, 2000; Amaral & Müller, 1999, Tavares *et al.*, 2001), bem como em investigação no campo da biologia e medicina, como, por exemplo, na detecção da capacidade antioxidante e de compostos de baixo peso molecular (Psotová *et al.*, 2001); na imobilização de sondas de DNA ou enzimas em eléctrodos, permitindo identificar bactérias e processos bacterianos (Cordes & Rechnitz, 1999, <http://www.iee.or.jp>); no desenvolvimento de sondas que sejam capazes de detectar compostos e medir o pH no interior de biofilmes (Ruan *et al.*, 2002; VanHoudt *et al.*, 1992) e no estudo de culturas de células em suspensão (Subrahmanyam *et al.*, 2001a, Subrahmanyam *et al.*, 2001b).

Estudos anteriores revelaram ser possível utilizar a voltametria cíclica na detecção de biofilmes e mesmo na remoção de parte do biofilme do eléctrodo (Illsley *et al.*, 1997; Vieira *et al.*, 2003). De facto, estudos revelaram que a corrente eléctrica pode influenciar, de alguma forma, o comportamento dos microrganismos, nomeadamente no que diz respeito à sua viabilidade (Blenkinsopp *et al.*, 1992; Dhar *et al.*, 1982, Okochi et Matsunnaga, 1997, Okochi *et al.*, 1999, Woods *et al.*, 1999).

Com este trabalho pretende-se desenvolver um sensor que, através da aplicação de voltametria cíclica em eléctrodos de platina, seja capaz de detectar biofilmes, sem no entanto alterar as suas características. Foi também fundamental aprofundar o conhecimento da influência da voltametria cíclica no comportamento das células, de forma a que, adoptando as condições de operação adequadas, fosse possível, quando necessário,

limpar o eléctrodo *in situ*, obtendo-se deste modo um sensor completamente livre de células, pronto a ser utilizado numa nova monitorização.

## Capítulo II

---

### Materiais e Métodos

Neste capítulo descreve-se o procedimento experimental e apresentam-se fotografias e esquemas da instalação e dos eléctrodos utilizados.

II.1. Microrganismo: crescimento e formação de biofilme.....	57
II.2. Voltametria Cíclica.....	60
II.3. Observação das superfícies com e sem biofilme.....	66

A execução experimental correspondente a este trabalho pode ser dividida em três partes: monitorização de biofilmes pela técnica de voltametria cíclica, influência das condições utilizadas na voltametria cíclica na viabilidade e remoção do biofilme e estudo da influência da formação de bolhas de hidrogénio na remoção do biofilme. Efectuaram-se procedimentos comuns, nomeadamente a cultura das células bacterianas e sua observação por microscopia de epifluorescência.

Promoveu-se a formação de biofilmes formados por uma só espécie microbiana (*Pseudomonas fluorescens*) nas superfícies dos eléctrodos de platina a partir da imersão desses eléctrodos num reactor, onde foram mantidas as condições óptimas para a adesão e crescimento dos biofilmes.

## II.1. Microrganismo: crescimento e formação de biofilmes

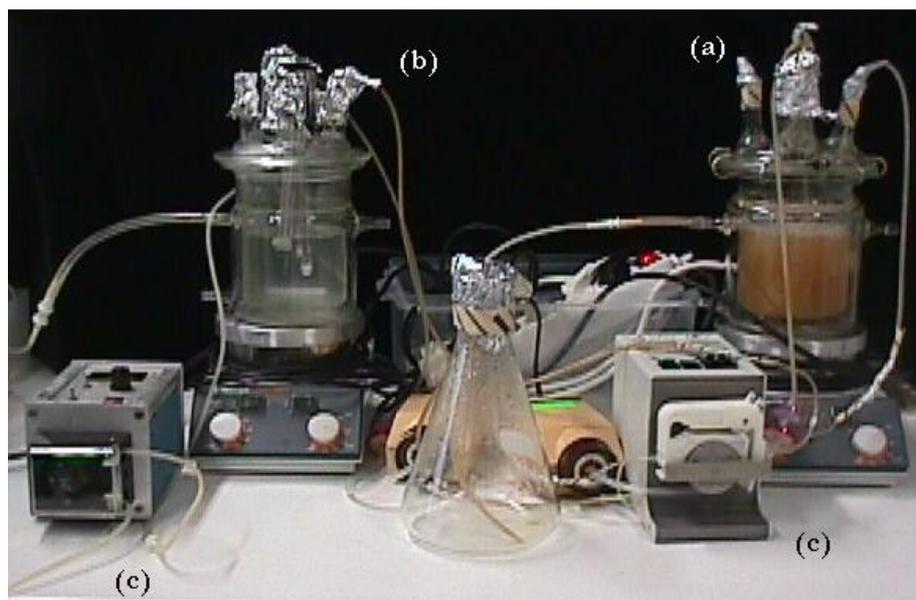
O microrganismo utilizado no decurso do trabalho experimental foi *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525, proveniente de uma cultura pura (Pereira & Vieira, 2001). Inicialmente inoculou-se um reactor de 0.50 L de volume, arejado e agitado (Figura II.1 (a)), o qual permaneceu em descontínuo até se atingir a fase exponencial de crescimento. Atingida esta fase, passou-se a operar em contínuo. Este reactor passou a ser alimentado, utilizando uma bomba peristáltica (Figura II.1 (c)), com um meio concentrado, cuja composição se encontra na Tabela II.1, tamponado a pH 7, com tampão fosfato ( $4.3 \text{ g L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e  $3.75 \text{ g L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ ) de modo a obter uma taxa de diluição de  $0.02 \text{ h}^{-1}$ . Este reactor alimentou continuamente um segundo reactor (de 0.50 L de volume, arejado e agitado – Figura II.1 (b)), funcionando como fonte de bactérias. O segundo fermentador era também

alimentado com um meio diluído (composição na Tabela II.1), recorrendo a uma bomba peristáltica (Figura II.1 (c)), de modo a obter uma taxa de diluição de  $0.8 \text{ h}^{-1}$ , a qual assegurava que o crescimento do biofilme na superfície dos eléctrodos imersos no reactor prevalecia sobre o crescimento de células em suspensão (Vieira *et al.*, 1993). O esquema da instalação encontra-se na Figura II.1.

Os meios de cultura foram esterilizados por autoclavagem a  $121^\circ\text{C}$  e 1 atm, durante 15 minutos.

**Tabela II.1.** Composição do meio concentrado, para o crescimento de *Pseudomonas fluorescens*, e do meio diluído, onde foram imersos os eléctrodos para a formação de biofilme na sua superfície.

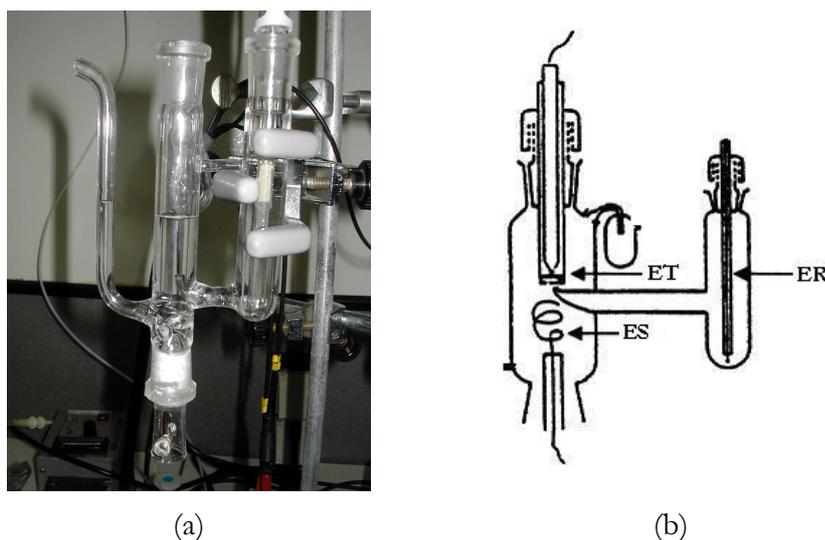
	Meio concentrado	Meio diluído
Glicose ( $\text{g L}^{-1}$ )	5.0	0.050
Peptona ( $\text{g L}^{-1}$ )	2.5	0.025
Extracto de levedura ( $\text{g L}^{-1}$ )	1.25	0.0125
Caudal ( $\text{L h}^{-1}$ )	0.010	418



**Figura II.1.** Fotografia da instalação. (a) Reactor para crescimento de bactérias; (b) Reactor para imersão dos eléctrodos e formação de biofilme; (c) Bombas peristálticas.

## II.2. Voltametria Cíclica

A técnica de voltametria cíclica foi aplicada num sistema descontínuo, constituído por uma célula de vidro, onde são inseridos três eléctrodos: o eléctrodo de referência (ER), o de trabalho (ET) e o secundário (ES), de acordo com a Figura II.2.



**Figura II.2.** Fotografia (a) e esquema (b) da célula de vidro e dos eléctrodos de trabalho (ET), de referência (ER) e secundário (ES).

O eléctrodo de referência (Figura II.3 (a)) é de Ag/AgCl (Metrohm, ref. 6.0702.100). O eléctrodo secundário (Figura II.3 (b)) consiste num eléctrodo de platina em espiral e o eléctrodo de trabalho (Figura II.3 (c)) consiste num disco de platina com 1 mm de diâmetro (área correspondente igual a  $7.85 \times 10^{-7} \text{ m}^2$ ) preparado a partir da inserção de um fio de platina num tubo de vidro e posterior polimento com pó de alumina (inicialmente com um diâmetro  $0.1 \mu\text{m}$  e posteriormente com um diâmetro inferior a  $0.05 \mu\text{m}$ , da marca Struers) numa camurça de polimento (Brett & Brett, 1993). O fio interno da platina, quer para o ET, quer para o ES, estava soldado a um fio de cobre e era este que promovia o contacto com o exterior.



(a)



(b)



(c)

**Figura II.3.** Fotografia dos eléctrodos de (a) referência; (b) secundário e (c) trabalho.

Os eléctrodos de trabalho antes de serem imersos no tanque foram deixados 3 horas em etanol 70°, polidos numa camurça embebida em etanol 70°, polidos numa camurça embebida em água destilada, limpos electroquimicamente (voltametria cíclica, velocidade de varrimento:  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , limites de potencial:  $-0.5$  a  $1.0 \text{ V}$ ), esterilizados com etanol e secos à chama.

Os voltamogramas cíclicos foram obtidos a partir da utilização de um potenciostato AUTOLAB-PGSTAT 10, através da operação do programa GPES 4.5. Após se ligar o computador, entrou-se no programa GPES Manager e em “Methods” seleccionou-se

“Cyclic Voltametry (staircase)”. Definiram-se, então, os parâmetros, tais como velocidade de varrimento, limites de potencial e número de varrimentos e clicou-se em “start”.

Utilizaram-se oito eléctrodos em cada um dos ensaios aos quais se aplicavam as técnicas de voltametria cíclica e um ao qual não foi aplicada esta técnica, que se utilizou como branco.

### II.2.1. Monitorização de biofilmes pela técnica de voltametria cíclica

Nesta etapa promoveu-se o crescimento de biofilme com várias idades (2 horas, 6 horas, 12 horas e 24 horas) na superfície do eléctrodo de trabalho, como descrito em II.1. Após o tempo de formação pretendido, retirou-se o eléctrodo do reactor e introduziu-se cuidadosamente na célula de voltametria cíclica, contendo tampão fosfato. Posteriormente, aplicou-se 1 único varrimento de voltametria cíclica em tampão fosfato pH 7 (ver composição na Tabela II.3), velocidade de varrimento  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , entre os limites de potencial -0.5 a 1.0 V. Procedeu-se então à medição da altura do pico de desorção do hidrogénio (determinada no próprio programa de aquisição de dados, GPES 4.5) do voltamograma cíclico obtido e relacionou-se com a cobertura da superfície, determinada por um sistema de análise de imagem (SigmaScan Pro 5, SPSS), após observação da superfície do eléctrodo por microscopia, como descrito em II.3. Efectuaram-se 3 ensaios para cada situação estudada, utilizando 4 eléctrodos em cada ensaio.

O objectivo desta parte do trabalho foi o de relacionar a resposta electroquímica com a cobertura da superfície, para verificar se esta técnica electroquímica permite monitorizar a presença de biofilmes na superfície.

## II.2.2. Influência das condições de voltametria cíclica na viabilidade e remoção do biofilme

No estudo da influência das condições experimentais foram utilizados biofilmes com a mesma idade (2 horas), variando-se apenas as condições de aplicação da técnica electroquímica: velocidade de varrimento, pH da solução contida na célula de vidro (tampão fosfato) e limites do potencial aplicado, como pode ser visto na Tabela II.2. Na Tabela II.3 encontra-se a composição do tampão fosfato utilizado na voltametria cíclica, para os dois valores de pH utilizados.

**Tabela II.2.** Condições de operação utilizadas nos vários ensaios.

Ensaio	Velocidade de varrimento (V s <sup>-1</sup> )	pH da solução	Limites de potencial (V)
1	0.250	7	-0.5 a 1.0
2	0.150	7	-0.5 a 1.0
3	0.500	7	-0.5 a 1.0
4	0.250	4	-0.5 a 1.0
5*	0.250	7	-0.5 a 1.0
6	0.250	7	-0.5 a 1.5
7	0.250	7	-2.0 a 1.0

\*Este ensaio difere do 1º, no facto dos eléctrodos com biofilme terem sido previamente mergulhados em tampão fosfato pH 4.

No intuito de se verificar qual a influência do tampão fosfato pH 4 nas células bacterianas foram imersos 2 eléctrodos com biofilme de 2 horas, num goblé contendo tampão fosfato

pH 4. Posteriormente, observou-se o eléctrodo por microscopia de epifluorescência sem se aplicar voltametria cíclica.

**Tabela II.3. Composição do tampão fosfato utilizado na voltametria cíclica.**

	pH 4	pH 7
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (g L <sup>-1</sup> )	434.7	13.8
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (g L <sup>-1</sup> )	0.716	22.7

### II.2.3. Estudo da influência da formação de bolhas de hidrogénio na remoção do biofilme

Os ensaios referentes ao estudo da influência da formação de bolhas de hidrogénio na remoção do biofilme efectuaram-se com biofilmes de diferentes idades (de 2 horas até 7 dias), formados na superfície do eléctrodo de platina como descrito em II.1. Promoveu-se a formação de bolhas de hidrogénio pela aplicação do potencial  $-2.0$  V, com o objectivo de verificar se este procedimento pode ser utilizado para efectuar limpeza de superfícies de eléctrodos. Variou-se o tempo de formação destas bolhas consoante a idade do biofilme, como se pode verificar na Tabela II.4. Estudou-se, também, a influência de se varrer o potencial entre  $-0.5$  e  $1.0$  V, a uma velocidade de varrimento de  $0.250$  V s<sup>-1</sup>, antes da formação da bolhas de hidrogénio. No caso de biofilmes com 7 dias, experimentou-se ainda uma outra estratégia: formação de bolhas, remoção mecânica das bolhas formadas e nova formação de bolhas de hidrogénio.

**Tabela II.4.** Tempo de formação de bolhas e tempo de varrimento do potencial a uma velocidade de varrimento de  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , entre os limites de potencial de  $-0.5$  a  $1.0 \text{ V}$ , para cada idade de biofilme formado.

Idade do biofilme	Tempo de formação de bolhas (min)	Tempo de varrimento do potencial (min)
2 horas	1	-
4 horas	1	-
	2	-
24 horas	2	30
	4	-
	4	30
3 dias	8	30
	10	-
	10	30
5 dias	10	-
	10	30
7 dias	10	30
	15	30
	15+15	30

### II.3. Observação das superfícies com e sem biofilme

Todos os eléctrodos (branco e eléctrodos aos quais foi aplicada voltametria cíclica) foram corados com “LIVE/DEAD Bac Light Viability kit” (LD) (o qual permite distinguir as células vivas das células mortas por apresentarem diferentes cores). De seguida, observou-se a superfície dos eléctrodos por microscopia de epifluorescência (Microscópio de Epifluorescência Zeiss Axioskop, Carl Zeiss, Germany), através do seguinte procedimento: Imobilização do eléctrodo numa lâmina com recurso a plasticina, adição de 150 µl de LD composto A (SYTO 9), adição de 150 µl de LD composto B (propidium iodide) e incubação durante 15 minutos no escuro. Ao fim destes 15 minutos os eléctrodos foram observados por microscopia de epifluorescência, utilizando um filtro de comprimento de onda de 470 nm. Utilizando este filtro as células vivas aparecem coradas de verde (pelo composto A) e as células mortas coradas de vermelho (pelo composto B). Este método é ainda eficaz na detecção dos polímeros extracelulares produzidos pelas células e que compõem o biofilme, corando-os de verde-amarelado.

As imagens obtidas foram adquiridas digitalmente com uma câmara fotográfica digital (AxioCam, HRc Zeiss, Carl Zeiss, Germany). A cobertura de superfície foi determinada a partir das imagens obtidas recorrendo a um sistema de análise de imagem (SigmaScan Pro 5, SPSS). Observaram-se, pelo menos, 20 campos de cada superfície estudada.

## Capítulo III

---

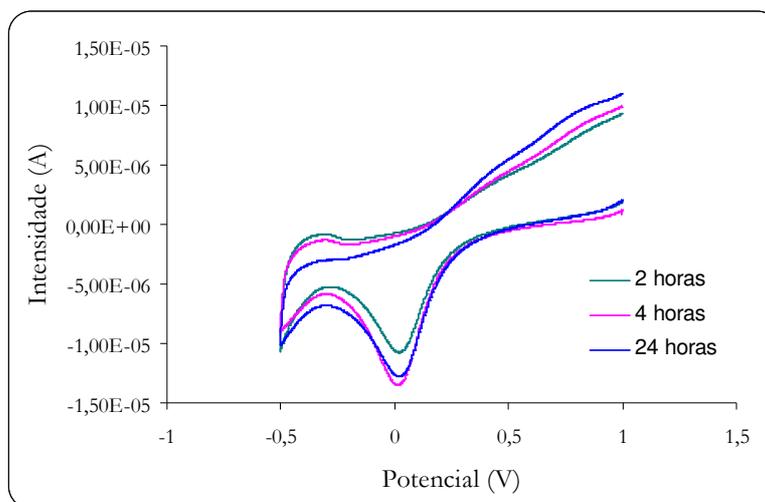
### Resultados e Discussão

O capítulo Resultados e Discussão encontra-se dividido em três partes de acordo com o procedimento experimental. Inicialmente, estudou-se a relação entre a altura do pico de dessorção do hidrogénio dos voltamogramas cíclicos obtidos e a idade do biofilme formado na superfície dos eléctrodos. Numa segunda etapa, estudou-se a influência das condições de operação (tais como velocidade de varrimento, pH da solução electrolítica e limites de potencial utilizados) no desprendimento e viabilidade do biofilme. Finalmente, estudou-se a influência da formação de bolhas de hidrogénio no desprendimento de biofilmes de diferentes idades.

III.1. Monitorização de biofilmes pela técnica de voltametria cíclica.....	68
III.2. Influência das condições de voltametria cíclica na viabilidade e remoção do biofilme.....	74
III.3. Estudo da influência da formação de bolhas de hidrogénio na remoção do biofilme.....	86

### III.1. Monitorização de biofilmes pela técnica de voltametria cíclica

Estudos preliminares demonstraram que a forma do voltamograma cíclico relativamente ao primeiro varrimento varia de acordo com a idade do biofilme formado na superfície do eléctrodo, como se pode observar na Figura III.1, onde se apresentam os primeiros voltamogramas cíclicos obtidos em eléctrodos com biofilmes depositados de 2, 4 e 24 horas. Esta Figura mostra que no caso de biofilmes mais velhos, o pico de dessorção do hidrogénio diminui. Outros autores já tinham verificado que a adsorção de insulina na superfície de eléctrodos de platina é capaz de modificar a forma do voltamograma cíclico (<http://www.electrode.org>).

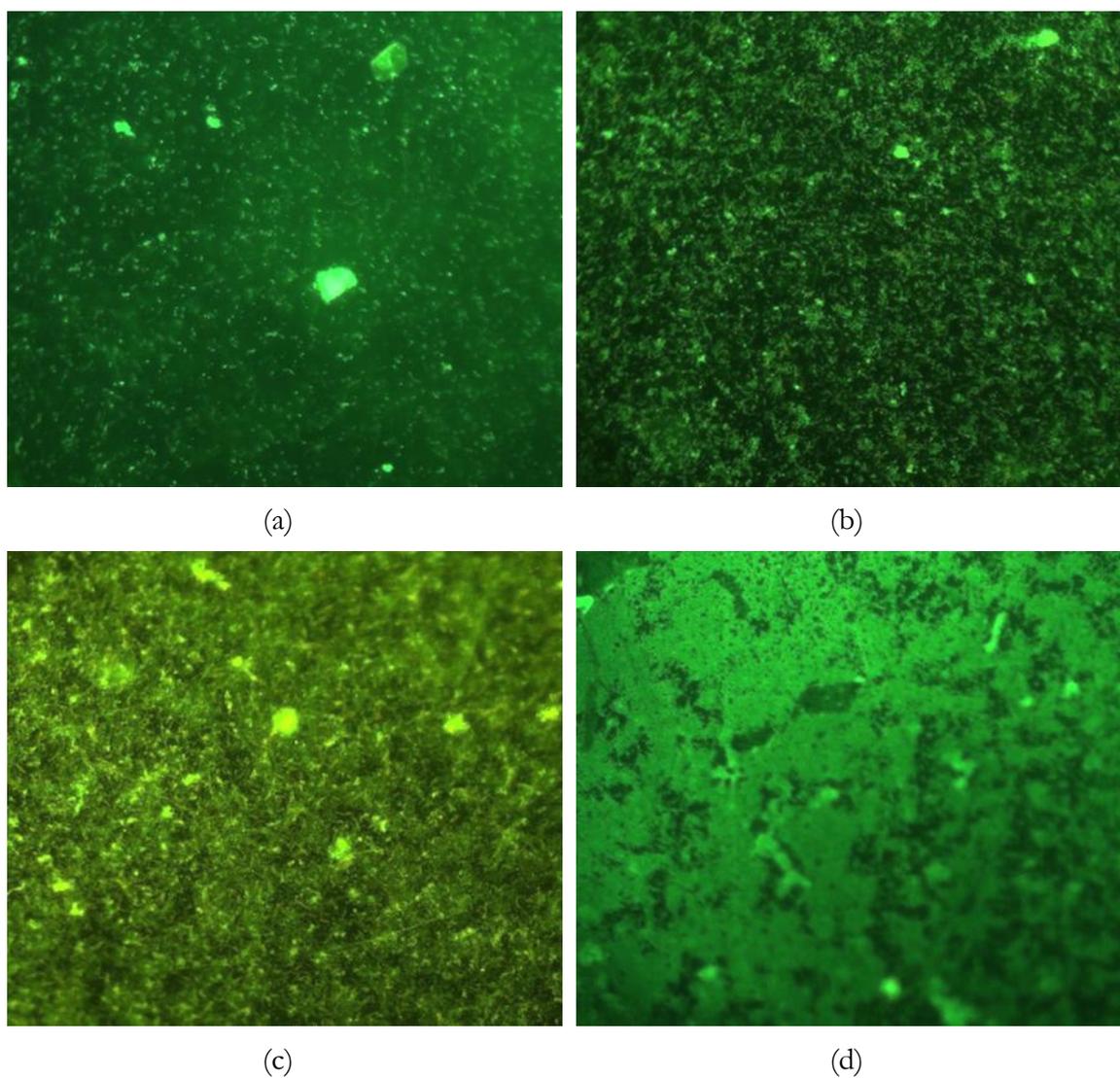


**Figura III.1.** Primeiro varrimento obtido por voltametria cíclica, num eléctrodo de platina coberto com um biofilme de várias idades.

Vieira *et al.* (2003) referem que o pico de dessorção do hidrogénio é o pico mais sensível à variação da área disponível para que as reacções electroquímicas de redução e oxidação ocorram na superfície do eléctrodo. Observando a Figura III.1., verifica-se que o pico de

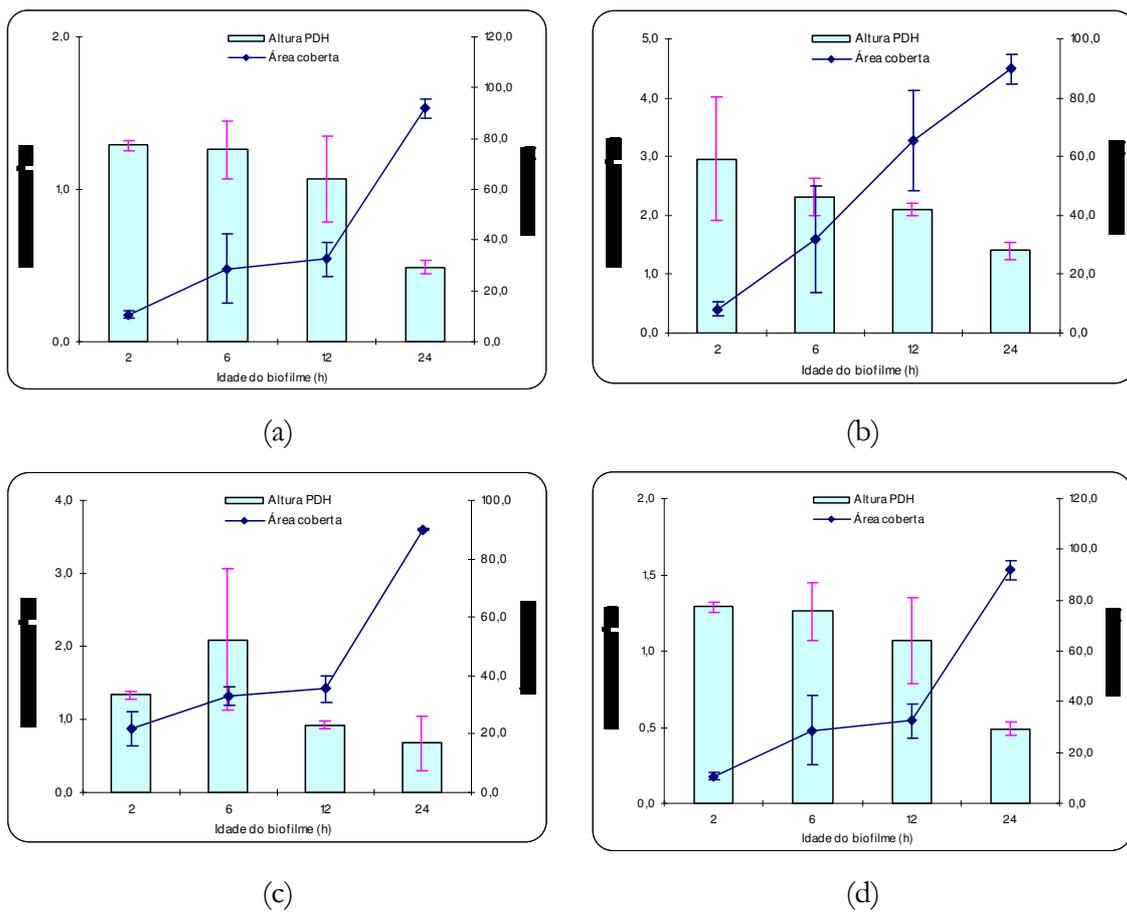
dessorção do hidrogénio é o único cuja altura diminui com a idade do biofilme. Relativamente aos outros picos parecem não ter nenhuma regularidade no comportamento, isto é, a altura dos outros picos não se relaciona com a idade do biofilme, já que a altura do pico de dessorção do oxigénio do voltamograma cíclico obtido para um eléctrodo coberto com um biofilme de 24 horas é menor do que o obtido para um de 4 horas, contudo maior do que para 2 horas. Por outro lado, o pico de adsorção do hidrogénio referente a um voltamograma cíclico obtido para um eléctrodo coberto com um biofilme de 2 horas tem um altura superior ao de 4 horas e igual ao de 24 horas.

Para se averiguar a existência de uma relação entre a altura do pico de dessorção de hidrogénio e a quantidade de biofilme formado, promoveu-se o crescimento de biofilmes de várias idades na superfície dos eléctrodos, de acordo com o que está descrito no Capítulo Materiais e Métodos, aplicou-se voltametria cíclica aos eléctrodos e observou-se por microscopia de epifluorescência. Tal como se mostra na Figura III.2, à medida que a idade do biofilme aumenta, a cobertura da superfície do eléctrodo de platina é maior. Posteriormente, mediu-se a altura do pico de dessorção de hidrogénio, do primeiro varrimento, e relacionou-se com a percentagem de área de eléctrodo coberta, a qual se determinou a partir de imagens capturadas por microscopia de epifluorescência (no Anexo I apresentam-se todos os voltamogramas obtidos e uma fotografia representativa de cada eléctrodo). Efectuaram-se 3 ensaios para cada um dos 4 eléctrodos diferentes, para cada uma das condições testadas.



**Figura III.2.** Fotografias obtidas por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície de um eléctrodo de platina com um biofilme de (a) 2 horas; (b) 6 horas; (c) 12 horas e (d) 24 horas.

Com o objectivo de verificar a relação entre a cobertura da superfície e a altura do pico de dessorção do hidrogénio, construíram-se os gráficos da Figura III.3.



**Figura III.3.** Relação entre a altura do pico de dessorção do hidrogénio (PDH) e a percentagem de área coberta, obtido para (a) o eléctrodo 1; (b) o eléctrodo 2; (c) o eléctrodo 3 e (d) o eléctrodo 4.

Como se pode constatar, a partir da observação da Figura III.3, quanto maior é a idade do biofilme, maior é a área coberta e menor é a altura do pico de dessorção do hidrogénio, verificando-se que existe uma relação entre estes dois parâmetros. Tal comportamento já era esperado, uma vez que os voltamogramas traduzem reacções de superfície e, à medida que o biofilme ocupa uma área maior menor é a área disponível para ocorrerem as reacções de superfície. Deste modo, a forma dos voltamogramas cíclicos são directamente influenciados pela área de eléctrodo disponível. Tal como anteriormente verificado, os resultados mostram que o pico correspondente à dessorção do hidrogénio é o pico mais sensível a estas variações, pois os outros três picos são influenciados pelas reacções do

oxigénio (Vieira *et al.*, 2003). Consequentemente, quanto mais “sujo” estiver o eléctrodo, menor será a altura do pico de desorção do hidrogénio. Inclusivamente, foi obtido num dos eléctrodos um biofilme de tal forma espesso, que o voltamograma cíclico resultante era totalmente deformado (ver Anexo I, Figura AI.43). Este voltamograma é semelhante ao obtido quando se cobre a platina com película de teflon, não permitindo a condução de corrente eléctrica entre o sistema de eléctrodos.

No Anexo I apresentam-se todos os voltamogramas cíclicos e uma Figura representativa de cada eléctrodo, referentes a cada uma das experiências efectuadas.

Relativamente ao desvio-padrão obtido para a média dos três ensaios realizados para cada um dos 4 eléctrodos utilizados, salienta-se o facto de se ter tido como base de trabalho a idade do biofilme. No entanto, são ensaios feitos em dias diferentes e, por este motivo, a quantidade de biofilme formado no mesmo espaço de tempo pode ser significativamente diferente entre eléctrodos e no caso do mesmo eléctrodo podem existir diferenças dependentes das condições do ensaio. Note-se que as condições do meio são preponderantes na formação e nas características do biofilme. Deste modo, obtêm-se valores elevados no desvio-padrão calculado para a média da percentagem de área coberta. O facto de haver uma quantidade de biofilme diferente na superfície do eléctrodo vai originar valores da altura do pico de desorção de hidrogénio também diferentes, para a mesma idade do biofilme, tal como seria de esperar. Por outro lado, os eléctrodos de trabalho foram polidos com alumina entre cada ensaio, o que pode alterar ligeiramente a forma dos voltamogramas cíclicos, nomeadamente a altura do pico de desorção de hidrogénio, mesmo antes do crescimento do biofilme, o que origina valores significativamente diferentes da altura do referido pico para a mesma idade de biofilme e,

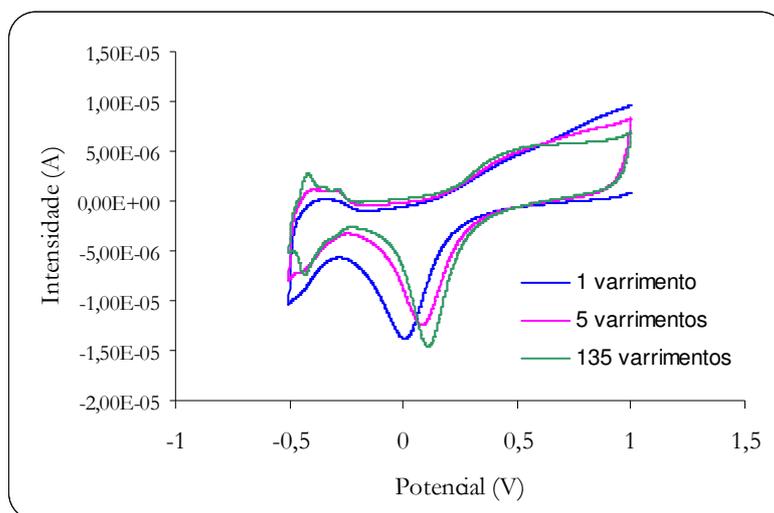
consequentemente, valores elevados do desvio-padrão calculado para a média da altura do pico de dessorção de hidrogénio.

Salienta-se ainda o facto de que, embora a aplicação repetida de voltametria cíclica (ou seja, a aplicação de vários varrimentos seguidos) seja destrutiva para o biofilme (como se poderá ver posteriormente) se apenas for efectuado um único varrimento, as características do biofilme não se alteram. Este facto foi verificado na observação por microscopia de epifluorescência dos biofilmes formados na superfície dos eléctrodos, antes e após aplicação da voltametria cíclica.

### III.2. Influência das condições de voltametria cíclica na viabilidade e remoção do biofilme

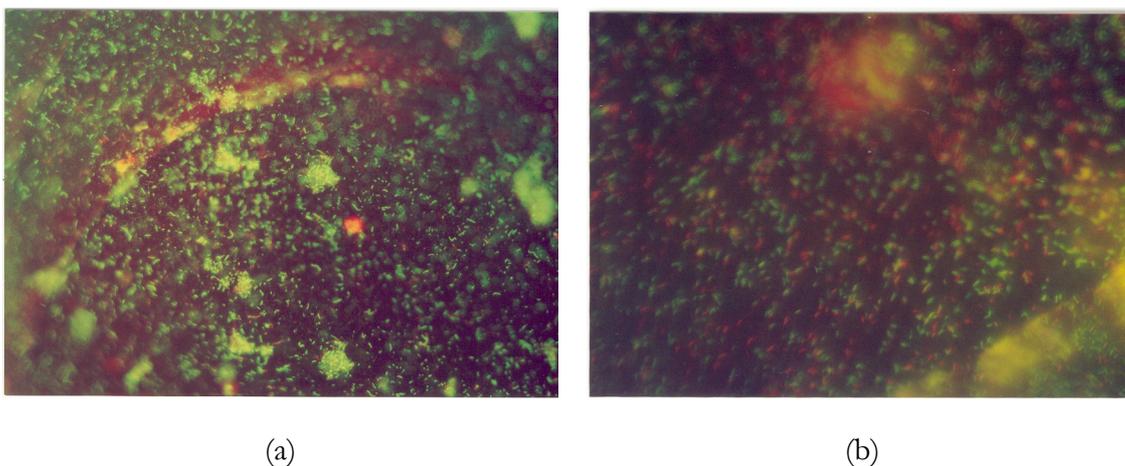
Com o objectivo de avaliar o efeito da aplicação da voltametria cíclica nos biofilmes formados na superfície dos eléctrodos, efectuaram-se uma série de experiências, que englobaram a realização de varrimento do potencial a diferentes velocidades de varrimento, entre diferentes limites de potencial e em soluções electrolíticas de diferentes pH. Realizaram-se todos os ensaios com biofilmes formados na superfície dos eléctrodos durante 2 horas.

Na Figura III.3. pode observar-se que à medida que o potencial é varrido (condições de operação: velocidade de varrimento  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , tampão fosfato pH 7 e limites de potencial entre -0.5 e 1.0 V) os voltamogramas cíclicos vão adquirindo uma forma mais definida, a qual se aproxima da forma característica de um eléctrodo limpo. Este facto poderia sugerir que tinha ocorrido a completa remoção do biofilme.



**Figura III.4.** Voltamograma cíclico obtido num eléctrodo de platina em tampão fosfato pH 7, entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V e a uma velocidade de varrimento de  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , onde cresceu um biofilme de 2 horas. Os voltamogramas representados correspondem ao 1<sup>o</sup>, 5<sup>o</sup> e 135<sup>o</sup> varrimento.

Como se pode constatar pela observação da Figura III.4, a aplicação de voltametria cíclica detecta a formação de depósitos à superfície do eléctrodo, já que o 1º varrimento é bastante deformado. Por outro lado, à medida que o potencial vai sendo varrido, o voltamograma torna-se progressivamente mais definido, com especial interesse na forma do pico de desorção de hidrogénio, que não só se torna mais bem definido, mas cuja altura também aumenta. Teoricamente, isto seria indicativo de um eléctrodo limpo, ou seja, livre de qualquer impureza à sua superfície. Contudo, a observação da superfície do eléctrodo por microscopia de epifluorescência revelou que a remoção das células não tinha sido total, mas que ainda permaneciam muitas células na superfície do eléctrodo (Figura III.5 (b)).



**Figura III.5.** Fotografias obtidas por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) dum eléctrodo de platina onde cresceu um biofilme de 2 horas: (a) antes e (b) depois de voltametria cíclica em tampão fosfato pH 7, entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V e a uma velocidade de varrimento de 0.250 V s<sup>-1</sup>.

Comparando a Figura III.5 (a) com a Figura III.5 (b), denota-se que, efectivamente, existe uma diminuição do número de células bacterianas na superfície. Observa-se ainda, que algumas das células remanescentes na superfície do eléctrodo se encontram mortas (uma vez que se encontram coradas de vermelho). O aparecimento de células bacterianas mortas

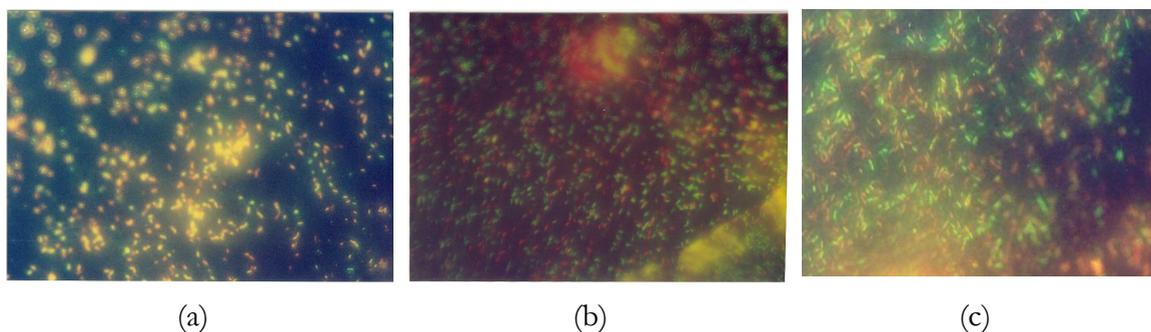
pode estar relacionado com as variações de pH que ocorrem durante o varrimento do potencial, no entanto discutir-se-á este assunto posteriormente. Nesta fase não foi efectuada a quantificação das células pois o que se pretendia era verificar se ocorria uma remoção completa das células, de forma a que o sensor estivesse, no final de cada monitorização, completamente livre de células e, assim, apto para novas medições.

Dado que uma das finalidades do trabalho era a obtenção de um eléctrodo limpo, e assim pronto para uma nova monitorização, o passo seguinte foi o estudo das condições que permitiriam a remoção total de células, tendo sido estudado o efeito da velocidade de varrimento, pH e limites de potencial, conforme o exposto no Capítulo Material e Métodos.

### ***Varição da velocidade de varrimento***

Variou-se a velocidade de varrimento entre 0.150 e 0.500 V s<sup>-1</sup>. Em nenhum dos casos estudados se conseguiu remoção total das células bacterianas da superfície. Contudo, observou-se que para velocidades de varrimento menores existe mais remoção (Figura III. 6). Tal como foi visto no Capítulo Introdução, a velocidade de varrimento está relacionada com o tempo em que eléctrodo está exposto ao potencial, sabendo-se que, para velocidades muito baixas, as espécies se vão difundindo para o seio da solução. No Capítulo Introdução as espécies referidas são espécies moleculares, e portanto muito mais pequenas do que as células bacterianas. Contudo, põe-se a hipótese de poder ocorrer o mesmo fenómeno com as células (voltar-se-á a este assunto mais adiante). Quando o potencial é varrido, o eléctrodo de platina (eléctrodo de trabalho) durante cada varrimento passa da zona de potencial positivo para a zona de potencial negativo, e regressa novamente à zona de

potencial positivo (voltametria cíclica). Embora a *Pseudomonas fluorescens* apresente carga superficial negativa tal como a platina, existem forças de atracção superiores que se sobrepõem à repulsão natural que poderia existir, promovendo ligações entre bactérias e platina (Oliveira, 1992). Quando o potencial é varrido na parte negativa, a superfície de platina fica muito mais negativa, ocorrendo maior repulsão entre as duas superfícies e, conseqüentemente, libertação das células bacterianas. Deste modo, para velocidades de varrimento menores a bactéria *Pseudomonas fluorescens* está mais tempo exposta à zona negativa do potencial antes de regressar à positiva. Deste modo, havendo mais tempo de uma situação que promove a repulsão ocorre uma maior libertação das células. Este assunto irá ser discutido com mais detalhe adiante, quando se estudar a influência das condições de operação na viabilidade e remoção do biofilme.

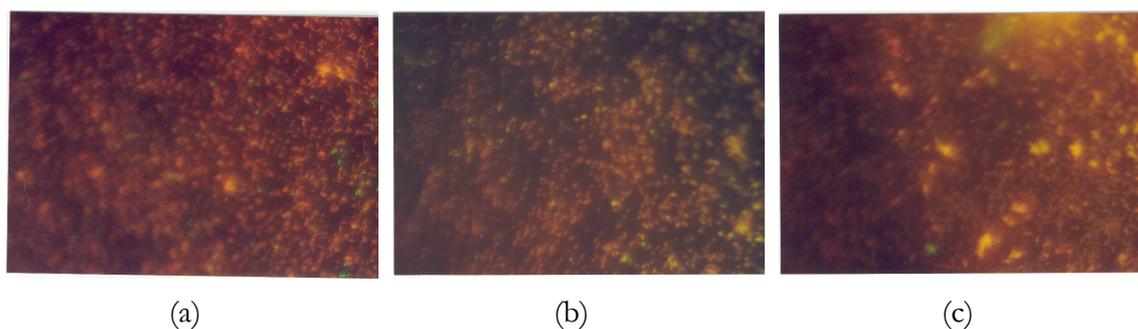


**Figura III.6.** Fotografias obtidas por microscopia de epifluorescência (ampliação 400x) dum eléctrodo de platina onde cresceu um biofilme de 2 horas, após voltametria cíclica em tampão fosfato pH 7, entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V e a uma velocidade de varrimento de: (a)  $0.150 \text{ V s}^{-1}$  (b)  $0.250 \text{ V s}^{-1}$  e (c)  $0.500 \text{ V s}^{-1}$ .

#### ***Utilização de soluções electrolíticas de diferente pH***

Com o objectivo de avaliar se o pH da solução electrolítica influenciava a remoção das células, realizaram-se experiências utilizando soluções electrolíticas de diferentes pH. De facto, se se comparar a Figura III.6 (b) e a Figura III.7 (b) verifica-se que a variação do pH

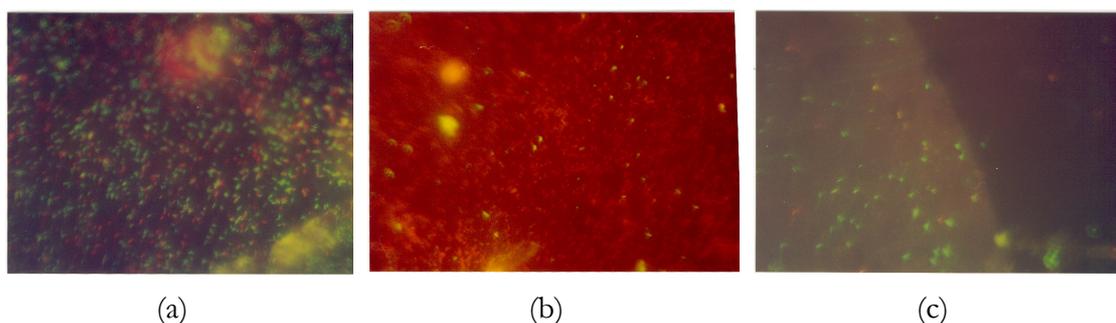
da solução electrolítica não é relevante em termos de remoção celular. No entanto, no final dos ensaios electroquímicos, no caso em que se utilizou pH 4, todas as células estavam mortas (Figura III.7 (b)). Para se averiguar as causas da morte celular, mergulharam-se os eléctrodos com biofilme de 2 horas, durante 30 minutos, numa solução contendo tampão fosfato pH 4 e observaram-se ao microscópio, sem ser aplicada voltametria cíclica. Constatou-se, então, que o pH da solução por si só foi suficiente para provocar a morte de todas as células (Figura III.7 (a)). Isto ocorreu porque a *Pseudomonas fluorescens* cresce a pH neutro e em meio tamponado, e uma variação do pH é tóxica e letal para esta espécie. Por outro lado, não se nota maior remoção de células relativamente ao caso em que se aplica voltametria cíclica nas condições do ensaio 1 (velocidade de varrimento:  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , limites de potencial:  $-0.5$  a  $1.0 \text{ V}$ , em tampão fosfato pH 7), o que pode ser indicativo de que se estabelecem forças relativamente fortes de atracção entre a superfície das células e da platina, independentes da viabilidade das células. De facto, Chen & Stewart (2000) já tinham referido que variações no pH não são suficientes para provocar remoção de biofilmes, embora sejam capazes de provocar morte celular.



**Figura III.7.** Fotografias obtidas por microscopia de epifluorescência (ampliação 400x) dum eléctrodo de platina onde cresceu um biofilme de 2 horas, após (a) o eléctrodo ter sido imerso em tampão fosfato pH 4 durante 30 minutos; após voltametria cíclica a uma velocidade de varrimento de  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , entre os limites de potencial  $-0.5$  e  $1.0 \text{ V}$  e em tampão fosfato (b) pH 4 e (c) pH 7 (após imersão em pH 4).

### *Variação dos limites de potencial*

Por último modificaram-se os limites de potencial. Em primeiro lugar variou-se o limite positivo, tendo este sido aumentado até 1.5 V. Verificou-se existir menos remoção celular, mas todas as células estavam mortas (Figura III.8 (b)). Isto vai de encontro ao que foi observado anteriormente, ou seja, que a remoção do biofilme é independente da viabilidade das células, tal como já tinha sido publicado por Chen & Stewart (2000) que sugerem que os métodos que são eficazes na remoção celular não são necessariamente capazes de as inviabilizar e os que conseguem provocar a morte das células podem não ser capazes de as remover.



**Figura III.8.** Fotografias obtidas por microscopia de epifluorescência (ampliação 400x) dum eléctrodo de platina onde cresceu um biofilme de 2 horas, após voltametria cíclica em tampão fosfato pH 7, a uma velocidade de varrimento de  $0.250 \text{ V s}^{-1}$  e entre os limites de potencial: (a) -0.5 e 1.0 V; (b) -0.5 e 1.5 V e (c) -2.0 e 1.0 V.

Quando o potencial é varrido podem ocorrer dois tipos de influências: do potencial e da intensidade de corrente, o que pode explicar os dois tipos de resultados diferentes: maior remoção e maior morte celular, como se passa a explicar:

**❖ Potencial positivo**

Quando o potencial é positivo, a carga superficial da platina torna-se positiva. Portanto, como a carga superficial das bactérias é negativa aumenta a atracção entre as superfícies.

**❖ Potencial negativo**

Quando o potencial aplicado é negativo a carga da platina torna-se ainda mais negativa. Note-se que a carga original da platina é também negativa, e, por essa razão, aumenta ainda mais a força de repulsão entre as bactérias e a platina.

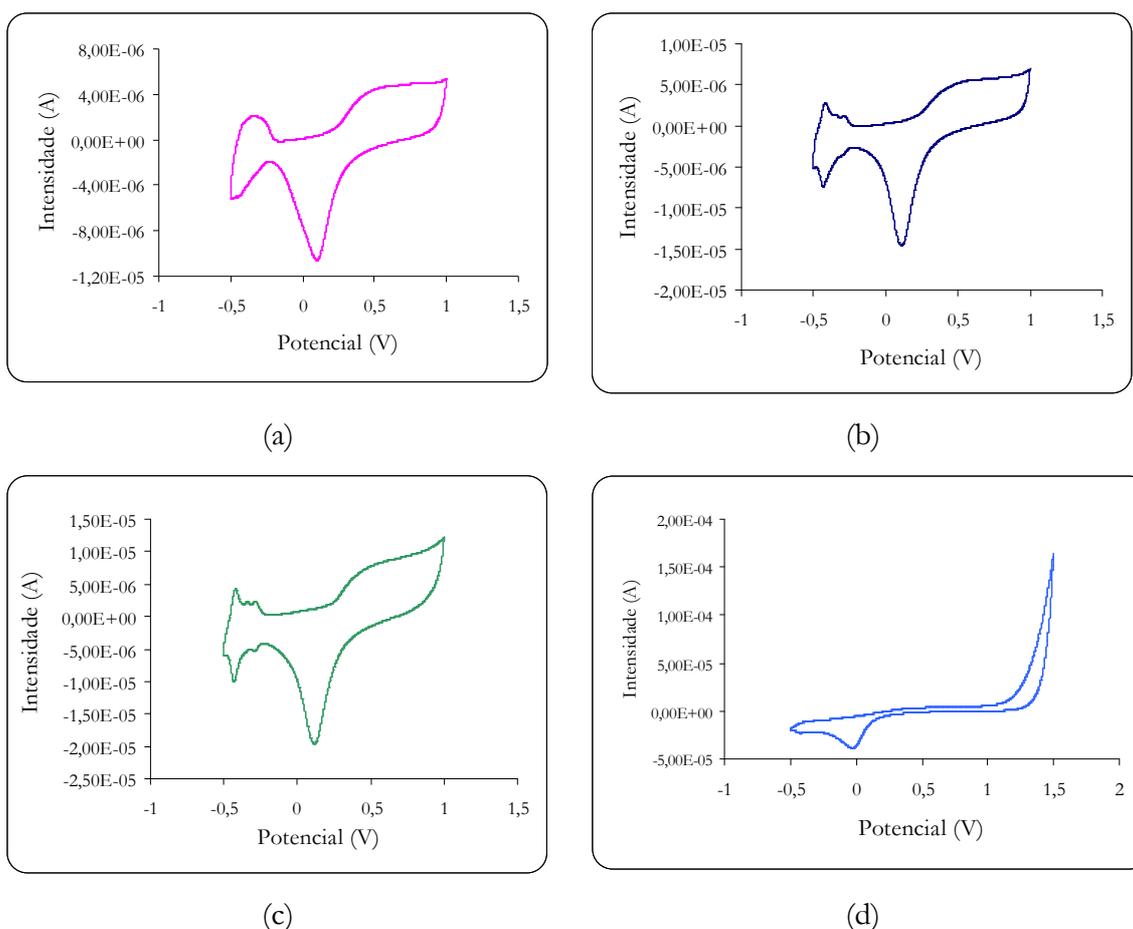
**❖ Intensidade de corrente positiva**

Obter uma intensidade de corrente positiva como resposta às reacções que estão a ocorrer na superfície do eléctrodo (de trabalho), significa que este está a funcionar como ânodo e portanto está a formar-se  $H^+$  à superfície do eléctrodo, o qual é tóxico para as células, pois origina um abaixamento do pH.

**❖ Intensidade de corrente negativa**

Se a intensidade de corrente obtida como resposta for negativa então o eléctrodo está a funcionar como cátodo, formando-se  $OH^-$  à superfície do eléctrodo.

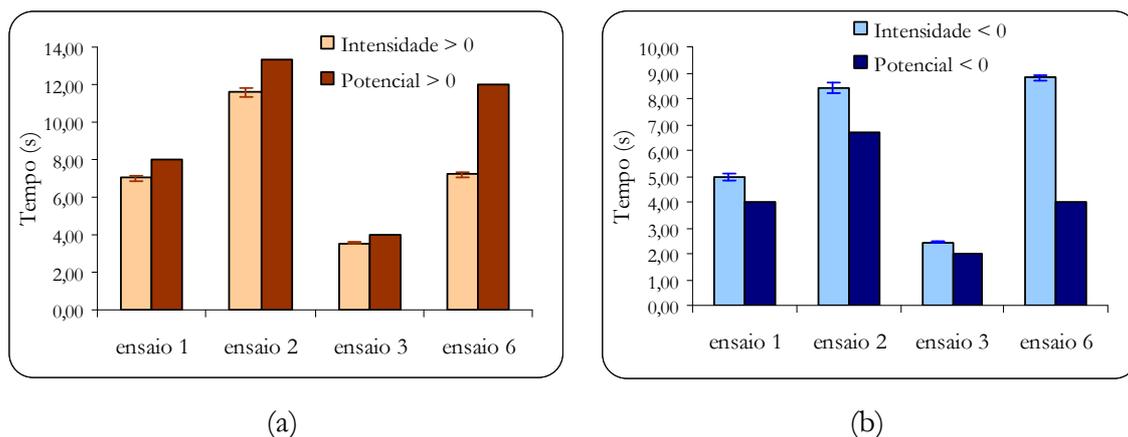
De facto, observando a Figura III.9 (voltamogramas cíclicos obtidos em eléctrodos de platina com biofilme de 2 horas na superfície) pode verificar-se que alterando as condições de operação, a intensidade de corrente obtida varia, o que se traduz numa diferença na forma dos voltamogramas cíclicos.



**Figura III.9.** Voltamogramas cíclicos dum eléctrodo de platina em tampão fosfato pH 7, entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V, a uma velocidade de varrimento de (a)  $0.150 \text{ V s}^{-1}$ ; (b)  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ ; (c)  $0.500 \text{ V s}^{-1}$  e (d) entre os limites de potencial -0.5 e 1.5 V, a uma velocidade de varrimento  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ .

A partir dos resultados obtidos, calculou-se o tempo em que o potencial era negativo (igual para todos os eléctrodos dentro do mesmo ensaio, isto é, nas mesmas condições de

operação) e o tempo médio em que a intensidade de corrente era negativa (variou ligeiramente para cada um dos eléctrodos dentro de cada ensaio), construindo-se os gráficos da Figura III.10. Note-se que cada ensaio corresponde a diferentes condições de operação. Os exemplos de cálculo encontram-se no Anexo III, e as Tabelas com todos os valores retirados encontram-se no Anexo IV.



**Figura III.10.** Tempo em que cada eléctrodo está a uma intensidade de corrente e a um potencial (a) positivos e (b) negativos. Condições dos vários ensaios: ensaio 1 – velocidade de varrimento:  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , limites de potencial:  $-0.5$  a  $1.0 \text{ V}$ , em tampão fosfato pH 7; ensaio 2 – velocidade de varrimento:  $0.150 \text{ V s}^{-1}$ , limites de potencial:  $-0.5$  a  $1.0 \text{ V}$ , em tampão fosfato pH 7; ensaio 3 – velocidade de varrimento:  $0.500 \text{ V s}^{-1}$ , limites de potencial:  $-0.5$  a  $1.0 \text{ V}$ , em tampão fosfato pH 7; ensaio 6 – velocidade de varrimento:  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , limites de potencial:  $-0.5$  a  $1.5 \text{ V}$ , em tampão fosfato pH 7.

Como é de esperar, aumentando a velocidade de varrimento diminui o tempo total de cada ciclo, já que os limites de potencial são os mesmos. Consequentemente, o tempo durante o qual cada eléctrodo está exposto a cada zona de potencial (positiva ou negativa) é menor. Para a intensidade de corrente, a análise da Figura anterior demonstra que existe uma diminuição do tempo ao qual cada eléctrodo funcionou como ânodo e como cátodo (intensidade de corrente positiva e negativa, respectivamente) com o aumento da velocidade de varrimento. Quando se aumenta o limite de potencial até  $1.5 \text{ V}$ , o tempo

durante o qual o eléctrodo está a uma intensidade de corrente negativa aumenta (o valor é semelhante ao obtido para o ensaio 2, em que a velocidade de varrimento é  $0.150 \text{ V s}^{-1}$ ), mas o tempo em que o eléctrodo se encontra a um potencial negativo permanece igual ao obtido para o ensaio 1 (limites de potencial entre  $-0.5$  e  $1.0 \text{ V}$  e velocidade de varrimento  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ ).

Quando se varre o potencial a uma velocidade de varrimento de  $0.150 \text{ V s}^{-1}$ , obtém-se maior remoção celular, a qual foi atribuída ao facto de, nestas condições, o eléctrodo permanecer muito mais tempo ao potencial negativo do que quando se varreu o potencial nas outras condições de operação. Deste modo, o eléctrodo deverá ter estado o tempo suficiente para que as forças de repulsão exercidas entre a platina e as células tenham quebrado as ligações que foram estabelecidas e, assim, ocorra libertação das células. Isto é, como foi referido anteriormente embora a platina e a superfície das células sejam negativas, estabelecem-se forças superiores às forças de repulsão natural entre estas duas superfícies e que promovem a adesão. No entanto, quando o potencial é varrido a valores negativos a superfície da platina torna-se muito mais negativa, originando forças de repulsão muito maiores, que acabam por ser superiores às forças anteriormente estabelecidas. Quando o potencial é varrido a uma velocidade de varrimento de  $0.250 \text{ V s}^{-1}$  (ensaio 1) e  $0.500 \text{ V s}^{-1}$  (ensaio 3), o intervalo de tempo durante o qual o eléctrodo está sujeito a um potencial negativo não é suficientemente elevado para promover o rompimento dessas ligações, enquanto que varrendo o potencial a uma velocidade de  $0.150 \text{ V s}^{-1}$  (ensaio 2), o tempo de repulsão foi suficiente para quebrar essas ligações.

Por outro lado, quando o potencial é varrido entre  $-0.5$  e  $1.5 \text{ V}$  todas as células parecem estar mortas, à semelhança do que aconteceu quando se mergulharam os eléctrodos na

solução tampão pH 4. Isto sugere que ocorrem mudanças de pH locais, resultado da hidrólise da água, com conseqüente formação de  $H^+$ , o tempo suficiente para provocar a morte das células.

Observando a Figura III.10 (a), quando se varre o potencial nas condições do ensaio 1 (-0.5 a 1.0 V) e nas condições do ensaio 6 (-0.05 a 1.5 V) o tempo durante o qual o eléctrodo está a funcionar como ânodo (isto é, a está sujeito a uma intensidade de corrente positiva), com conseqüente produção de  $H^+$  (Stewart *et al.*, 1999), é semelhante nos dois casos, porém ainda se podem observar bastantes células vivas no primeiro caso. Deste modo, não parece ser a produção de  $H^+$  a responsável pela morte celular. Por outro lado, quando se varre o potencial a uma velocidade de varrimento de  $0.150 \text{ V s}^{-1}$ , o tempo durante o qual o eléctrodo está a funcionar como ânodo é muito superior ao tempo em que o eléctrodo funciona como ânodo nas condições do ensaio 6 (-0.5 a 1.5 V), no entanto as células remanescentes estão vivas, o que vem reforçar a ideia de não ser o  $H^+$  o responsável pela morte celular. Deste modo, mesmo que as células estejam expostas durante algum tempo a iões  $H^+$ , o tempo e a concentração de iões formados a partir da hidrólise da água não são suficientes para que ocorra morte celular total. De notar que mesmo assim, aparecem algumas células mortas.

A Figura III.10 (b) demonstra que quando o potencial é varrido entre -0.5 e 1.5 V obtém-se como resposta uma intensidade de corrente negativa durante mais tempo do que para as condições do ensaio 1 (limites de potencial -0.5 e 1.0 V e velocidade de varrimento  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ ). Quando a intensidade de corrente é negativa, significa que, nesta zona, o eléctrodo de trabalho está a funcionar como cátodo (Figura I.18) havendo formação de  $OH^-$ , que leva a um aumento do pH local, o que, neste caso, parece ser a razão para tornar as células

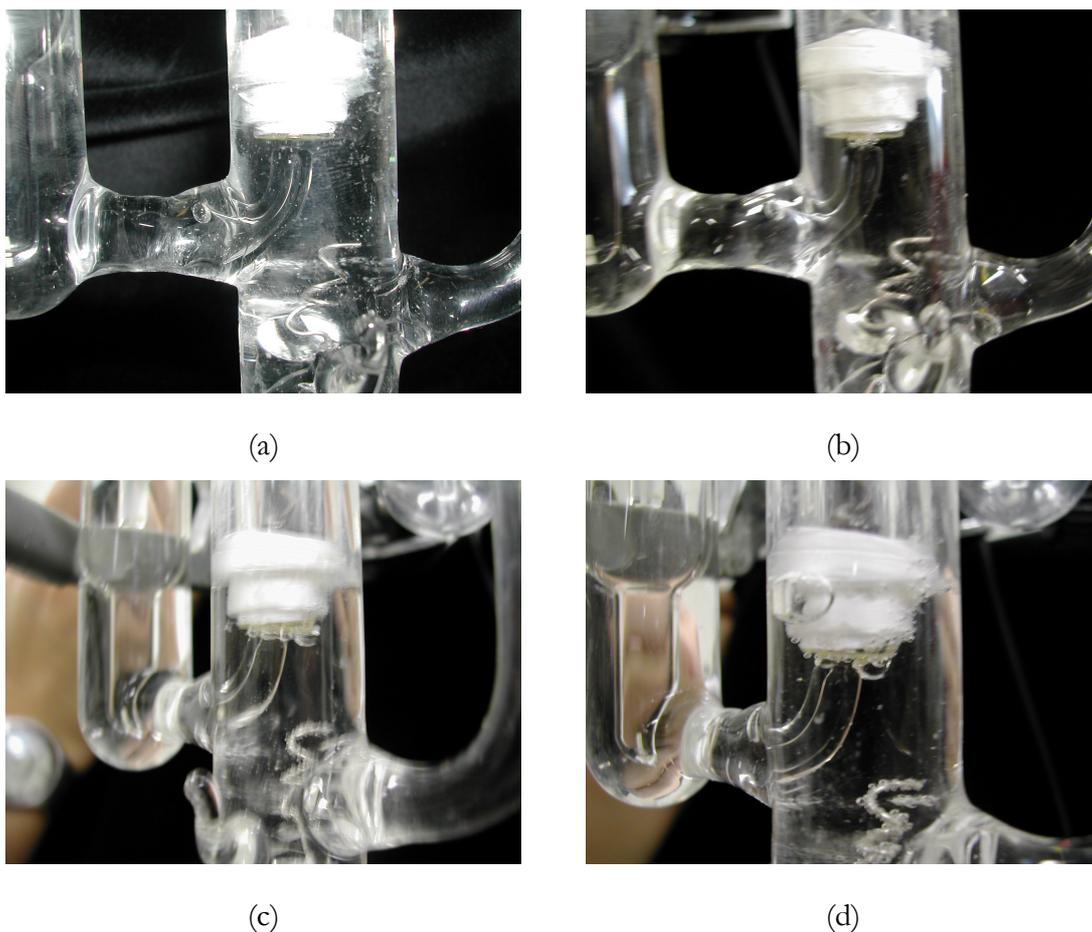
bacterianas inviáveis, já que é o único parâmetro que difere relativamente aos ensaios 1 e 3 (velocidade de varrimento 0.250 e 0.500 V s<sup>-1</sup>, respectivamente, e limites de potencial entre -0.5 e 1.0 V). Quando o potencial é varrido entre -0.5 e 1.0 V a 0.150 V s<sup>-1</sup>, o tempo durante o qual a intensidade de corrente obtida é negativa é ligeiramente inferior ao tempo de quando se varre o potencial entre -0.5 e 1.5 V (ensaio 6), mas embora haja muito mais remoção celular, de facto constata-se que a maioria das células remanescentes está viva (Figura III.6 (a)), o que demonstra ser a produção de OH<sup>-</sup> a responsável pela morte celular.

Voltando novamente à Figura III.8, na fotografia assinalada com (c), pode observar-se que a superfície do eléctrodo está quase totalmente limpa (sem células). Quando o potencial é varrido até limites de potencial tão negativos ocorre a formação de bolhas de hidrogénio que podem provocar uma libertação mecânica das células aderidas. Estudos anteriores já tinham sugerido que a passagem de bolhas de gás poderiam impedir a adesão das células (Dhar *et al.*, 1982) ou mesmo promover a remoção de células (Gómez-Suárez *et al.*, 2001a) ou de outras partículas (Gómez-Suárez *et al.*, 2001b) de superfícies onde estejam aderidas. Todavia, com este trabalho constatou-se que estas também podem ser eficazes na remoção de biofilme, e com a diferença de se formarem as bolhas *in situ*, pelo método de voltametria cíclica.

Concluiu-se então que a formação de bolhas pode ser um parâmetro a considerar para a erradicação de biofilmes. Tornou-se, assim, necessário investigar as melhores condições para a libertação de biofilmes de várias idades da superfície dos eléctrodos.

### III.3. Estudo da influência da formação de bolhas de hidrogénio na remoção do biofilme

No subcapítulo anterior o facto de se levar o potencial a valores muito negativos (-2.0 V) foi determinante na remoção do biofilme, alertando para o facto das bolhas gasosas formadas causarem uma libertação mecânica das células bacterianas. O potencial era, porém, varrido entre -2.0 e 1.0 V, e, portanto, a formação das bolhas não era contínua. Nesta parte do trabalho manteve-se o potencial a -2.0 V, em que as bolhas se formaram ininterruptamente. Na Figura III.11 observa-se o desenvolvimento da formação das bolhas, quando o potencial está a -2.0 V durante 10 minutos.



**Figura III.11.** Fotografia de parte da célula electroquímica e do eléctrodo de trabalho (a) antes da formação de bolhas; após a formação de bolhas (b) início; (c) ao fim de 1 minuto; e (d) ao fim de 10 minutos.

Pela a análise da Figura III.11 constata-se que, inicialmente, se formam bolhas muito pequenas, as quais vão aumentando de tamanho (por coalescência) à medida que o potencial é varrido e se formam mais bolhas, até atingirem um volume que as obriga a libertarem-se da superfície do eléctrodo. Ao libertarem-se empurram e varrem o biofilme da superfície do eléctrodo. É agora necessário investigar a relação entre o tempo de formação de bolhas necessário para libertar o biofilme acumulado na superfície dos eléctrodos de platina (que depende da idade do biofilme). Para tal testaram-se diferentes tempos de formação de bolhas em biofilmes de diferentes idades. Na Tabela III.1 estão sumariadas as condições testadas e os resultados obtidos. De notar que para idades de biofilme maiores do que 4 horas, se efectuou um varrimento do potencial entre -0.5 e 1.0 V, previamente à formação de bolhas. A formação das bolhas de hidrogénio foi efectuada por um potencial a -2.0 V.

A tabela III.1. mostra claramente que o tempo de formação de bolhas necessário para promover a limpeza do eléctrodo de platina aumenta com a idade do biofilme

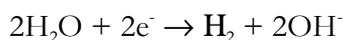
**Tabela III.1.** Remoção de biofilmes de diferentes idades e condições experimentais aplicadas.

Idade do biofilme	Formação de bolhas* (min)	Varrimento do potencial**	Remoção do biofilme
2 horas	1	-	Total
4 horas	1	-	Parcial
	2	-	Total
24 horas	2	30	Parcial
	4	-	Parcial
	4	30	Total
3 dias	8	30	Parcial
	10	-	Parcial
	10	30	Total
5 dias	10	-	Parcial
	10	30	Total
7 dias	10	30	Parcial
	15	30	Parcial
	15+15	30	Parcial

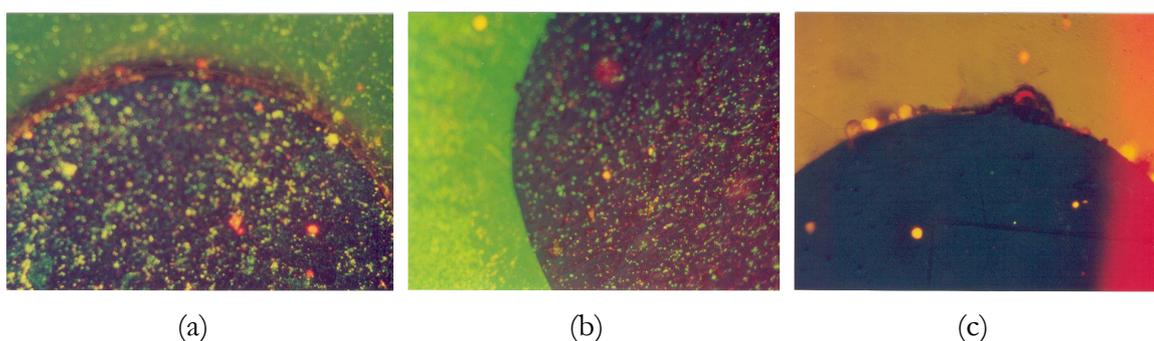
\* A formação de bolhas foi promovida por um potencial a -2.0 V.

\*\* O varrimento do potencial foi efectuado entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V, a uma velocidade de varrimento de 0.250 V s<sup>-1</sup>.

Tal como já foi referido anteriormente, se o potencial for varrido a valores muito baixos ou altos, ocorre a formação de bolhas de gás (hidrogénio e oxigénio, respectivamente), como resultado da electrólise da água. Quando o potencial é varrido a -2.0 V o eléctrodo de trabalho funciona como cátodo, formando-se bolhas de hidrogénio segundo a reacção (Stewart *et al.*, 1999)

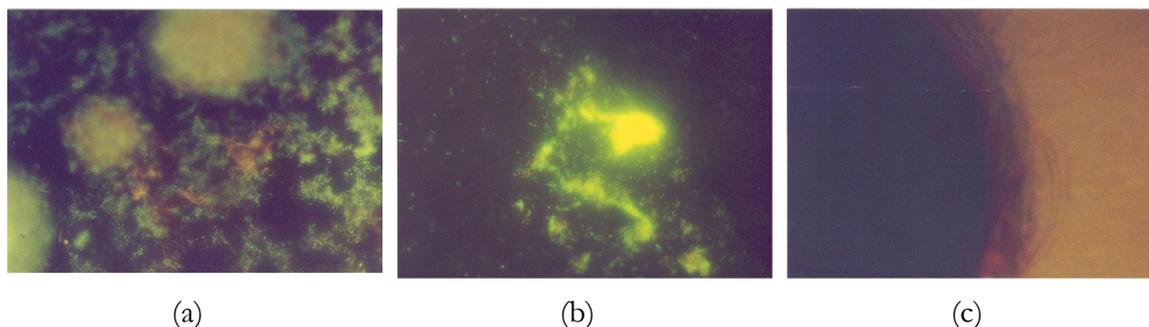


Em biofilmes muito novos as células aderidas não cobrem na totalidade a superfície do eléctrodo, sendo por isso muito rapidamente removidas: 1 minuto de formação de bolhas *in situ* é suficiente para limpar um eléctrodo que tenha na sua superfície um biofilme de 2 horas. Para um biofilme de 4 horas, a formação de bolhas durante 1 minuto não é suficiente para erradicar totalmente o biofilme (Figura III.12 (b)). Contudo se se aumentar a duração de bolhas para 2 minutos já se obtém uma limpeza total (Figura III.12 (c)).



**Figura III.12.** Fotografias obtidas por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) dum eléctrodo de platina onde cresceu um biofilme de 4 horas (a) antes da formação de bolhas; após a formação de bolhas (b) durante 1 minuto e (c) durante 2 minutos.

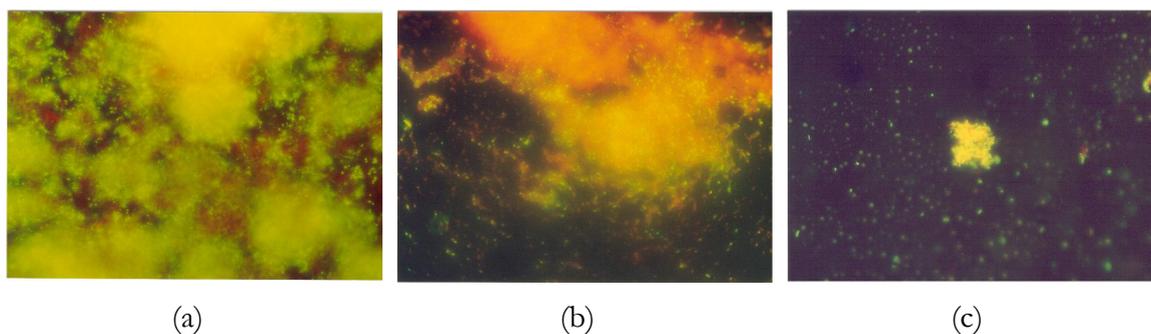
Para biofilmes mais velhos a formação de bolhas à superfície do eléctrodo por si só não é capaz de remover o biofilme. Experiências efectuadas revelam que é necessário varrer o potencial nas condições estabelecidas para o ensaio 1 (limites de potencial  $-0.5$  e  $1.0$  V, a uma velocidade de varrimento de  $0.250$  V s<sup>-1</sup>) e conjugar com o tempo de formação de bolhas. Assim, para um biofilme de 24 horas é necessário varrer o potencial durante 30 minutos e manter o potencial a  $-2.0$  V durante 4 minutos, para obter a limpeza da superfície.



**Figura III.13.** Fotografias obtidas por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) dum eléctrodo de platina onde cresceu um biofilme de 24 horas (a) antes da voltametria cíclica; após a formação de bolhas durante 4 minutos (b) sem varrer o potencial e (c) após varrer o potencial nas condições do ensaio 1.

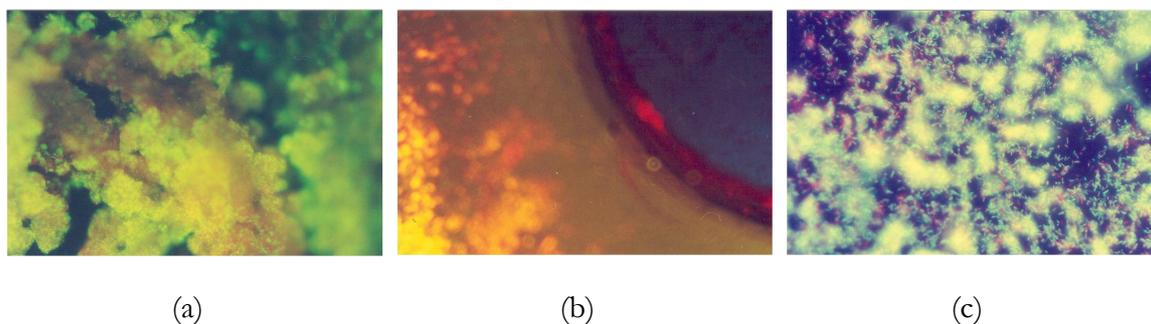
Pela análise da Figura III.13 (a) pode ainda constatar-se que um biofilme de 24 horas já entrou na fase de maturação, com produção de polímeros, que são as manchas verde-amareladas.

Biofilmes de 3 e 5 dias necessitam de um elevado tempo de formação de bolhas para serem removidos, que ascende aos 10 minutos, após varrimento do potencial durante 30 minutos. Neste caso a quantidade de biofilme formado é muito elevada, havendo também quantidades apreciáveis de polímeros. O facto de biofilmes de diferentes idades (3 e 5 dias) poderem ser removidos com o mesmo tempo de formação de bolhas pode ser explicado tendo em consideração que, em certos casos, a fase de maturação pode ocorrer em simultâneo, com a fase de desprendimento (neste caso fala-se do desprendimento natural que ocorre em certas zonas dos biofilmes) e, conseqüentemente a quantidade de biofilme ser praticamente igual (Bryer, 2000). Na Figura III.14 (a) representa-se um biofilme de 3 dias, onde se pode contemplar a grande quantidade de polímeros formados, que quase cobrem a superfície do eléctrodo.



**Figura III.14.** Fotografias obtidas por microscopia de epifluorescência (ampliação 100X) dum eléctrodo de platina onde cresceu um biofilme de 3 dias (a) antes da voltametria cíclica; após a formação de bolhas durante 10 minutos (b) sem varrer o potencial e (c) após varrer o potencial nas condições do ensaio 1.

Na Figura III.15 pode observar-se um biofilme de 5 dias. Salienta-se o facto de haver uma quantidade muito grande de polímeros que praticamente cobrem a superfície do eléctrodo, bem como a quantidade de biofilme que se encontra na zona de vidro, que rodeia o eléctrodo.



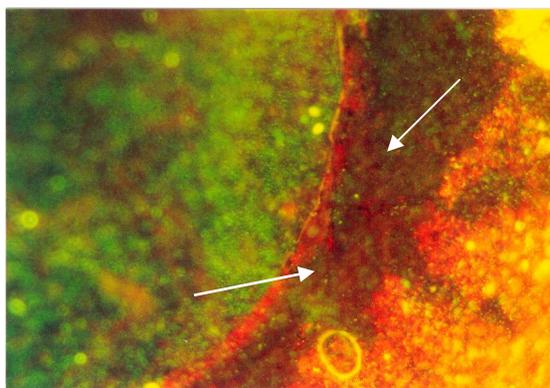
**Figura III.15.** Fotografias obtidas por microscopia de epifluorescência (ampliação 100X) dum eléctrodo de platina onde cresceu um biofilme de 5 dias (a) antes da voltametria cíclica; após varrer o potencial nas condições do ensaio 1 e a formação de bolhas durante 10 minutos (b) zona da platina e vidro (c) zona do vidro.

Em biofilmes mais velhos, quando apenas se promove a formação de bolhas por um potencial a  $-2.0$  V estas não são suficientes para remover o biofilme, quer porque a quantidade de biofilme formado já é consideravelmente elevada (existe uma grande

quantidade de células aderidas, bem como de polímeros extracelulares), quer porque se supõe que as forças de ligação com a superfície e no biofilme sejam mais fortes. Admite-se, deste modo, que o varrimento do potencial vai, de algum modo, enfraquecer essas ligações deixando um espaço (ainda que microscópico) entre as células e a superfície de platina, que será ocupado por água. Assim, existe uma área maior onde se podem formar as bolhas de hidrogénio que varrem e empurram o biofilme, libertando-o da platina e da zona do vidro que circunda a platina. Salienta-se, porém, o facto de que mesmo sem que o potencial seja varrido, a formação de bolhas é capaz de remover grande quantidade de biofilme (Figuras III.13 (b) e III.14 (b)). Isto acontece porque a formação de bolhas devido à electrólise da água não ocorre somente nos espaços vazios (sem biofilme), mas também em zonas de platina cobertas por biofilme. De facto, o biofilme é constituído maioritariamente por água (cerca de 90%), logo pode ocorrer a hidrólise da água presente no biofilme, originando bolhas de gás quando o potencial é muito baixo. Na realidade essas bolhas que se formam empurram o biofilme da superfície. Para além disso, quando as bolhas se afastam da zona de formação, junto à superfície, fazem o “varrimento” do biofilme da superfície, mesmo daquelas zonas (vidro) onde não se formam bolhas. As bolhas que eventualmente se formam no interior da matriz podem enfraquecer a estrutura da matriz, conduzindo ao desprendimento de parte do biofilme (Gantzer *et al.*, 1989)

Com o objectivo de ilustrar estes fenómenos apresenta-se a Figura III.16 onde é possível observar um eléctrodo de platina com um biofilme de 3 dias, após ter sido promovida a formação de bolhas. Nesta imagem é bem visível uma zona do vidro, mais afastada da platina, mais densamente colonizada (zona corada a laranja). A zona indicada pelas setas é ainda vidro, no entanto, contrariamente ao que seria de esperar, esta zona não apresenta células, pois estas foram “varridas” pelas bolhas que as empurraram para a zona do vidro

mais afastada da platina. Finalmente, na superfície de platina verifica-se que existe uma diminuição apreciável do biofilme e da quantidade de polímeros (zona corada a verde). Note-se que ainda existem células na superfície da platina, uma vez que apenas foram formadas bolhas sem o potencial ter sido varrido previamente, o que já se tinha constatado que não é um procedimento suficiente para limpar a superfície do eléctrodo de platina.

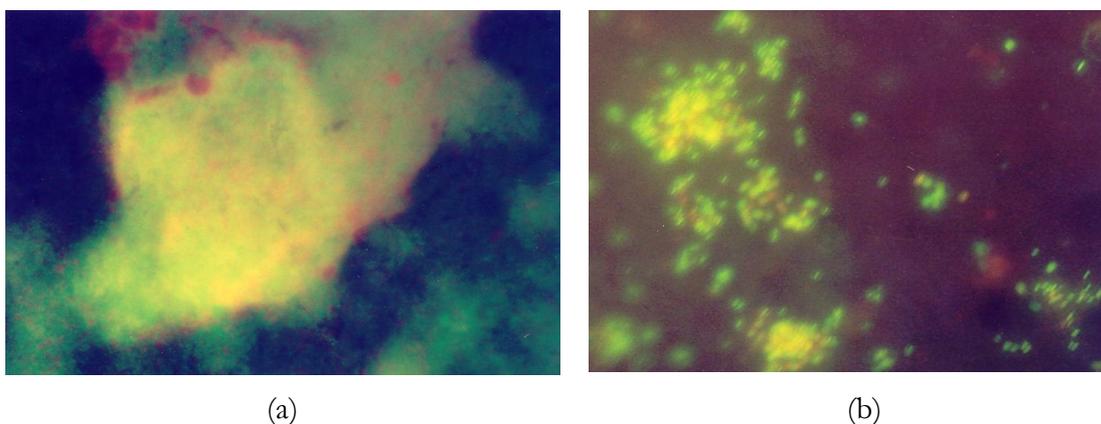


**Figura III.16.** Fotografias obtidas por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) dum eléctrodo de platina onde cresceu um biofilme de 3 dias após a passagem das bolhas.

Para biofilmes de 7 dias não se atingiu o objectivo pretendido, pois não foi possível obter uma superfície completamente limpa. Após o varrimento do potencial entre -0.5 e 1.0 V a  $250 \text{ V s}^{-1}$  (condições do ensaio 1), durante 30 minutos, seguido da formação de bolhas durante 15 minutos, ainda eram visíveis bastantes células. Experimentou-se, então, um procedimento diferente: varreu-se o potencial nas condições do ensaio 1 durante 30 minutos, formaram-se bolhas durante 15 minutos, as quais foram removidas por agitação mecânica do eléctrodo, formando-se novamente bolhas durante 15 minutos. Pretendia-se, desta forma, que a segunda formação de bolhas arrastasse as células remanescentes após o primeiro procedimento. Contudo, comprovou-se que as células estão de tal forma aderidas,

isto é, as forças de adesão são de tal ordem elevadas, que não é possível removê-las por esta técnica, pois não se consegue quebrar estas ligações.

A Figura III.17 mostra fotografias de um eléctrodo de platina com biofilme de 7 dias na superfície, antes e após a formação de bolhas de hidrogénio (2 vezes).



**Figura III.17.** Fotografias obtidas por microscopia de epifluorescência (ampliação 630x) dum eléctrodo de platina onde cresceu um biofilme de 7 dias (a) antes da voltametria cíclica; (b) após varrer o potencial nas condições do ensaio 1 (-0.5 e 1.0 V a  $250 \text{ V s}^{-1}$ ) e a formação de bolhas durante 15 minutos seguida de nova formação de bolhas durante 15 minutos.

## Capítulo IV

---

### Conclusões e propostas de trabalho futuro

Neste capítulo apresentam-se as conclusões extraídas após a execução deste estudo e propõem-se alguns trabalhos com o intuito de aprofundar alguns assuntos aqui tratados e a continuar as experiências, de forma a que este método possa vir a ser implementado na monitorização de biofilmes na indústria.

Após a análise dos resultados pode concluir-se que o método de voltametria cíclica pode ser uma técnica poderosa na monitorização de biofilmes, uma vez que existe uma relação entre a altura do pico de desorção do hidrogénio e a percentagem de área do eléctrodo de trabalho coberta com biofilme. Assim, quanto menor for a altura desse pico maior será a quantidade de biofilme formado. Se por alguma razão o biofilme formado tiver uma espessura demasiado elevada em que o contacto entre os eléctrodos de trabalho e de referência esteja dificultado, o voltamograma é bastante deformado, não sendo sequer possível medir a altura do pico de desorção de hidrogénio. Verificou-se, ainda, que a aplicação de apenas um varrimento de voltametria cíclica não destrói o biofilme, permitindo uma monitorização em contínuo do biofilme (isto é, seguir a formação do biofilme ao longo do tempo).

Relativamente ao estudo das condições de voltametria cíclica aplicadas, comprovou-se que a voltametria cíclica, aplicada repetidamente, por si só, não é capaz de originar um eléctrodo limpo, isto é, livre de células ou biofilme. Conseguiu-se obter mais remoção diminuindo a velocidade de varrimento do potencial e foi também possível obter uma morte total das células aumentando o limite positivo do potencial ou diminuindo o pH da solução. No entanto, verificou-se só ser possível obter um eléctrodo limpo através da formação de bolhas de gás, neste caso concreto bolhas de hidrogénio, uma vez que as bolhas se formaram devido a um potencial de -2.0 V, as quais promovem a libertação mecânica das células.

A partir dos resultados obtidos após o estudo das condições de voltametria cíclica concluiu-se que, para se obter um eléctrodo sem células, era fundamental promover-se a

formação de bolhas (neste caso de hidrogénio), as quais, formando-se na superfície de platina do eléctrodo, varriam e empurravam as células. Concluiu-se que biofilmes num estado inicial de formação – 2 e 4 horas – são facilmente removidos, sendo somente necessário recorrer-se à formação de bolhas. No caso de biofilmes mais velhos – com mais de 24 horas – é necessário que o potencial seja varrido a  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V antes da formação de bolhas, para haver erradicação do biofilme. Denotou-se, ainda, que biofilmes com 7 dias de idade, não podem ser completamente erradicados, mesmo que se efectue uma segunda formação de bolhas de hidrogénio. Conclui-se, então, que quanto mais velho for o biofilme, maior é o tempo de formação de bolhas gasosas necessário para limpar o eléctrodo. Este resultado é talvez devido a crescentes forças de atracção entre as células e a superfície que se vão estabelecendo com a idade, tornando-se de tal modo fortes que deixam de poder ser quebradas apenas pela passagem de bolhas, necessitando que uma força de atrito maior. Para além disso, apesar das bolhas se poderem formar entre o biofilme e a platina, este fenómeno ocorre com maior acuidade nas zonas descobertas, que são menores quanto mais velho for o biofilme.

Com a primeira fase do trabalho pretendeu-se monitorizar biofilmes, tendo indicação da quantidade de biofilme formada ao longo do tempo. Quando este atinge determinada quantidade, deve limpar-se o sistema e recomeçar um novo ciclo de monitorização. Apesar de se pretender que a platina (sensor) seja limpa *in situ* com as bolhas, parece que o método também é capaz de fazer uma “auto-limpeza” do vidro por arrastamento das bolhas.

Talvez fosse interessante aprofundar o conhecimento sobre a natureza das forças que se estabelecem entre a platina e as células bacterianas, no entanto, é um assunto muito

complexo, ficando, contudo, a sugestão para um novo trabalho. Com este trabalho pretendia-se desenvolver um sensor capaz de ser aplicado em sistemas reais, em que os biofilmes formados não são puros, mas constituídos por um consórcio de microrganismos, pelo que se sugere também a investigação utilizando não uma espécie pura, mas antes uma cultura mista. Por essa razão, o estudo das forças que estão na base da adesão da *Pseudomonas fluorescens* à platina não é relevante. Assim, o mais importante foi averiguar se este método era eficaz na detecção de depósitos formados e se era possível limpar o sensor *in situ*, deixando-o pronto para nova monitorização, objectivo esse obtido com sucesso.

Alcançado o objectivo, fica a sugestão de se investigar esta técnica utilizando uma célula de fluxo, pois esta aproxima-se mais da realidade e de forma a optimizar o sistema. Propõe-se, ainda, o estudo com água da torneira, pois o desenvolvimento de microrganismos em água potável é também um problema concreto.

## **Capítulo V**

---

### **Bibliografia**

Neste capítulo apresentam-se as referências bibliográficas dos artigos e livros consultados para a escrita desta dissertação. No final são também apresentados os sites da Internet consultados.

- Allen, F D Jr (2001) Quantitative microscopy: an up-close view. Bioengineering Conference BDE - ASME, vol **50**.
- Amaral, S T, Müller, I L (1999) Electrochemical behaviour of iron in NaOH 0.01 mol/L solutions containing variable amounts of silicate. *Journal of Brazilian Chemistry Society* **10** (3): 214-221.
- Angell, P, Arrange, Mittelman, M W, White, D C (1993) On line non-destructive biomass determination of bacterial biofilms by fluorimetry. *Journal of Microbiological Methods* **18**: 317-327.
- Angell, P, Lou, J-S, White D C (1994) High resolution microbial pitting corrosion studies utilizing a two dimensional scanning vibrating electrode microscope (SVEM) system. In: Naguy, T (eds) Triservice Conference on Corrosion, pp 169-181, Army Materials Laboratory, Washington, DC.
- Atkins, P W, Beran J A (1992) General Chemistry. Scientific American Books, New York.
- Azevedo, N F, Vieira, M J, Keevil, C W (2003) Establishment of a continuous model system to study *Helicobacter pylori* survival in potable water biofilms. *Water Science and Technology* **47** (5): 155-160.
- Baumgåard, H, Lübbers, D W (1983) Microcoaxial needle sensor for polarographic measurement of local O<sub>2</sub> pressure in the cellular range of living tissue. Its construction and properties. In: Gnaiger, E and Forstner H (eds) *Polarographic Oxygen Sensors*, pp 37-65, Springer-Verlag, Berlin.
- Beech, I, Hanjagsit, L, Kalaji, M, Neal, A L, Zinkevich, V (1999) chemical and structural characterization of exopolymers produced by *Pseudomonas* sp NCIMB 2021 in continuous culture. *Microbiology* **145**: 1491-1497.
- de Beer, D, Kühl, M (2001) Interfacial microbial mats and biofilms. In: Boudreau, B P, Jorgensen, B B (eds) *The Benthic Boundary Layer*, pp: 374-394, Oxford University Press, New York.

- de Beer, D, Schramm, A, Santegoeds, C M, Kühl, M (1997) A nitrite microsensor for profiling environmental biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* **63** (3): 973-977.
- de Beer, D, Sweerts, J-P R A (1989) Measurement of nitrate gradients with an ion-selective microelectrode. *Analytical Chimical Acta*, **219**: 351-356.
- Blenkinsopp, S A, Khoury, A E, Costerton, J W (1992) Electrical enhancement of biocide efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, **58** (11): 3770-3773.
- Boulos, L, Prévost, M, Barbeau, B, Coallier, J, Desjardins, R (1999) LIVE/DEAD® BacLight™: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *Journal of Microbiological Methods* **37**: 77-86.
- Brady, J E (1990) General Chemistry: principles and structure. John Wiley, New York.
- Brett, A M O, Brett, C M A (1993) Electroquímica: princípios, métodos e aplicações. Almedina, Coimbra.
- Brujjs, M C M, Venhuis, L P, Jenner, H A, Licina, G J, Daniels, D (2001) Biocide optimization using an on-line biofilm monitor. *PowerPlant Chemistry* **3** (7): 400-405.
- Bryers, J D (2000) Biofilm formation and persistence. In: Bryers, J D (eds) *Biofilms II – Process Analysis and Applications*, pp. 45-88. John Wiley & Sons, New York.
- Cady, W G (1964) Piezoelectricity. Volume 1, Dover Publications, New York.
- Chang, R (1991) Chemistry. McGraw-Hill, Boston.
- Characklis, W G & Wilderer, P A (1989) Structure and function of biofilms. In: Characklis, W G & Wilderer, P A (eds) *Structure and Function of Biofilms*, pp. 5-17. John Wiley & Sons, Chichester.
- Chen, X, Stewart, P S (2000) Biofilm removal caused by chemical treatments. *Water Research* **34** (17): 4229-4233.

- Cordes, R E P, Rechnitz, G A (1999) Sensitization and inhibition of naphthoquinone cyclic voltammetry by acridine orange and DNA. *Analytical Sciences* **15**: 1277-1279.
- Cronenberg, C, van Groen, T, de Beer, D, van den Heuvel, H (1991) Oxygen-independent glucose microsensor based on glucose oxidase. *Analytical Chimical Acta*, **242**: 275-278.
- Dhar, H P, Howell, D W, Bockris, J O'M (1982) The use of in situ electrochemical reduction of oxygen in the diminution of adsorbed bacteria on metals in seawater. *Journal of Electrochemistry Society: Electrochemical Science and Technology* **129** (10): 2178-2182.
- Evans, D H, O'Connell, M, Petersen, R A, Kelly, M J (1983) Cyclic voltammetry. *Journal of Chemical Education* **60** (4): 290-293.
- Fisher, A C (1996) *Electrode dynamics*. Oxford University Press, Oxford.
- Flemming, H-C (1996) Economical and technical overview. In: Heitz, E, Flemming, H-C & Sand, W (eds) *Microbially influenced corrosion of materials: scientific and engineering aspects*, pp. 6-14. Springer, Berlin.
- Flemming, H-C, Schaule, G (1996) Biofouling. In: Heitz, E, Flemming, H-C & Sand, W (eds) *Microbially influenced corrosion of materials: scientific and engineering aspects*, pp. 39-54. Springer, Berlin.
- Flemming, H-C (2003) Role and levels of real time monitoring for succesful anti-fouling strategies – an overview. *Water Science and Technology* **47** (5): 1-8.
- Fletcher, M (1984) Comparative physiology of attached and free-living bacteria. In: Marshall, K C (eds) *Microbial Adhesion and Aggregation*, pp. 223-232. Springer – Verlag, Berlin.
- Fonseca, A C, Greenberg, A R, Hernandez, M (2002) Real time biofilm detection using ultrasonic frequency-domain reflectometry (UFDR). In: Proceedings of *International Specialised Conference on Biofilm Monitoring*, pp: 11-14, Porto.

- Freter, R, Gingell, D, Jones, G W, Mutter, P R, Dazzo, F B (1984) Mechanisms of adhesion. In: Marshall, K C (eds) *Microbial Adhesion and Aggregation*, pp. 5-19. Springer – Verlag, Berlin.
- Gantzer, C J, Cunningham, A B, Gujer, W, Gutekunst, B, Heijnen, J J, Lightfoot, EN, Odham, G, Rittmann, B E, Rosenberg, E, Stolzenbach, K D, Zehnder, A J B (1989) Exchange processes at the fluid biofilm interface. In: Characklis, W G & Wilderer, P A (eds) *Structure and Function of Biofilms*, pp. 73-89. John Wiley & Sons, Chichester.
- Garrett, W E, Licina, G J (1995) Eighth EPRI Service Water System Reliability Improvement Seminar, Electric Power Research Institute, Palo Alto, CA.
- Gerhardt, P, Murray, R G E, Costilow, R N, Nester, E W, Wood, W A, Krieg, N R, Phillips, G B (1981) Manual of methods for general bacteriology. American Society for Microbiology, Washington.
- Gómez-Suárez, C, Busscher, H J, van der Mei, H C (2001a) Analysis of bacterial detachment from substratum surfaces by the passage of air-liquid interfaces. *Applied and Environmental Microbiology* **67** (6): 2531-2537.
- Gómez-Suárez, C, van der Mei, H C, Busscher, H J (2001b) Air bubble-induced detachment of polystyrene particles with different sizes from collector surfaces in a parallel plate flow chamber. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **186**: 211-219.
- Greef, R, Peat, R, Peter, L M, Pletcher, D, Robinson, J (1993) Instrumental methods in electrochemistry. Ellis Horwood, New York.
- Günzel, D, Schlue, W-R (1997) Intracellular  $Mg^{2+}$  is regulated by 1  $Na^+$  / 1  $Mg^{2+}$  antiport in neurones of an invertebrate central nervous system. *Electrochimica Acta* **42** (20-22): 3207-3215.

- Hartmann, J, Teichmann, L, Horn, H, Borngräber, Lucklum, R, Hauptmann, P (2002) Quartz crystal microbalance for online-early-diagnosis of growing biofilms. In: Proceedings of *International Specialised Conference on Biofilm Monitoring*, pp:73-76, Porto.
- Hayes, W, White, C H, Drake, M A (2002) Sensory aroma characteristics of milk spoilage by *Pseudomonas* species. *Journal of Food Science* **67** (2): 861-867.
- Heinze, J (1984) Cyclic voltammetry – “Electrochemical Spectroscopy”. *Angewandte Chemie International Edition in English* **23** (11): 831-918.
- Holthoff, K. Witte, O W ( 1997) Recording of neuronal network properties with near-infrared dark-field microscopy and microelectrodes. *Electrochimica Acta* **42** (20-22): 3241-3246.
- Horn, H (1994) Dynamics of a nitrifying bacteria population in a biofilm controlled by an oxygen microelectrode. *Water Science and Technology* **29** (10-11): 69-76.
- Illsley, R A, Roscoe, S G, Jackson, E D, Hughes, T J (1997) An electrochemical investigation of the fouling of a model surface by a coliform bacterium. *Biofouling* **11** (3): 191-199.
- Keevil, C W (2003) Rapid detection of biofilms and adherent pathogens using scanning confocal laser microscopy and episcopic differential interference contrast microscopy. *Water Science and Technology* **47** (5): 105-116.
- Kepner, R L Jr, Pratt, J R (1994) Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. *Microbiological Reviews* **58**: 603-615.
- Lewandowski, Z, Altobelli, S A, Fukushima, E (1993) NMR and microelectrode studies of hydrodynamics and kinetics in biofilms.
- Licina, G J, Nekoksa, G (1993) Microbiologically influenced corrosion testing. Kearns, J R, Little, B J (eds) *American Society for Testing Matherials, ASTM STP-1232*, 118.

- Lin-Vien, D, Colthup, N B, Fateley, W G, Grasselli, J G (1991) The handbook of infrared and raman characteristic frequencies of organic molecules. Academic Press, New York.
- Lohrengel, M M (1997) Interface and volume effects in biological cells and electrochemical microcells. *Electrochimica Acta* **42** (20-22): 3265-3271.
- MacCraith, B D (1993) Enhanced evanescent wave sensors based on sol-gel derived porous glass coatings. *Sensors Actuators B.*, **11**: 29-34.
- Madigan, M T, Martinko, J M, Parker, J (1997) Biology of microorganisms – 8th edition. Prentice-Hall International, Upper Sadle River.
- Malgor, R, Heijo, G, Romero, L, Zinola, C F (1998) Electrochemical behaviour of iron and copper in a culture solution for *Spirulina platensis*. *Journal of Applied Electrochemistry* **28**: 1351-1357.
- Marx, K A, Zhou, T, Montrone, A, Schulze, H, Braunhut, S J (2001) A quartz crystal microbalance cell biosensor: detection of microtubule alterations in living cells at nM nocodazole concentrations. *Biosensors & Bioelectronics* **16**: 773-782.
- Maukonen, J, Mattila-Sandholm, T, Wirtanen, G (2000) Metabolic indicators for assessing bacterial viability in hygiene sampling using cells in suspension and swabbed biofilm. *Lebensm.-wiss. u.-Technol.* **33**: 225-233.
- Mautner, M (2002) Are young solar nebulae nurseries for microorganisms? *The Electronic Astrobiology Newsletters* **9** (29): 2-3.
- McFeters, G A, Bazin, M J, Bryers, J D, Calwell, D E (1984) Biofilm development and its consequences. In: Marshall, K C (eds) *Microbial Adhesion and Aggregation*, pp. 109-204. Springer – Verlag, Berlin.
- Naumann, D (2000) Infrared Spectroscopy in Microbiology. In: Meyers, R A (eds) *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, pp: 102-131, John Wiley & Sons, Chichester.

- Naumann, D, Heim, D, Labischinski, H, Giesbrecht, P (1991) The characterization of microorganisms by Fourier transform infrared spectroscopy. In: Nelson, W (eds) *Modern Techniques for Rapid Microbiological Analysis*, pp 43-96. VCH publishers, New York.
- Nester, E W, Roberts, C E, Pearsall, N N, Anderson, D G, Nester, M T (1998) *Microbiology: a human perspective*. WCB, Boston.
- Nivens, D E, Palmer Jr, R J, White, D C (1995) Continuous nondestructive monitoring of microbial biofilms: a review of analytical techniques. *Journal of Industrial Microbiology* **15**: 263-276.
- Nolan, M A, Kournaves, S A (2000) The source of the anomalous cathodic peak during ASV with in situ mercury film formation in chloride solutions. *Electroanalysis* **12** (2): 96-99.
- Okochi, M, Matsunaga, T (1997) Electrochemical sterilization of bacteria using a graphite electrode modified with adsorbed ferrocene. *Electrochimica Acta* **42** (20-22): 3247-3250.
- Okochi, M, Nakamura, N, Matsunaga, T (1999) Electrochemical killing of microorganisms using the oxidized form of ferrocenemonocarboxylic acid. *Electrochimica Acta* **44**: 3795-3799.
- Oliveira, D R (1992) Physico-chemical aspects of adhesion. In: L F Melo et al. (eds) *Biofilms – Science and Technology*, pp 45-58. Academic Publishers, Netherlands.
- O’Toole, G, Kaplan, H B, Kolter, R (2000) Biofilm formation as microbial development. *Annual Review Microbiology* **54**: 49-79.
- Overman, P R (2000) Biofilm: a new view of plaque. *The Journal of a Contemporary Dental Practice* **1** (3): 1-8.

- Packroff, G, Lawrence, J R, Neu, T R (2002) In situ confocal laser scanning microscopy of protozoans in cultures and complex biofilm communities. *Acta Protozoologica* **41**: 245-253.
- Pereira, M O, Morin, P, Vieira, MJ, Melo, L F (2002) A versatile reactor for continuous monitoring of biofilm properties in laboratory and industrial conditions. *Letters in Applied Microbiology*, **34** (1): 22-26.
- Pereira, M O, Vieira, M J (2001) Effects of the interactions glutaraldehyde-polymeric matrix on the efficacy of the biocide on *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *Biofouling*, **12**: 93-101.
- Philip-Chandy, R, Scully, P J, Eldridge, P, Kadim, H J, Grapin, M G, Jonca, M G, D'Ambrosio, M G, Colin, F (2000) An optical fiber sensor for biofilm measurement using intensity modulation and image analysis. *IEEE Journal on Selected Topics in Quantum Electronics* **6** (5): 764-772.
- Pletcher, D (1991) A first course in electrode processes. Alresford Press, Lda, Great-britain.
- Poitry, S, Poirtry-Yamate, C, Innocent, C, Cosnier, S, Tsacopoulos, M (1997) Detection of glutamate released by neurons with an enzyme-based microelectrode: applications and limitations. *Electrochimica Acta* **42** (20-22): 3217-3223.
- Prescott, L M, Harley, J P, Klein, D A (1999) Microbiology – 4th edition. WCB McGraw-Hill, Boston.
- Psotová, J, Zahálková, J, Hrbác, Simánek, V, Bartek, J (2001) Determination of total antioxidant capacity in plasma by cyclic voltammetry. Two case reports. *Biomedical Papers* **145** (2): 81-83.
- Quirynen, M. and Bollen, C. M. L. (1995) The influence of surface roughness and surface-free energy on supra and subgingival plaque formation in man. *Journal of clinical periodontology*, Denmark.

- Revsbech, N P (1989) An oxygen microsensor with a guard cathode. *Limnology Oceanography* **34**: 474-478.
- Revsbech, N P, Jorgensen, B B (1986) Microelectrodes: their use in microbial ecology. *Advanced Microbial Ecology* **9**: 293-352.
- Robb, I D (1984) Stereo – biochemistry and function of polymers. In: Marshall, K C (eds) *Microbial Adhesion and Aggregation*, pp. 39-49. Springer – Verlag, Berlin.
- Rosencwaig, A (1980) Photoacoustics and Photoacoustic Spectroscopy. Wiley, New York.
- Rowland, R E, Nickless, E M (2000) Confocal microscopy opens the door to 3-dimensional analysis of cells. *Bioscene* **26** (3): 3-7.
- Ruan, C, Yang L, Li, Y (2002) Rapid detection of viable Salmonella typhimurium in a selective medium by monitoring oxygen consumption with electrochemical cyclic voltammetry. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **519**: 33-38.
- Rudh, M, Green, H, Lie, E, Sjöström, L (2002) Measuring biofilm formation in real-time by Quartz Crystal Microbalance with Dissipation monitoring (QCM-D). . In: Proceedings of *International Specialised Conference on Biofilm Monitoring*, pp: 57-60, Porto.
- Saxena, I, Files, D, Rao, S, Costerton, W J (2002a) Autofluorescence based Bacteria detection using an optical fiber. In (Farkas, D L, Leif, R C (eds) *Optical Diagnostics of Living Cells V, Proceedings of SPIE* **4622**: 106-111.
- Saxena, I, Sturman, P J, Costerton, W J (2002b) Development and testing of a fiber-optic probe for biofilm detection and quantification. In: Proceedings of *International Specialised Conference on Biofilm Monitoring*, pp: 15-17, Porto.
- Sand, W (1996) Microbial mechanisms. In: Heitz, E, Flemming, H-C & Sand, W(eds) *Microbially influenced corrosion of materials: scientific and engineering aspects*, pp. 16-25. Springer, Berlin.

- Scheller, D, Tegtmeier, F, Schlue, W R (1997) Characterisation of drug-effects during “retinal spreading depressions” using Cl<sup>-</sup> sensitive microelectrodes. *Electrochimica Acta* **42** (20-22): 3225-3229.
- Schlue, W-R, Kilb, W, Günzel, D (1997) Ultramicroelectrodes for membrane research. *Electrochimica Acta* **42** (20-22): 3197-3205.
- Schmid, T, Panne, U, Haisch, C, Niessner, R (2003) Biofilm monitoring by photoacoustic spectroscopy. *Water Science and Technology* **47** (5): 25-29.
- Singleton, P, Sainsbury, D (2001) Dictionary of microbiology and molecular biology – 3rd edition. John Wiley, Chichester.
- Skoog, D A, Leary, J J (1992) Principles of instrumental analysis – 4<sup>th</sup> edition. Saunders College Publishing, Fort Worth.
- Stewart, P S, Wattanakaroon, W, Goodrum, L, Fortun, S M, McLeod, B R (1999) Electrolytic generation of oxygen partially explains electrical enhancement of Tobramycin efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43** (2): 292-296.
- Stoodley, P, Sauer, K, Davies, D G, Costerton, J W (2002) Biofilms as complex differentiated. *Annual Review Microbiology* **56**: 187-209.
- Subrahmanyam, S, Kodandapani, N, Shanmugam, K, Moovarkumuthalvan, K, Jeyakumar, D, Subramanian, T V (2001a) Cyclic voltammetry measurements of growth of *Aspergillus terreus*. *Analytical Sciences* **17**: 481-484.
- Subrahmanyam, S, Shanmugam, K, Madhav, V M, Murugesan, M, Subramanian, T V, Jeyakumar, D (2001b) Voltammetric studies of *Aspergillus niger*. Assessment of their growth using electroactive extracellular production of metabolite. *Electroanalysis* **13** (12): 1051-1053.
- Talaro, K, Talaro, A (1996) Foundations in microbiology. Wm. C. Brown Publishers, Dubuque.

- Tavares, M C, Machado, S A S, Mazo, L H (2001) Study of hydrogen evolution reaction in acid medium on Pt microelectrodes. *Electrochimica Acta* **46**: 4359-4369.
- Taylor, D L, Salmon, E D (1989) Basic fluorescence microscopy. In: Wang, Y-L & Taylor, D L (eds) *Fluorescence Microscopy of Living Cells in Culture, Part A, Methods in Cell Biology* **29**: 208-236, Academic Press Inc., San Diego.
- Tinham, P, Bott, T R (2003) Biofouling assessment using an infrared monitor. *Water Science and Technology* **47** (5): 39-43.
- VanHoudt, P, Lewandowski, Z, Little, B (1992) Iridium oxide pH microelectrode. *Biotechnology and Bioengineering* **40**: 601-608.
- Vieira M J, Melo L F, Pinheiro M M (1993) Biofilm formation: hydrodynamic effects on internal diffusion and structure. *Biofouling*, **7**: 67-80
- Vieira, M J, Pinho, I A, Gião, M S, Montenegro, M I (2003) The use of cyclic voltammetry to detect biofilms formed by *Pseudomonas fluorescens* on platinum electrodes. *Biofouling* **19** (4): 215-222.
- Woods, R (1976) Chemisorption at electrodes – Hydrogen and oxygen on noble metals and their alloys. In: Allen J. Bard (eds) *Electroanalytical Chemistry*, vol **9**. Marcel Dekker, Inc, New York-Basel.
- Wouters, P C, Dutreux, N, Smelt, J P P M, Lelieveld, H L M (1999) Effects of pulsed electric fields on inactivation kinetics of *Listeria innocua*. *Applied and Environmental Microbiology* **65** (12): 5364-5371.
- Xavier, J B, White, D C, Almeida, J S (2003) Automated biofilm morphology quantification from confocal laser scanning microscopy imaging. *Water Science and Technology* **47** (5): 31-37.
- Xu, K, Dexter, S C, Luther, G W (1998) Voltammetric microelectrodes for biocorrosion studies. *Corrosion* **54** (10): 814-823.

Yu, F P, McFeters, G A (1994) Rapid in situ assessment of physiological activities in bacterial biofilms using fluorescence probes. *Journal of Microbiological Methods* 20: 1-10.

#### Sites da Internet consultados

<http://asme.pinetec.com>

<http://geothermal.id.doe.gov>

<http://gnn.tigr.org>

<http://instruct1.cit.cornell.edu>

<http://www.agr.kuleuven.ac.be>

<http://www.aquadyntech.com>

<http://www.bath.ac.uk>

<http://www-biol.paisley.ac.uk>

<http://www.copple.ufrj.br>

<http://www.denniskunkel.com>

<http://www.electrode.org>

<http://wwwerc.montana.edu>

<http://www.health.gov.au>

<http://www.iee.or.jp>

<http://www.nd.edu>

<http://www.tulane.edu>

Anexo I

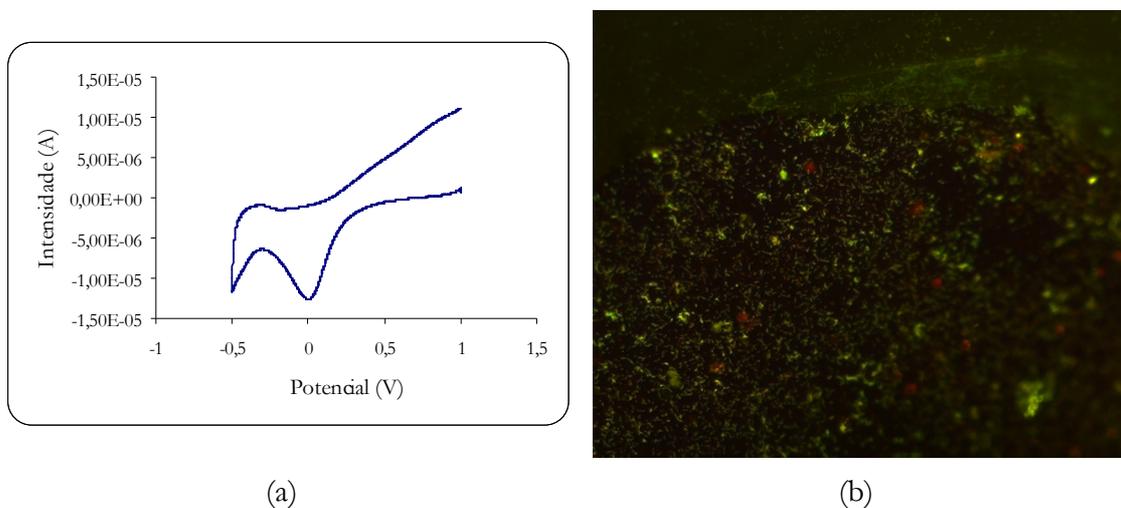
---

Fotografias e voltamogramas cíclicos

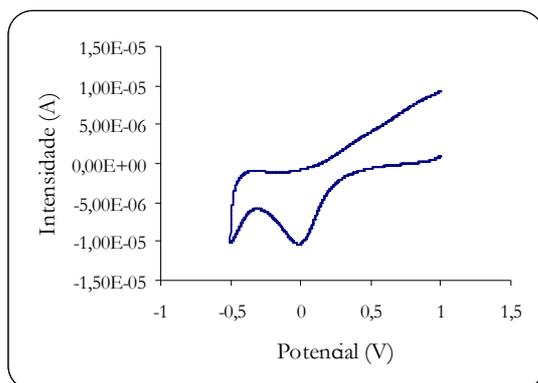
Neste anexo apresentam-se os voltamogramas cíclicos e uma fotografia representativa da superfície do eléctrodo para os vários ensaios efectuados, correspondente aos resultados apresentados em “III. 1. Monitorização de biofilmes pela técnica de voltametria cíclica”. Os voltamogramas e as fotografias apresentados encontram-se divididos em ensaios. Cada ensaio engloba a formação de biofilme durante os diferentes períodos de tempo, correspondendo cada ensaio a cada uma das repetições efectuadas.

## AI.1. Ensaio 1

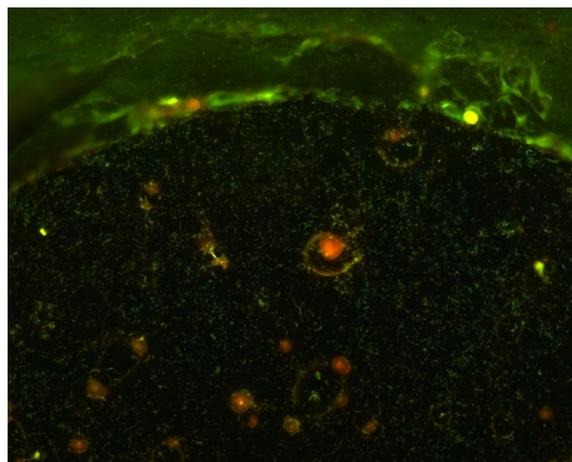
### ❖ Biofilme 2 horas



**Figura AI.1.** Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 1 a  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento(b).

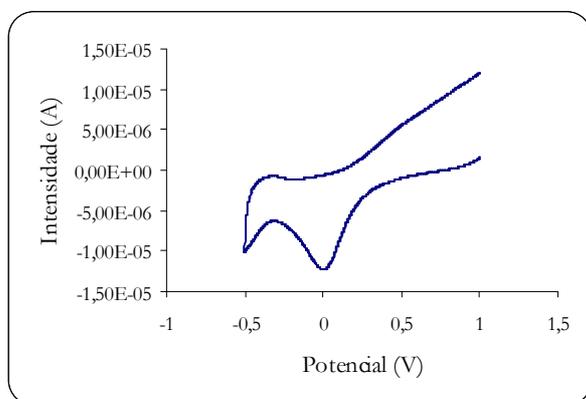


(a)

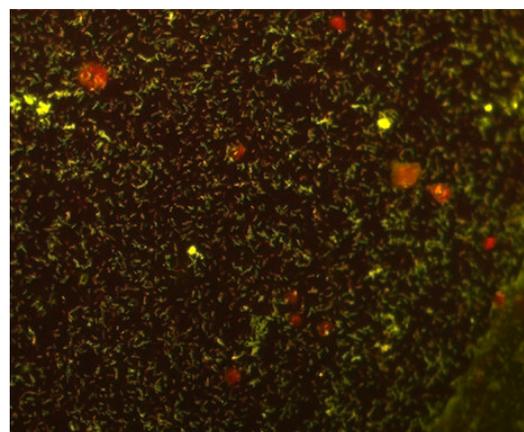


(b)

**Figura AI.2.** Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 2 a  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento(b).

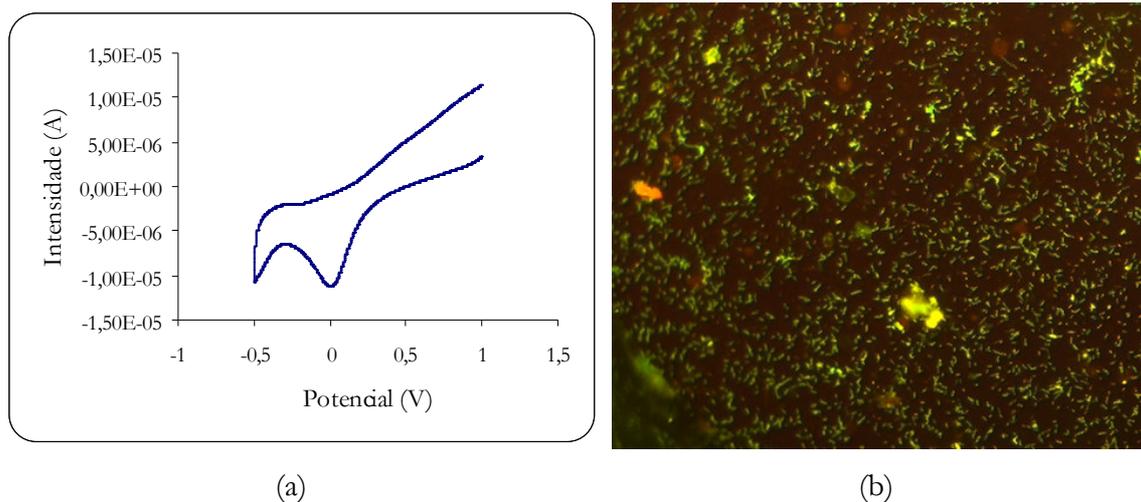


(a)



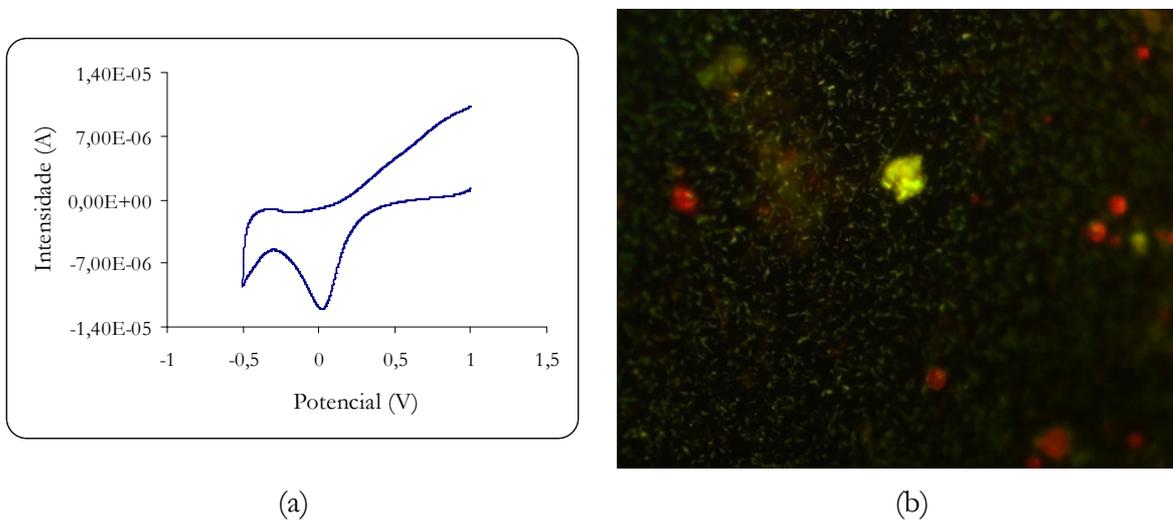
(b)

**Figura AI.3.** Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 3 a  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento(b).

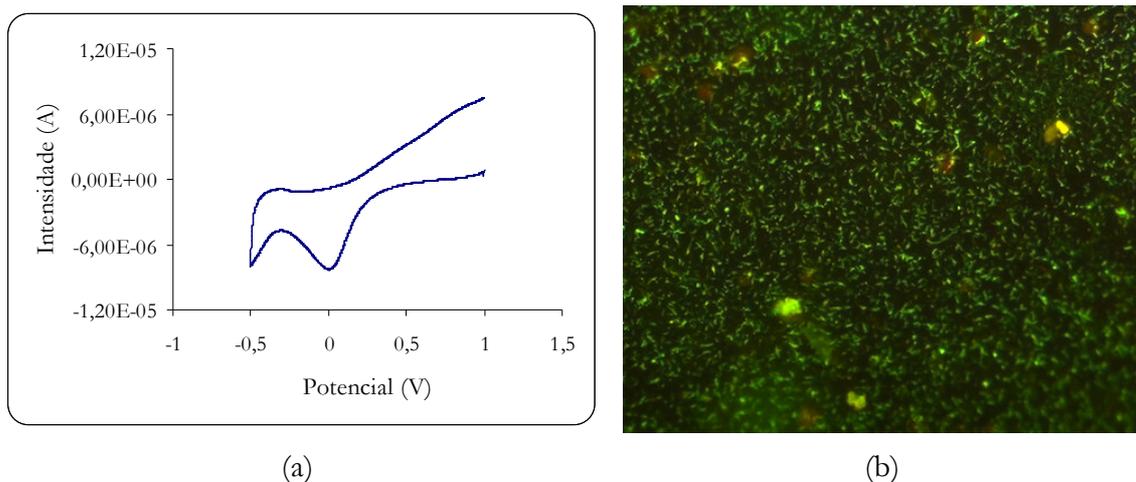


**Figura AI.4.** Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 4 a  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento(b).

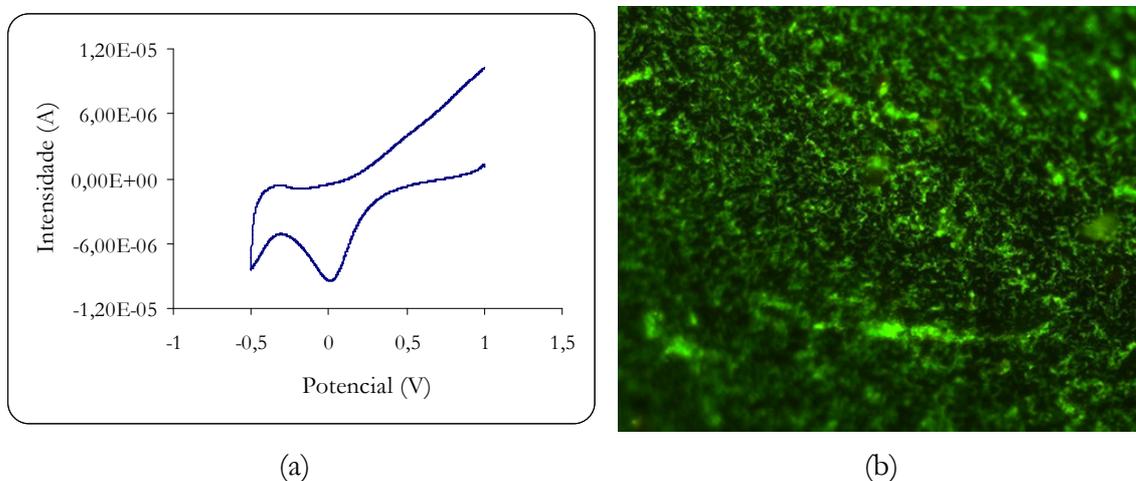
#### ❖ Biofilme 6 horas



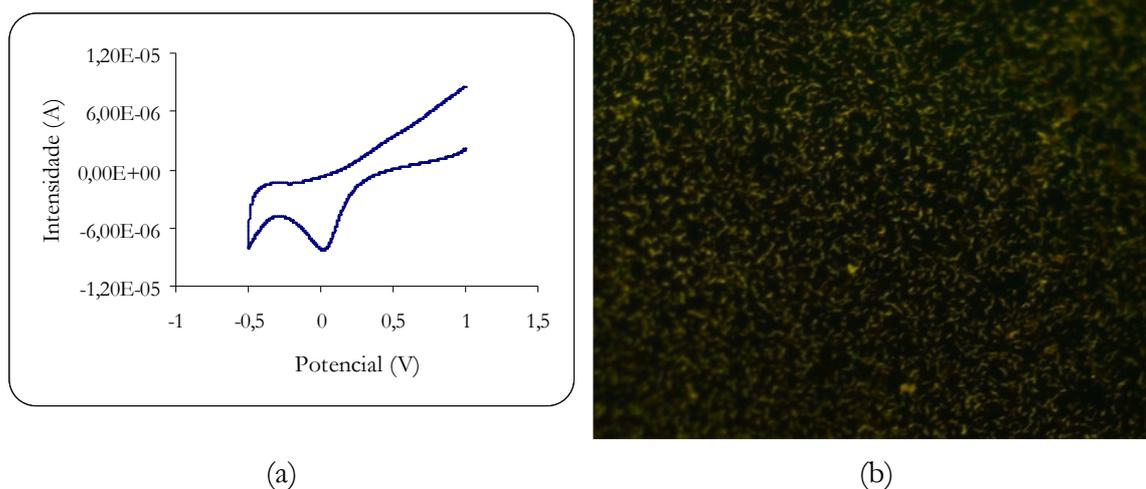
**Figura AI.5.** Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 1 a  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento(b).



**Figura AI.6.** Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 2 a  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento(b).

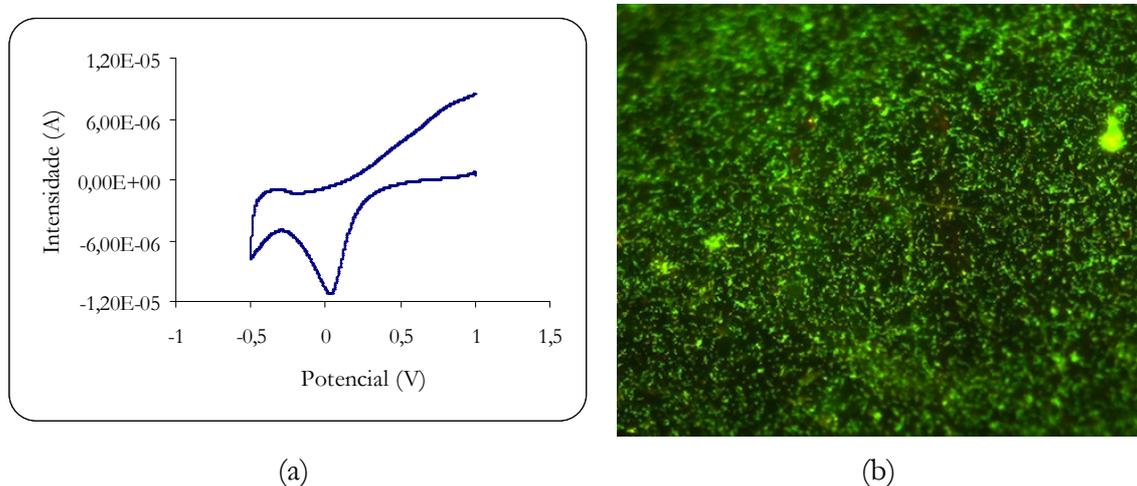


**Figura AI.7.** Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 3 a  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento(b).

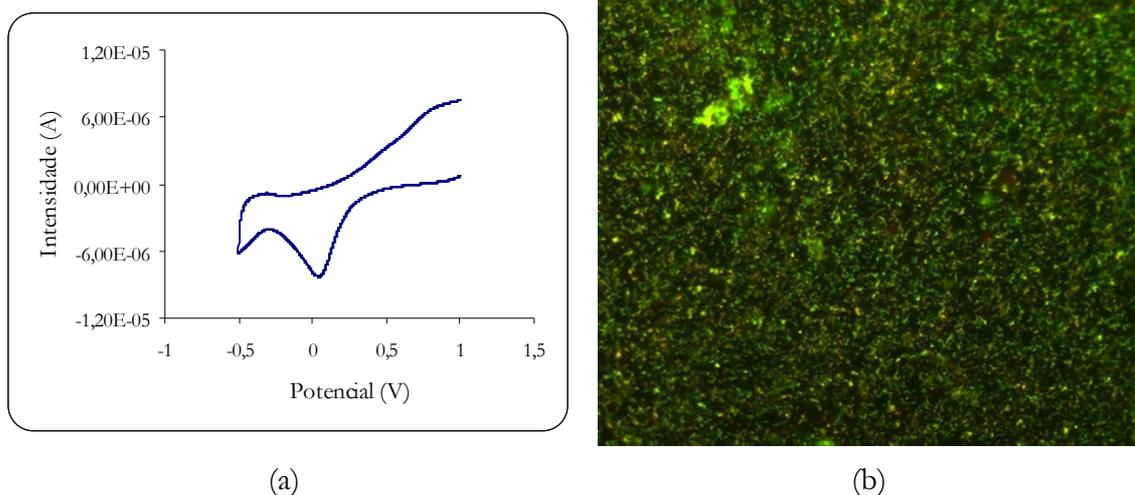


**Figura AI.8.** Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 4 a  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento(b).

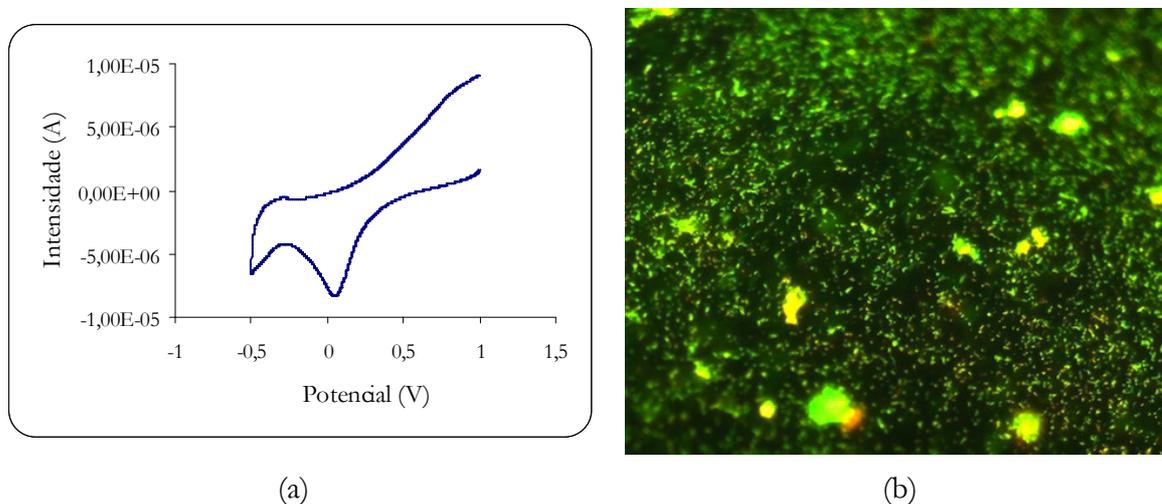
#### ❖ Biofilme 12 horas



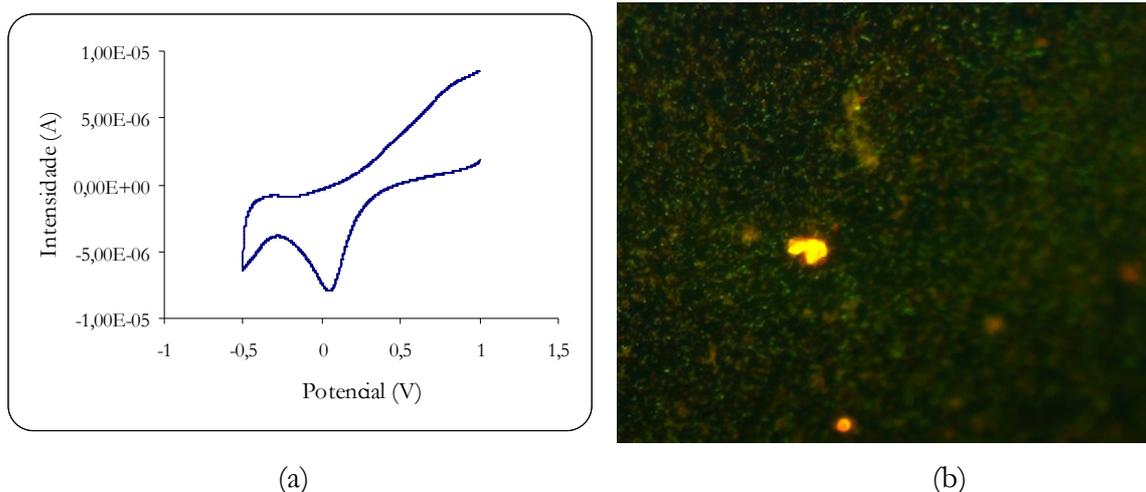
**Figura AI.9.** Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 1 a  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento(b).



**Figura AI.10.** Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 2 a  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento(b).

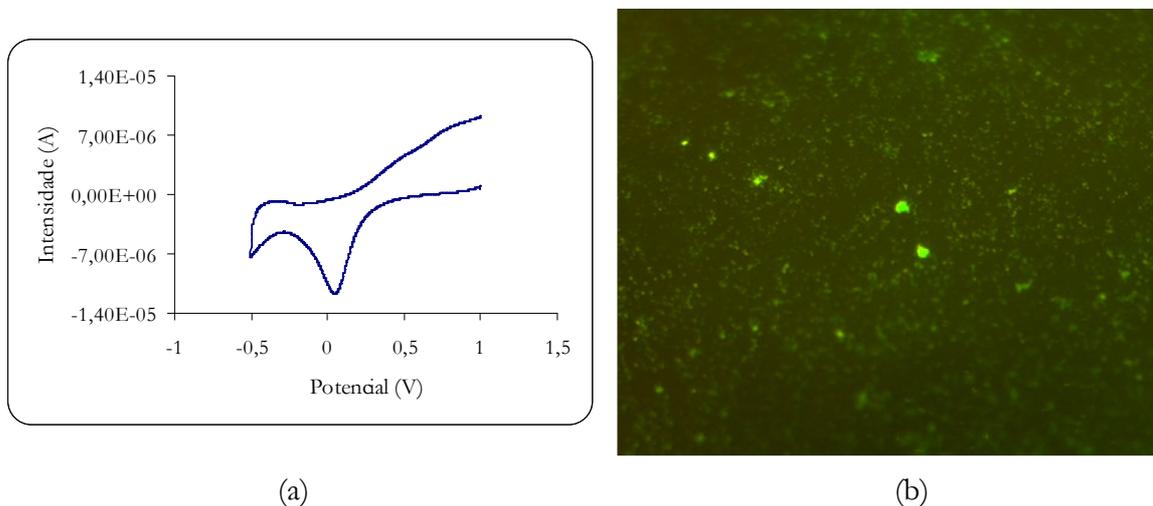


**Figura AI.11.** Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 3 a  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento(b).

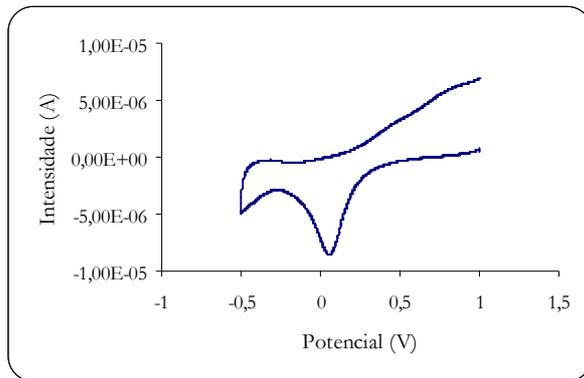


**Figura AI.12.** Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 4 a  $0,250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0,5 e 1,0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento(b).

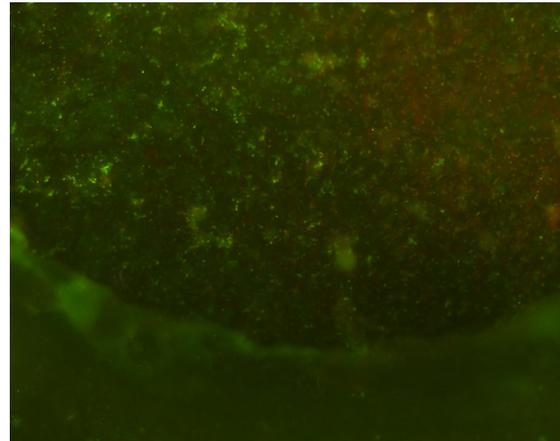
#### ❖ Biofilme 24 horas



**Figura AI.13.** Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 1 a  $0,250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0,5 e 1,0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento(b).

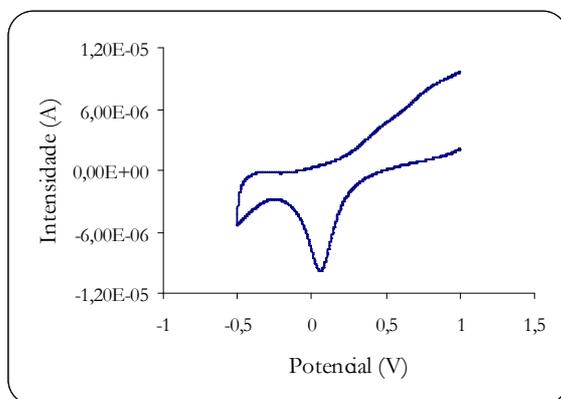


(a)

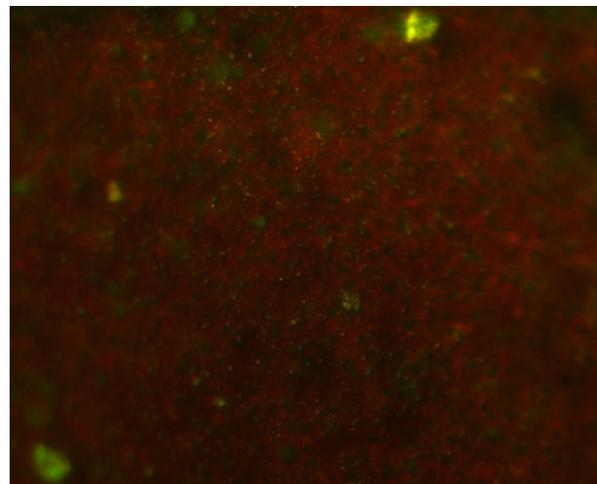


(b)

**Figura AI.14.** Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 2 a  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento(b).



(a)

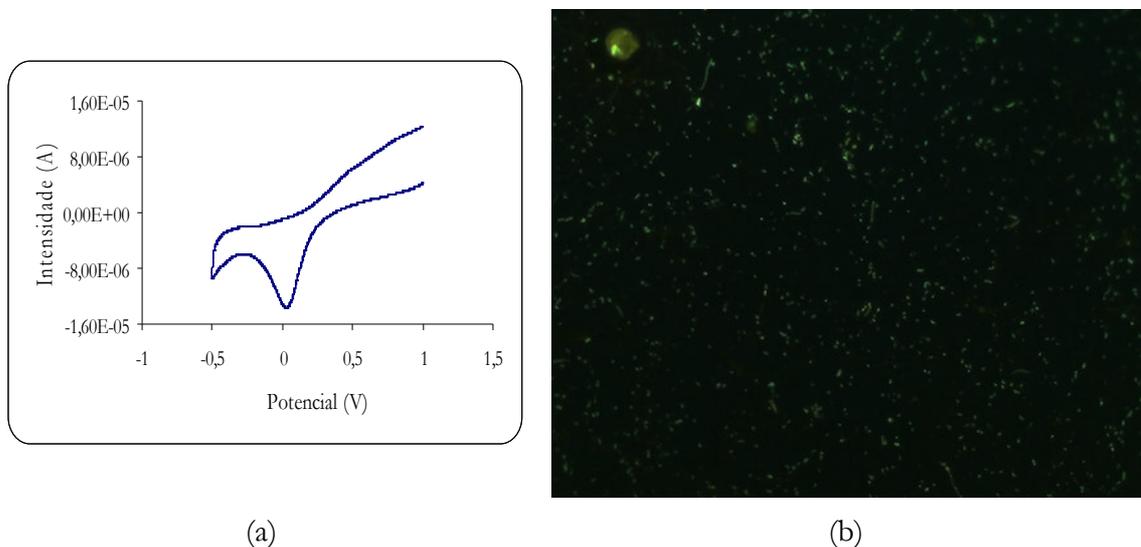


(b)

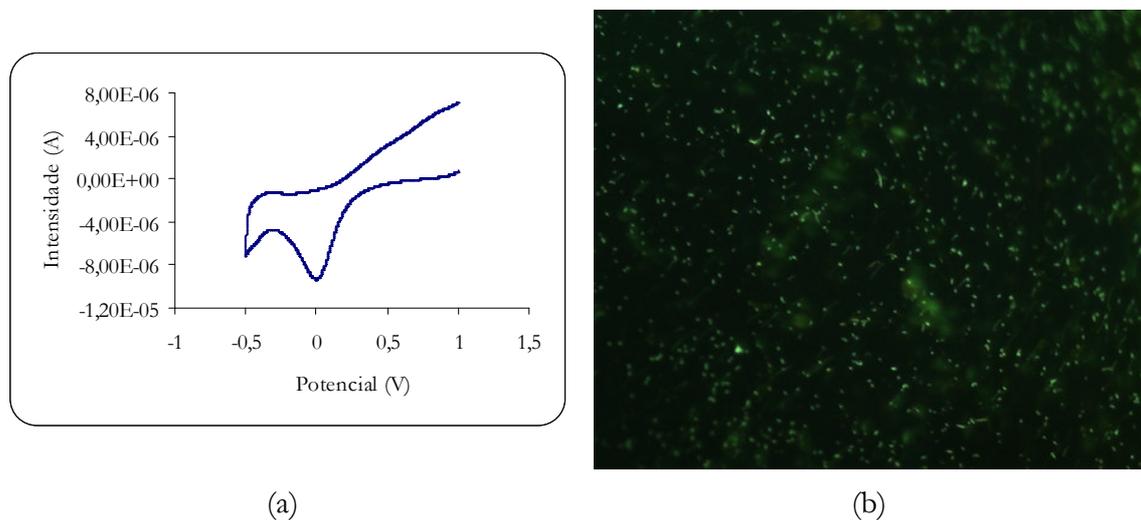
**Figura AI.15.** Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 4 a  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento(b).

## AI.2. Ensaio 2

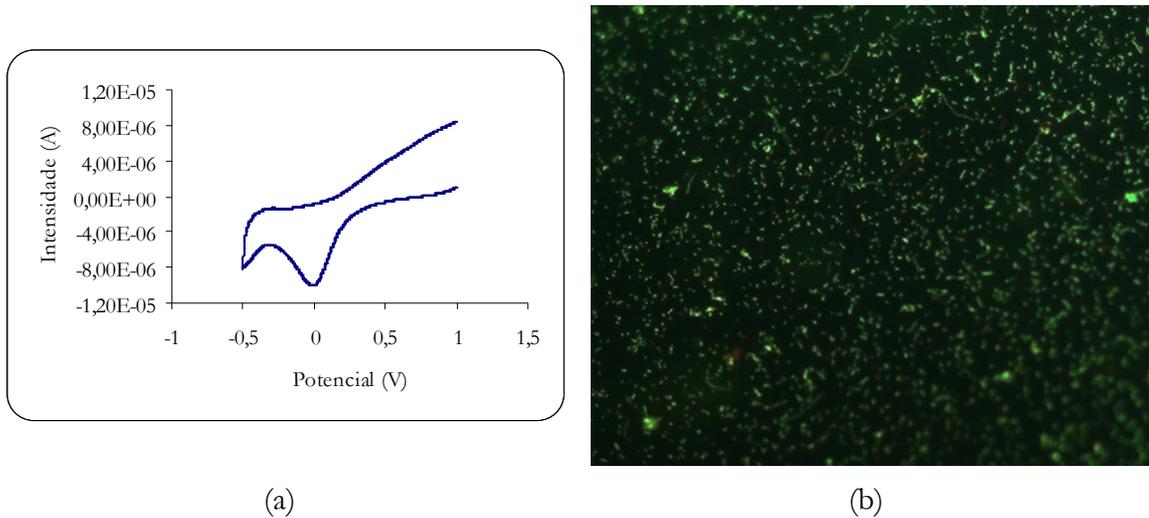
## ❖ Biofilme 2 horas



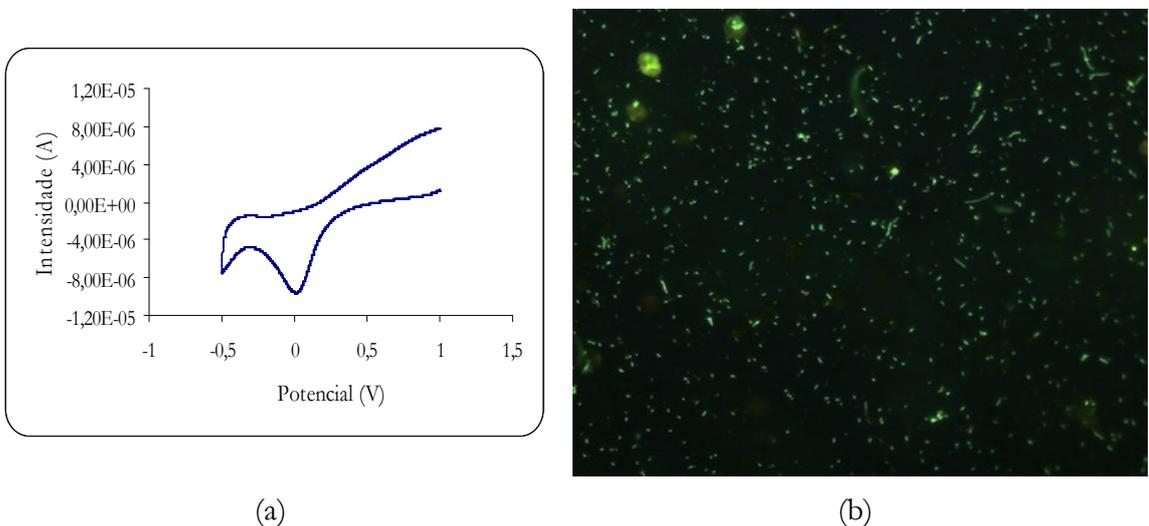
**Figura AI.16.** Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 1 a  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento(b).



**Figura AI.17.** Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 2 a  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento(b).

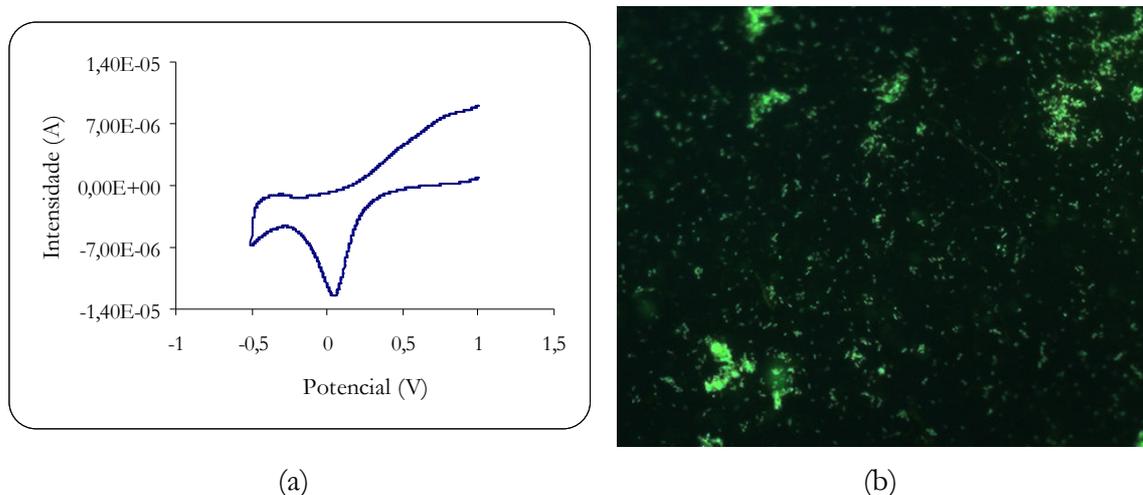


**Figura AI.18.** Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 3 a  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento(b).

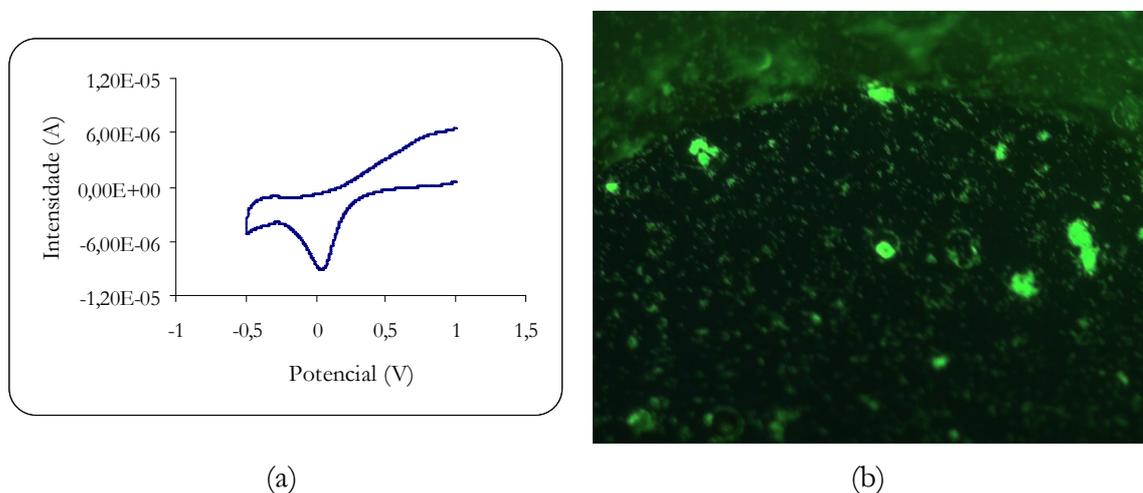


**Figura AI.19.** Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 4 a  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento(b).

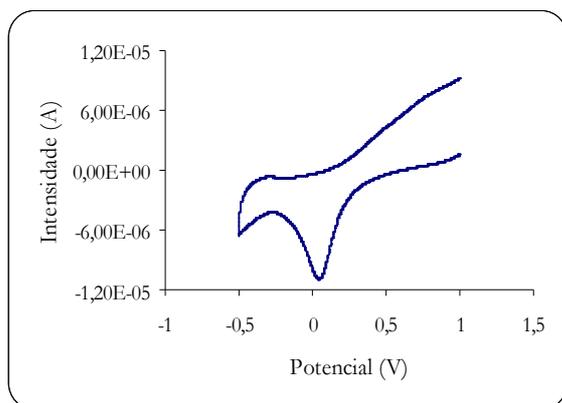
## ❖ Biofilme 6 horas



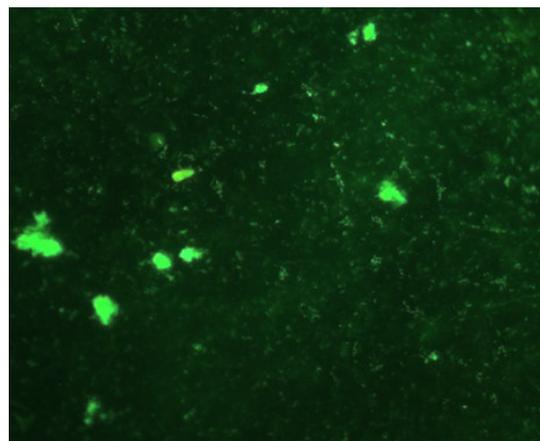
**Figura AI.20.** Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 1 a  $0,250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0,5 e 1,0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento(b).



**Figura AI.21.** Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 2 a  $0,250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0,5 e 1,0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento(b).

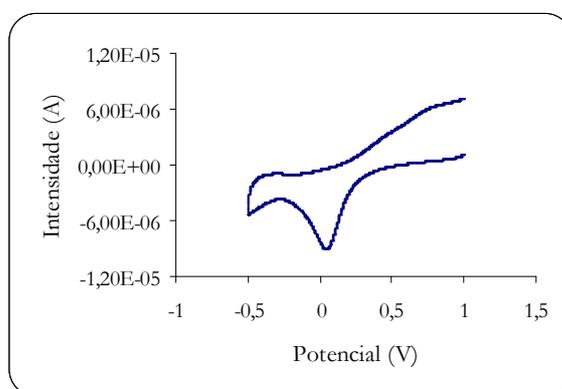


(a)

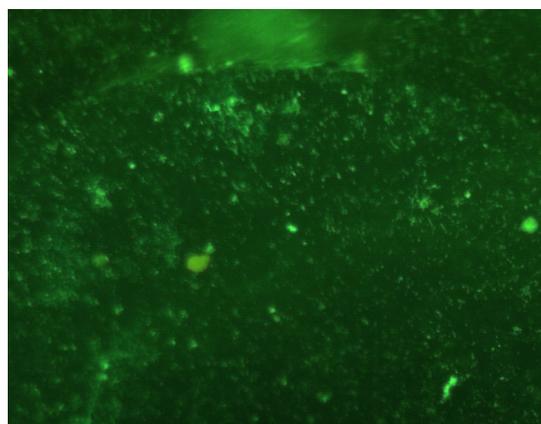


(b)

**Figura AI.22.** Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 3 a  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento(b).



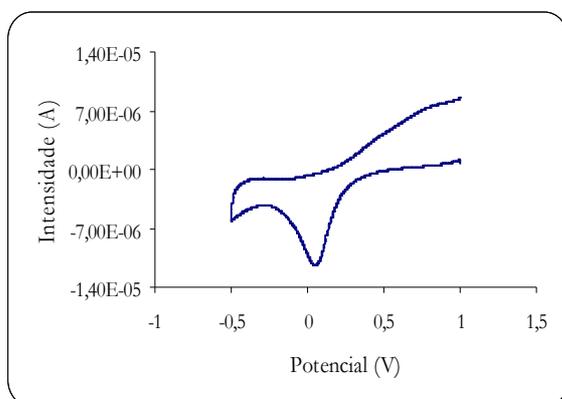
(a)



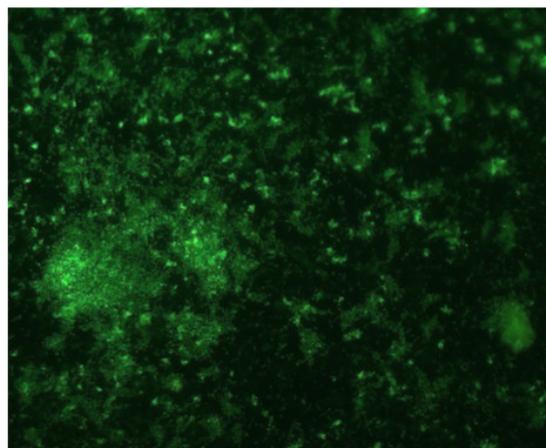
(b)

**Figura AI.23.** Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 4 a  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento(b).

## ❖ Biofilme 12 horas

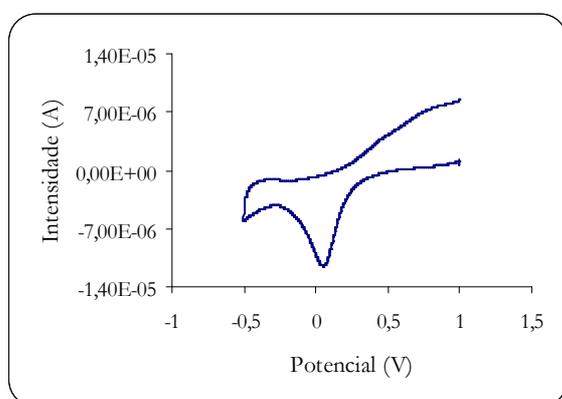


(a)

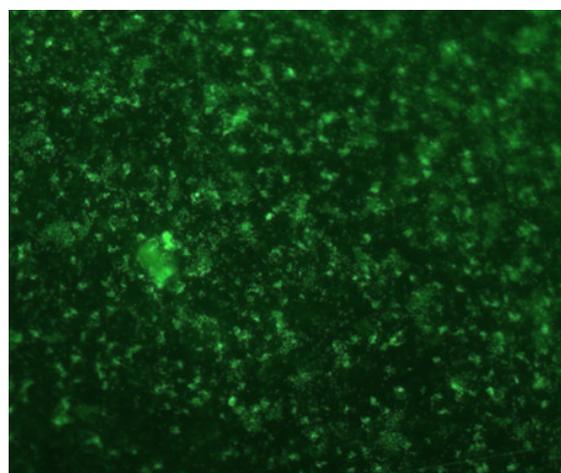


(b)

**Figura AI.24.** Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 1 a  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento(b).

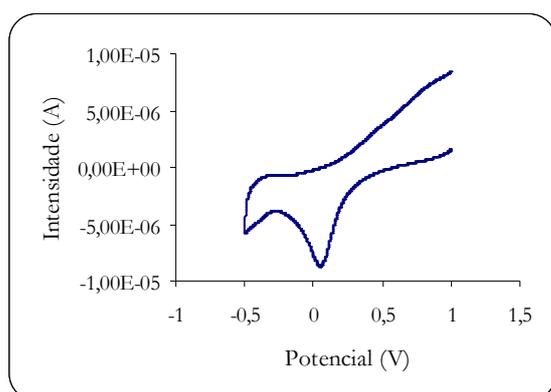


(a)

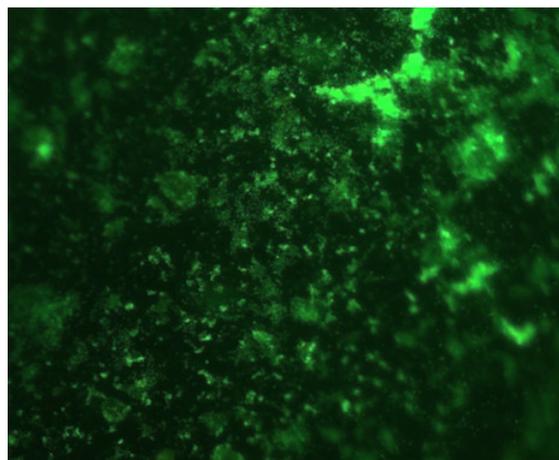


(b)

**Figura AI.25.** Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 2 a  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento(b).

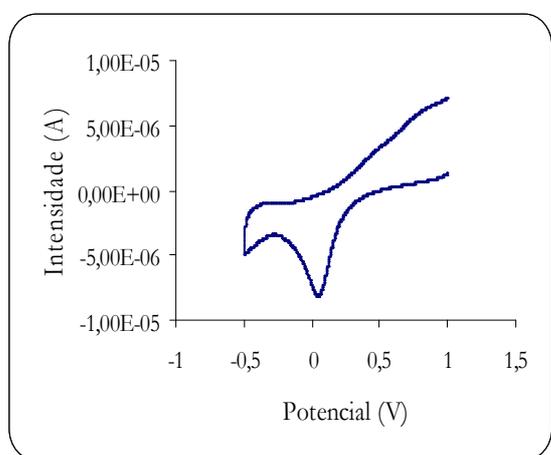


(a)

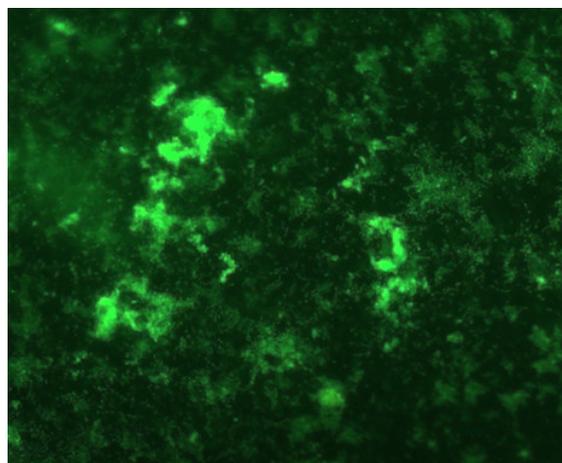


(b)

**Figura AI.26.** Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 3 a  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0,5 e 1,0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento(b).



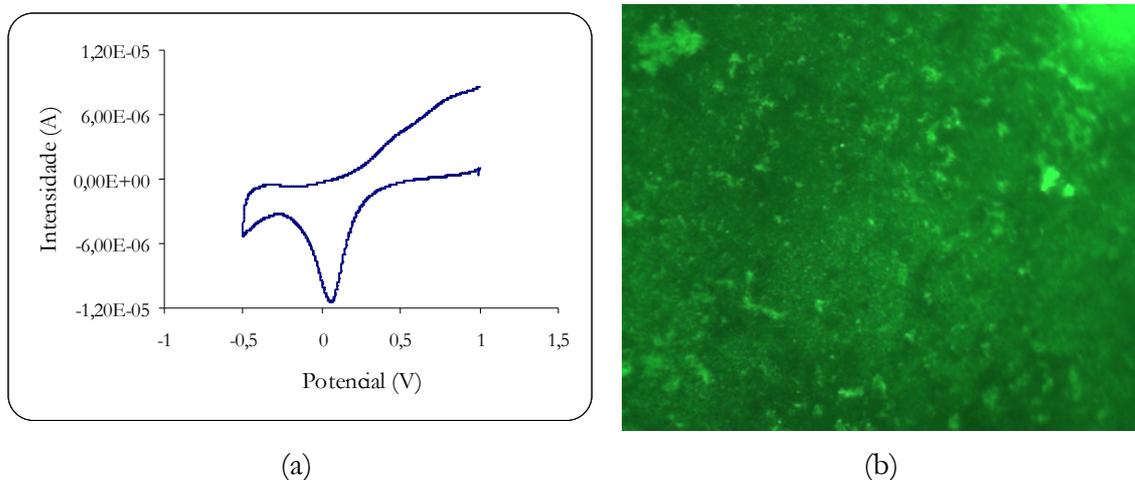
(a)



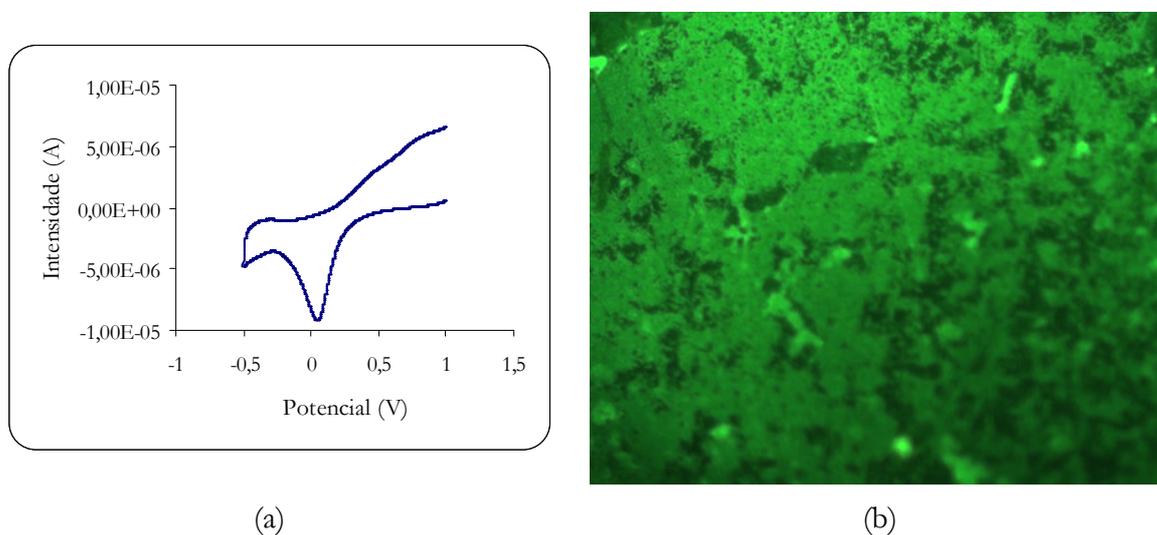
(b)

**Figura AI.27.** Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 4 a  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0,5 e 1,0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento(b).

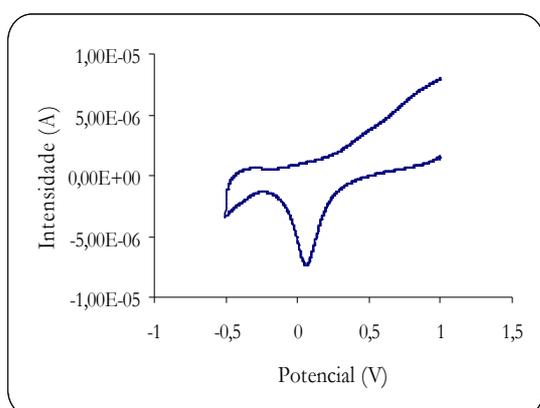
## ❖ Biofilme 24 horas



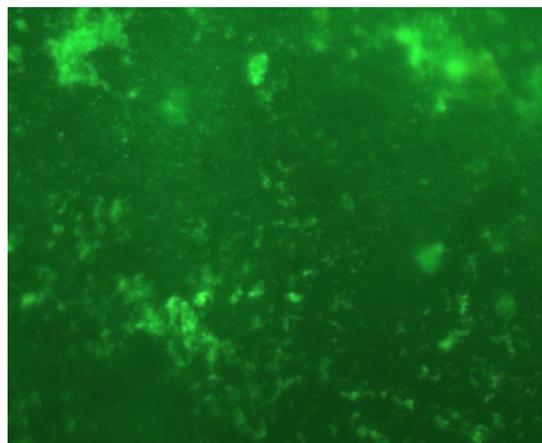
**Figura AI.28.** Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 1 a  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento(b).



**Figura AI.29.** Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 2 a  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento(b).

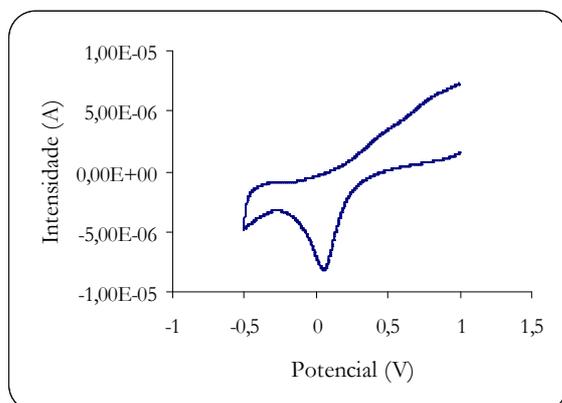


(a)

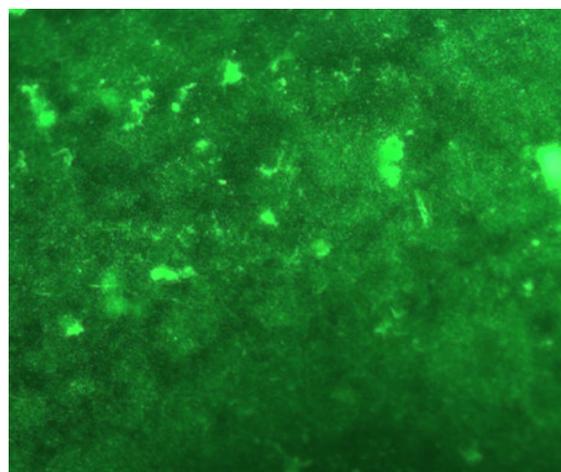


(b)

**Figura AI.30.** Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 3 a  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento(b).



(a)

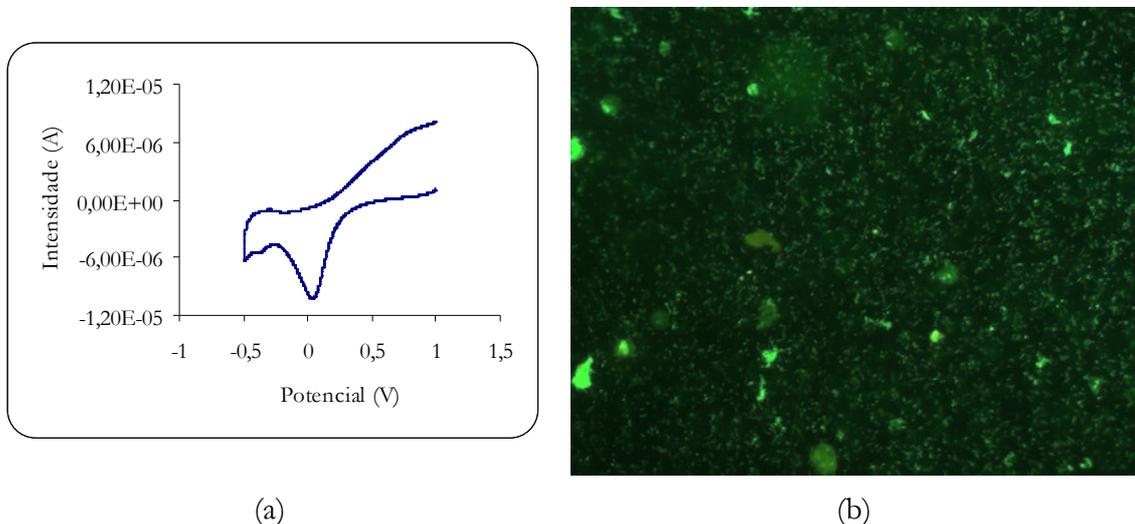


(b)

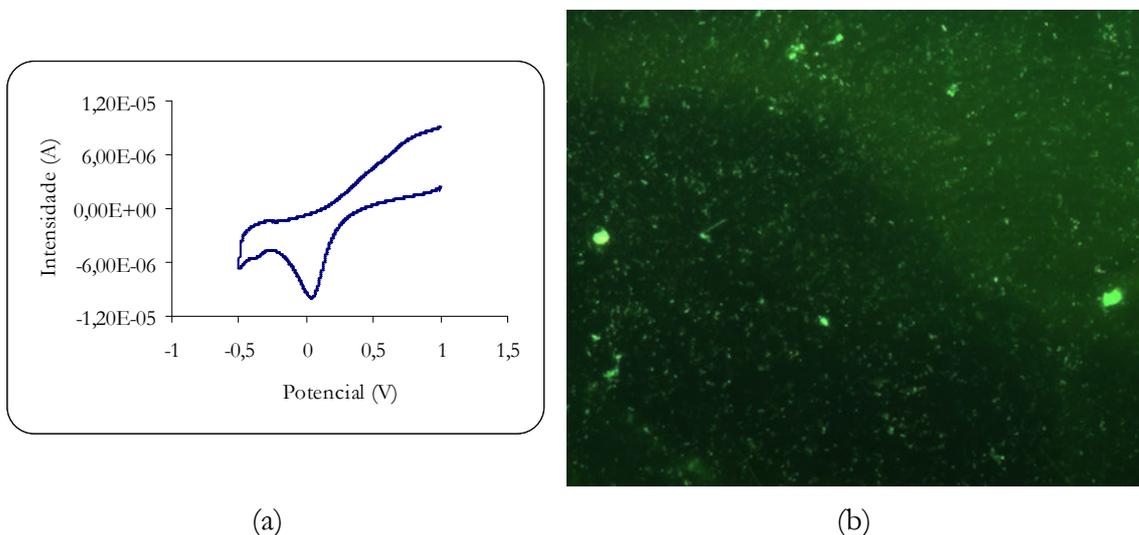
**Figura AI.31.** Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 4 a  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento(b).

### AI.3. Ensaio 3

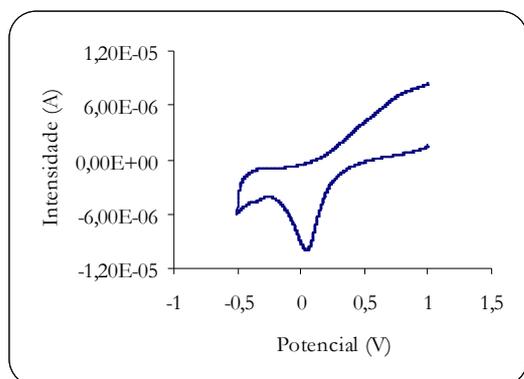
#### ❖ Biofilme 2 horas



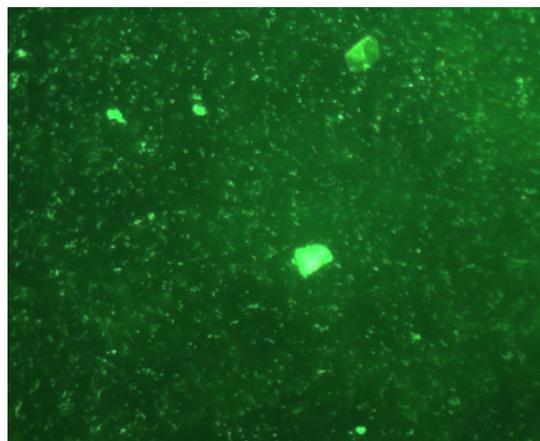
**Figura AI.32.** Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 1 a  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento(b).



**Figura AI.33.** Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 2 a  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento(b).

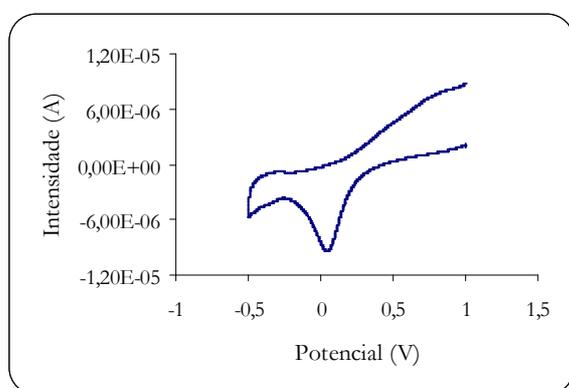


(a)

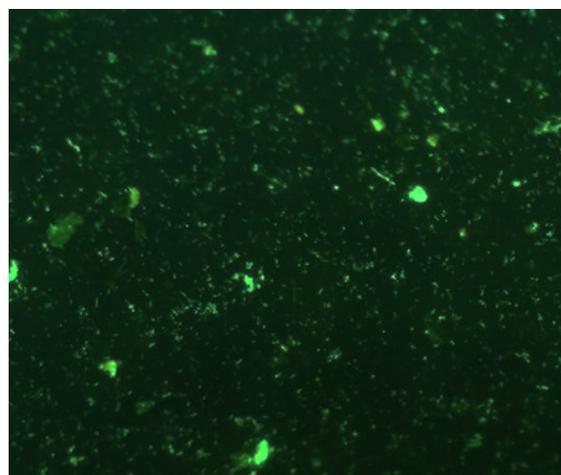


(b)

**Figura AI.34.** Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 3 a  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento(b).



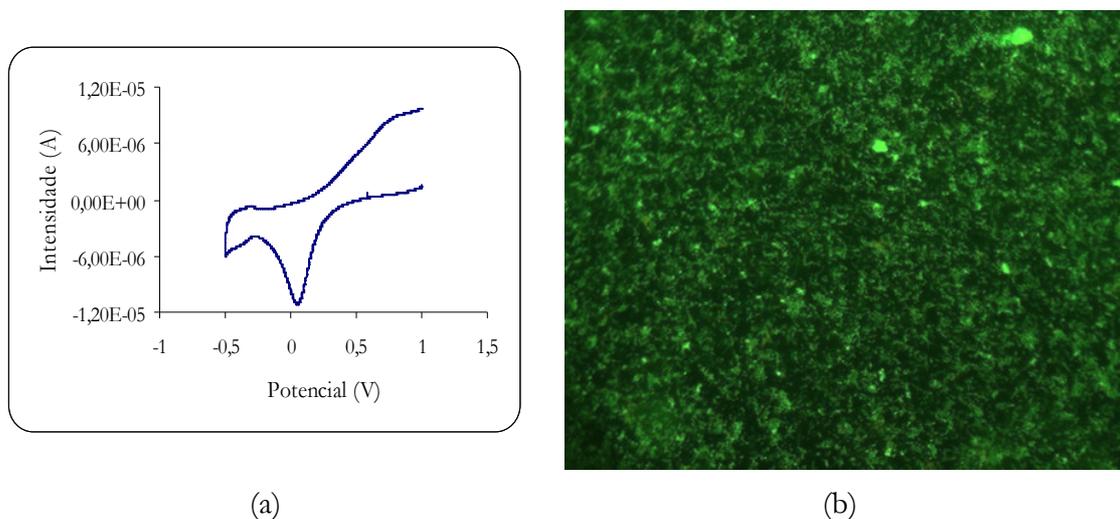
(a)



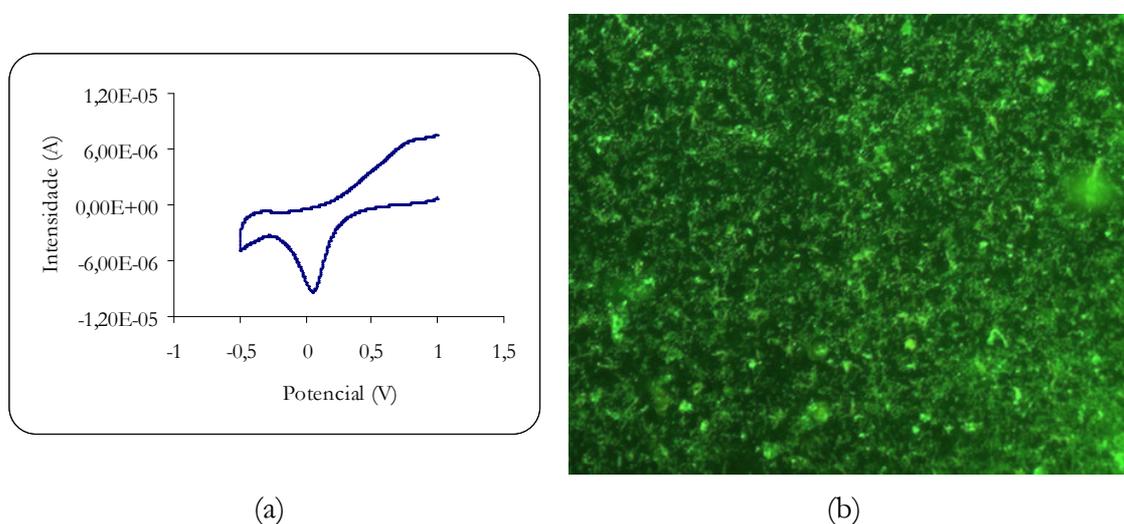
(b)

**Figura AI.35.** Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 4 a  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento(b).

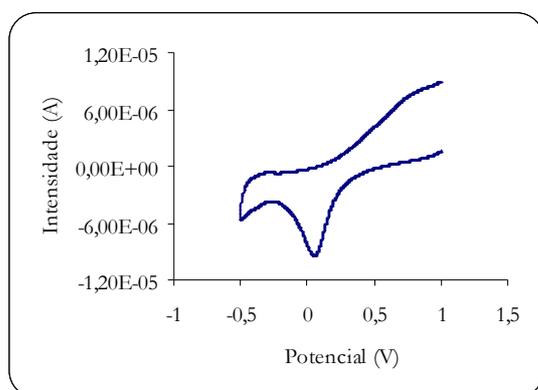
## ❖ Biofilme 6 horas



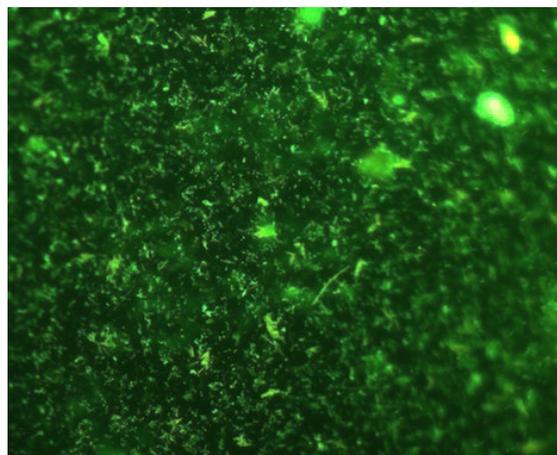
**Figura AI.36.** Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 1 a  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento(b).



**Figura AI.37.** Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 2 a  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento(b).

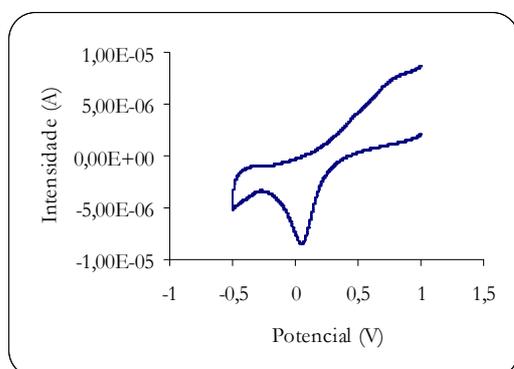


(a)

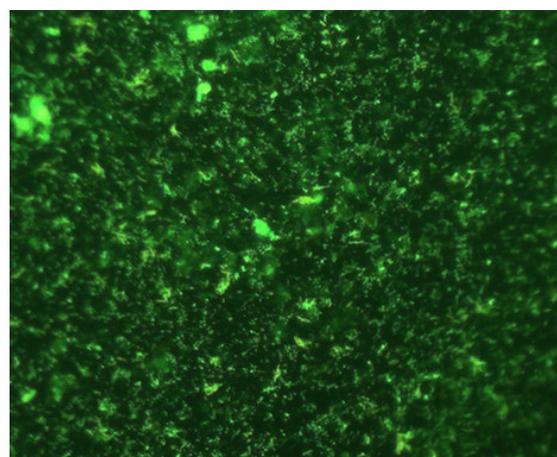


(b)

**Figura AI.38.** Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 3 a  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento(b).



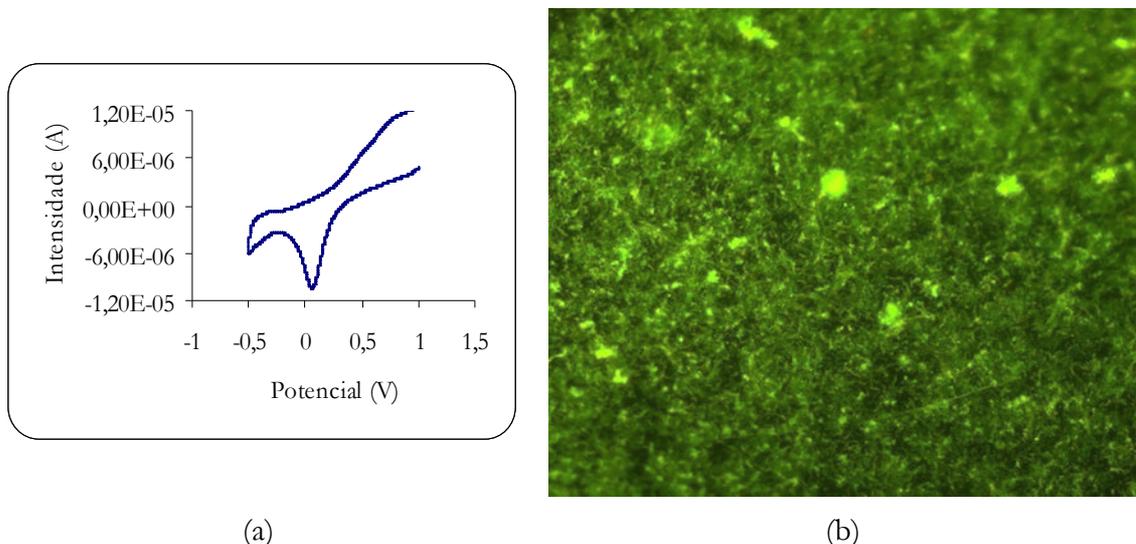
(a)



(b)

**Figura AI.39.** Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 4 a  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento(b).

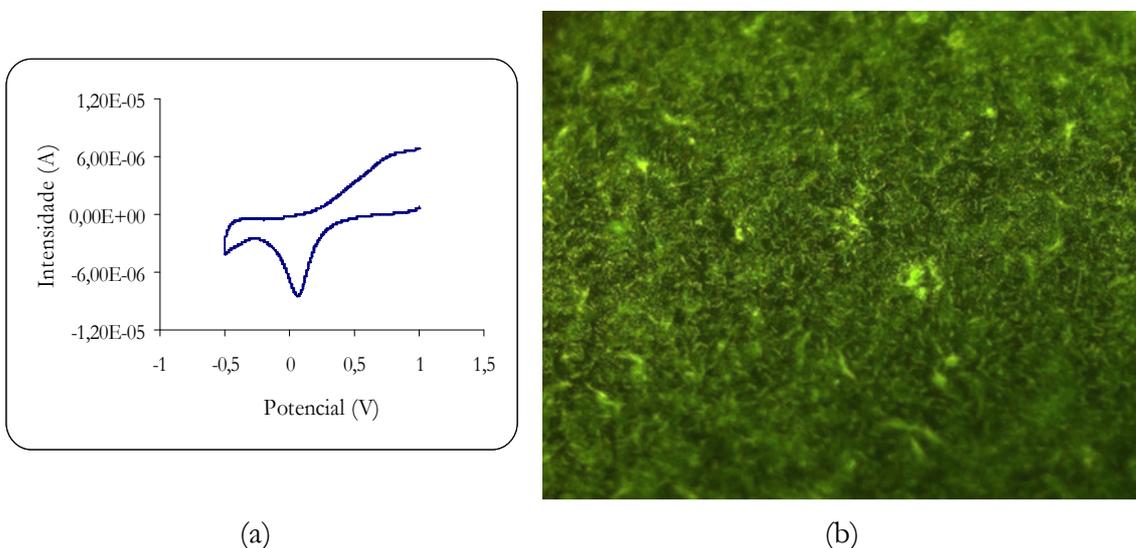
## ❖ Biofilme 12 horas



(a)

(b)

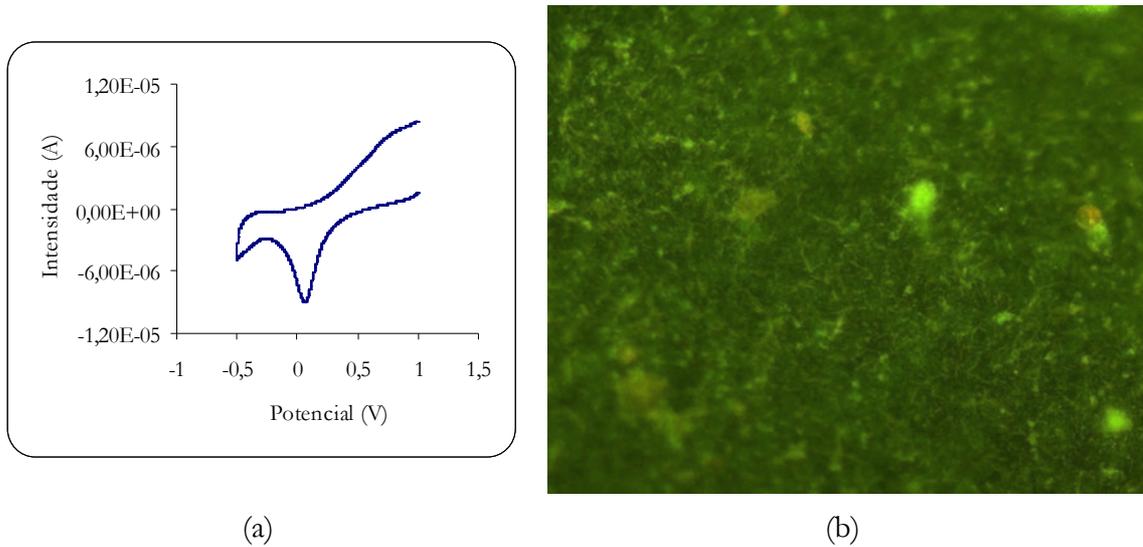
**Figura AI.40.** Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 1 a  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento(b).



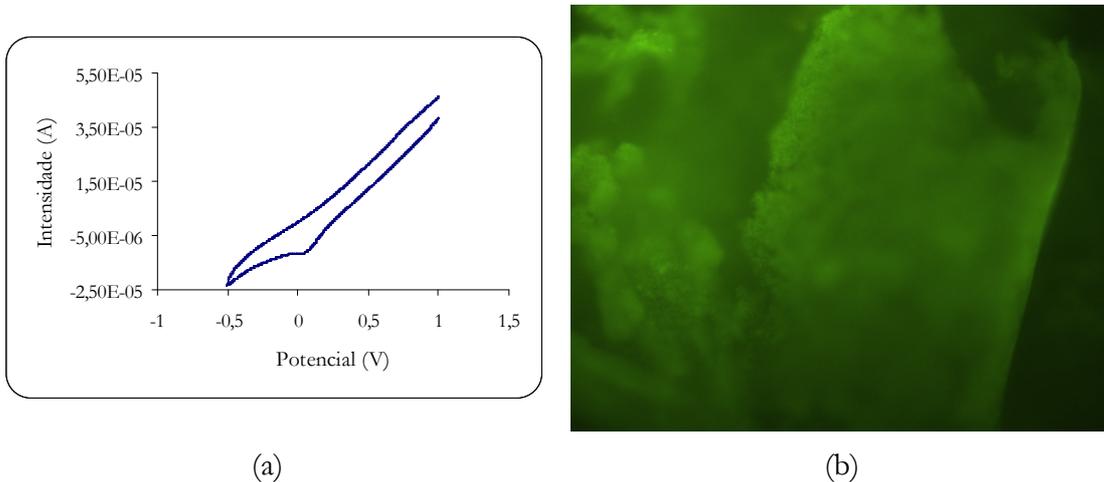
(a)

(b)

**Figura AI.41.** Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 2 a  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento(b).

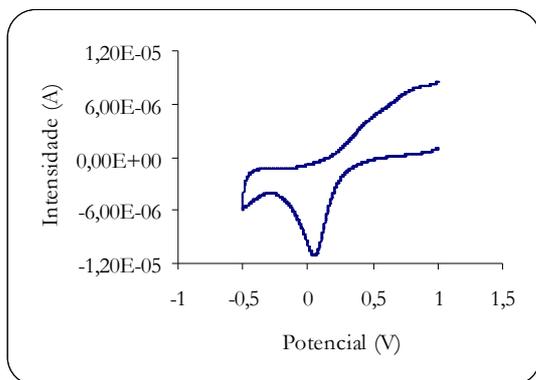


**Figura AI.42.** Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 3 a  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento(b).

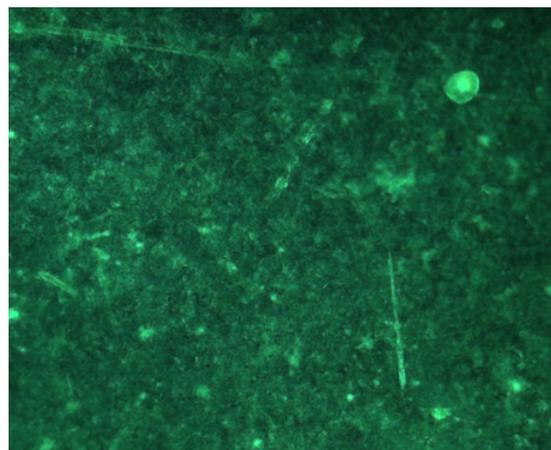


**Figura AI.43.** Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 4 a  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento(b).

## ❖ Biofilme 24 horas

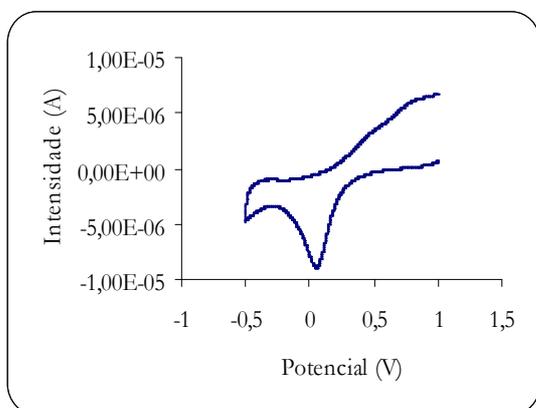


(a)

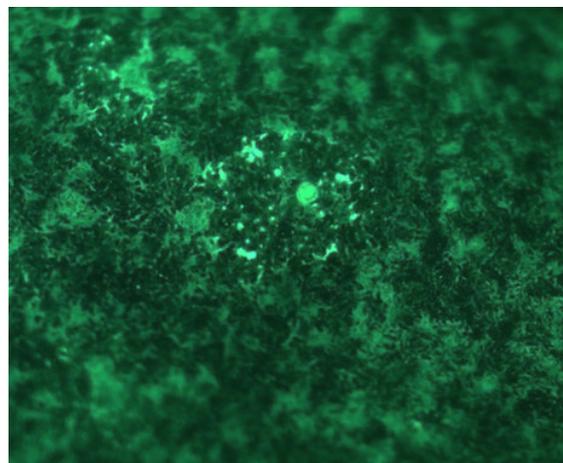


(b)

**Figura AI.44.** Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 1 a  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento(b).

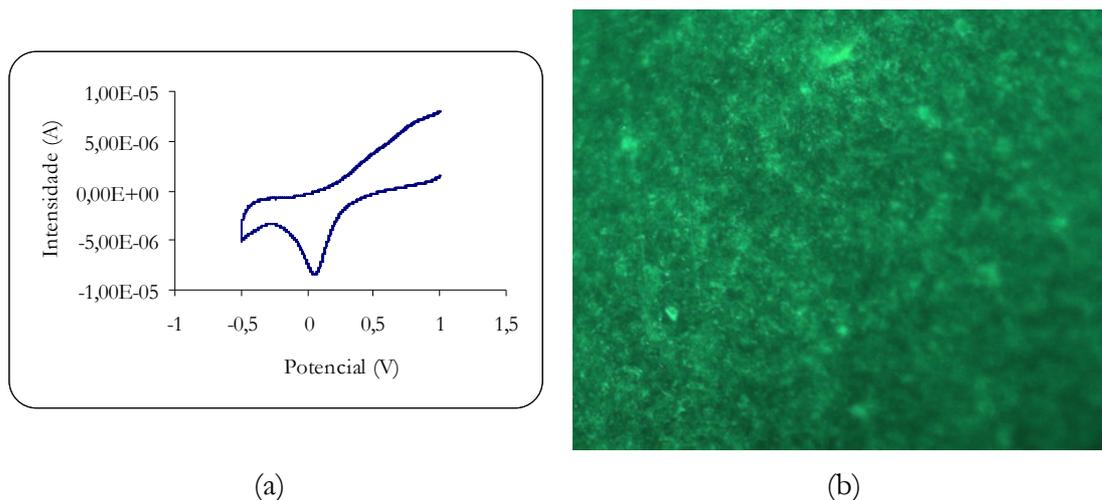


(a)

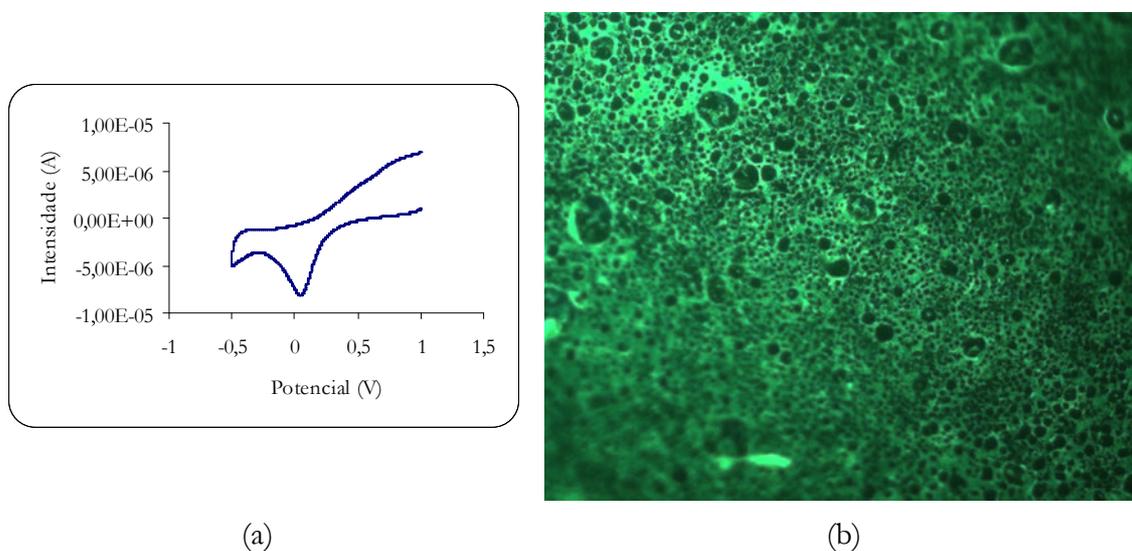


(b)

**Figura AI.45.** Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 2 a  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento(b).



**Figura AI.46.** Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 3 a  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento(b).



**Figura AI.47.** Voltamograma cíclico obtido para o eléctrodo de platina 4 a  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 7 e entre os limites de potencial -0.5 e 1.0 V (a) e respectiva fotografia obtida por microscopia de epifluorescência (ampliação 100x) da superfície do mesmo eléctrodo após 1 varrimento(b).

## Anexo II

---

**Valores obtidos para a altura do pico de dessorção do hidrogénio e percentagem de área de eléctrodo coberta**

Neste anexo serão apresentados os valores obtidos para a altura do pico de desorção do hidrogénio, bem como a correspondente percentagem de área de eléctrodo coberta por biofilme, para cada ensaio (repetições).

Nestas tabelas irão aparecer alguns valores sublinhados, que significa que estes valores não foram considerados para a média, pois não são estatisticamente aceitáveis, por se encontrarem muito afastados dos outros dois ensaios (triplicados).

**Tabela AII.1.** Valores da altura do pico de dessorção do hidrogénio e percentagem de área de eléctrodo coberta, obtidos para o ensaio 1.

Idade do biofilme (h)	Nº do eléctrodo	Altura do pico de dessorção do hidrogénio $\times 10^7$ (A)	Área coberta (%)
2	1	4.886	9.3
	2	4.010	5.7
	3	<u>3.545</u>	<u>22.3</u>
	4	<u>2.197</u>	<u>28.9</u>
6	1	4.337	11.2
	2	2.777	26.9
	3	3.058	30.0
	4	1.103	26.6
12	1	3.936	53.4
	2	2.196	48.5
	3	7.102	39.9
	4	1.346	25.9
24	1	3.736	73.9
	2	<u>2.451</u>	<u>27.6</u>
	3*	-	-
	4	<u>1.640</u>	<u>51.5</u>

\* Para este eléctrodo não existem valores para a altura do pico e para a área coberta, pois ao retirar-se o eléctrodo do fermentador de diluição verificou-se que a platina estava completamente tapada por fita de teflon, considerando-se esta experiência nula.

**Tabela AII.2.** Valores da altura do pico de dessorção do hidrogénio e percentagem de área de eléctrodo coberta, obtidos para o ensaio 2.

Idade do biofilme (h)	Nº do eléctrodo	Altura do pico de dessorção do hidrogénio $\times 10^7$ (A)	Área coberta (%)
2	1	<u>0.567</u>	<u>8.6</u>
	2	1.906	10.7
	3	1.278	16.2
	4	1.322	9.2
6	1	3.089	13.3
	2	2.073	13.1
	3	<u>1.545</u>	<u>9.8</u>
	4	1.527	13.3
12	1	2.092	49.3
	2*	-	40.7
	3	1.124	31.0
	4	0.784	39.3
24	1	2.066	96.6
	2	1.544	94.8
	3	1.047	89.9
	4	0.443	95.8

\* Para este eléctrodo não existe valor para a altura do pico, uma vez que o voltamograma obtido era deformado, por essa razão também não se entrou com o valor de área coberta para a média.

**Tabela AII.3.** Valores da altura do pico de dessorção do hidrogénio e percentagem de área de eléctrodo coberta, obtidos para o ensaio 3.

Idade do biofilme (h)	Nº do eléctrodo	Altura do pico de dessorção do hidrogénio $\times 10^7$ (A)	Área coberta (%)
2	1	3.135	13.2
	2	<u>0.471</u>	<u>14.0</u>
	3	1.391	27.7
	4	1.252	12.1
6	1	<u>1.944</u>	<u>54.8</u>
	2	2.113	56.3
	3	1.119	36.4
	4	1.149	46.5
12	1	<u>0.233</u>	<u>92.7</u>
	2	1.988	82.5
	3	<u>0.606</u>	<u>81.6</u>
	4*	-	-
24	1	1.082	78.6
	2	1.245	84.7
	3	0.305	90.2
	4	0.534	88.2

\* Para este eléctrodo não existe valor para a altura do pico, pois a quantidade de biofilme era tal forma elevada que não houve resposta do eléctrodo, por essa razão também não se entrou com o valor de área coberta para a média.

Na tabela seguinte são apresentados os valores referentes à média dos 3 ensaios e respectivos desvios-padrão, obtida para a altura do pico de dessorção do hidrogénio e para a percentagem de área coberta, para cada eléctrodo.

**Tabela AII.4.** Valores da média e do desvio-padrão, obtidos para a altura do pico de dessorção do hidrogénio e da percentagem de área coberta, em cada idade de biofilme, para o eléctrodo 1.

Idade do biofilme (h)	Altura do pico de dessorção do hidrogénio $\times 10^7$ (A)		Área coberta (%)	
	Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão
2	4.011	0.875	11.3	2.0
6	3.123	0.624	12.3	1.1
12	2.087	0.922	51.4	2.1
24	2.295	1.095	83.0	9.8

**Tabela AII.5.** Valores da média e do desvio-padrão, obtidos para a altura do pico de dessorção do hidrogénio e da percentagem de área coberta, em cada idade de biofilme, para o eléctrodo 2.

Idade do biofilme (h)	Altura do pico de dessorção do hidrogénio (A)		Área coberta (%)	
	Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão
2	2.958	1.052	8.2	2.5
6	2.321	0.323	32.1	18.0
12	2.092	0.104	65.5	17.0
24	1.400	0.154	89.8	5.0

**Tabela AII.6.** Valores da média e do desvio-padrão, obtidos para a altura do pico de dessorção do hidrogénio e da percentagem de área coberta, em cada idade de biofilme, para o eléctrodo 3.

Idade do biofilme (h)	Altura do pico de dessorção do hidrogénio (A)		Área coberta (%)	
	Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão
2	1.335	0.056	22.0	5.8
6	2.089	0.970	33.2	3.2
12	0.917	0.052	35.5	4.5
24	0.676	0.371	90.1	0.15

**Tabela AII.7.** Valores da média e do desvio-padrão, obtidos para a altura do pico de dessorção do hidrogénio e da percentagem de área coberta, em cada idade de biofilme, para o eléctrodo 4.

Idade do biofilme (h)	Altura do pico de dessorção do hidrogénio (A)		Área coberta (%)	
	Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão
2	1.287	0.035	10.7	1.5
6	1.260	0.190	28.8	13.6
12	1.065	0.281	32.6	6.7
24	0.489	0.045	94.0	3.8

**Anexo III**

---

**Cálculos**

Este anexo inclui o cálculo do tempo durante o qual cada eléctrodo funcionou como ânodo e como cátodo (um eléctrodo funciona como ânodo quando a intensidade de corrente é positiva e como cátodo quando é negativa). Apresentar-se-á apenas um exemplo de cálculo para o eléctrodo 1, referente ao ensaio 1, uma vez que para todos os eléctrodos em todos os ensaios se processou do mesmo modo.

### **AIII.1. Cálculo do tempo total de cada ciclo**

O tempo total de cada ciclo foi determinado a partir do potencial total percorrido em cada ciclo e da velocidade de varrimento. Para o ensaio 1, os limites de potencial eram -0.5 e 1.0 V, logo 1.5 V. Como cada ciclo tem 2 varrimentos (o varrimento directo e o varrimento inverso – quando inverte o sentido) então o potencial total de cada ciclo é

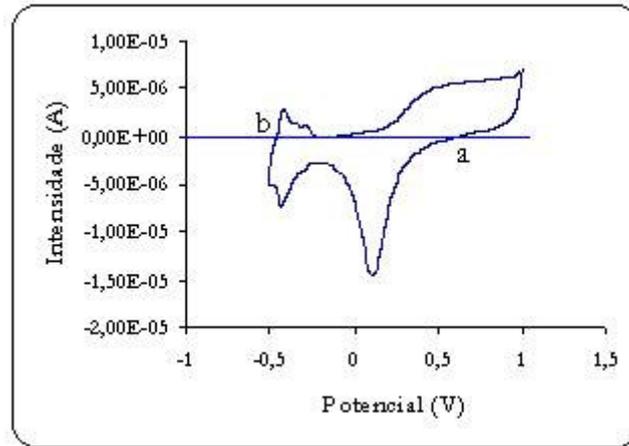
$$1.5 \text{ V} \times 2 = 3.0 \text{ V}$$

e o tempo total de cada ciclo:

$$\frac{3.0 \text{ V}}{0.250 \text{ V s}^{-1}} = 12 \text{ s}$$

### **AIII.2. Cálculo do tempo durante o qual o eléctrodo esteve exposto a uma intensidade de corrente negativa**

Os dados relativos ao voltamograma cíclico, obtido para o ensaio 1, foram editados em Excel, permitindo obter o valor de potencial ao qual a intensidade de corrente passa a negativa e posteriormente a positiva. Foram obtidos os seguintes pontos:



Ponto a = 0.62 V

Ponto b = -0.46 V;

Calculou-se o potencial total do voltamograma cíclico abaixo da linha traçada na figura anterior, tendo em consideração que o potencial vai de 0.62 a -0.5 V e é no varrimento inverso que a intensidade de corrente passa a positiva. O potencial relativo a uma intensidade de corrente negativa para o varrimento directo é

$$|-0.5 \text{ V}| + 0.62 \text{ V} = 1.12 \text{ V}$$

e para o varrimento inverso

$$|-0.5 \text{ V} - (-0.46 \text{ V})| = 0.04 \text{ V}$$

logo o potencial total será a soma dos dois potenciais

$$1.12 \text{ V} + 0.04 \text{ V} = 1.16 \text{ V}$$

Por último calculou-se o tempo durante o qual a intensidade é negativa, dividindo o valor do potencial pela velocidade de varrimento aplicada (neste caso  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ )

$$\frac{1.16 \text{ V}}{0.250 \text{ V s}^{-1}} = 4.64 \text{ s}$$

### **AIII.3. Cálculo do tempo durante o qual o eléctrodo esteve exposto a uma intensidade de corrente positiva**

O tempo durante o qual cada eléctrodo esteve a uma intensidade de corrente positiva foi calculado subtraindo-se o tempo de intensidade de corrente negativa ao tempo total de cada ciclo:

$$12 - 4.64 = 7.36 \text{ s}$$

### **AIII.4. Cálculo do tempo durante o qual o eléctrodo esteve exposto a um potencial positivo**

Para se determinar o tempo de cada ciclo durante o qual o potencial é positivo, dividiu-se o potencial positivo de cada ciclo pela velocidade de varrimento. Os valores de potencial (positivo e negativo) são iguais para todos os eléctrodos dentro do mesmo ensaio. Para o ensaio 1, o valor de potencial variou entre  $-0.5$  e  $1.0 \text{ V}$ , logo, o potencial positivo total de cada ciclo é  $2 \text{ V}$  ( $1 \text{ V}$  no varrimento directo e  $1 \text{ V}$  no varrimento inverso). O tempo de potencial positivo em cada ciclo, será:

$$\frac{2.0 \text{ V}}{0.250 \text{ V s}^{-1}} = 8.0 \text{ s}$$

### AIII.5. Cálculo do tempo durante o qual o eléctrodo esteve exposto a um potencial negativo

Para se calcular o tempo de potencial negativo de cada ciclo, subtraiu-se o tempo de potencial positivo ao tempo total de ciclo:

$$12 - 8.0 = 4.0 \text{ s}$$

## **Anexo IV**

---

**Intervalo de tempo durante o qual a intensidade de corrente é negativa e positiva**

Neste anexo são apresentadas tabelas com os valores da gama de potencial ao qual a intensidade de corrente passa a negativa, bem como o tempo durante o qual a intensidade de corrente é negativa e positiva.

**Tabela AIV.1.** Valores de potencial e de tempo durante o qual a intensidade de corrente é negativa e positiva, para cada um dos eléctrodos, para as condições de operação: velocidade de varrimento  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , limites de potencial  $-0.5$  e  $1.0 \text{ V}$ .

Eléctrodo	Limites de potencial para $I < 0$ (V)	Potencial total (V)	Tempo para $I < 0$ (s)	Tempo para $I > 0$ (s)
1	0.62 a -0.5 -0.5 a -0.46	1.16	4.64	7.36
2	0.70 a -0.5 -0.5 a -0,44	1.26	5.04	6.96
3	0,70 a -0,5 0.5 a -0,43	1.27	5.08	6.92
4	0.70 a -0.5 -0.5 a -0.44	1.25	5.00	7.00
5	0.70 a -0.5 -0.5 a -0.45	1.26	5.04	6.96
6	0.67 a -0.5 -0.5 a -0.45	1.23	4.92	7.08
7	0.71 a -0.5 -0.5 a -0.45	1.27	5.08	6.92
8	0.71 a -0.5 -0.5 a -0.45	1.27	5.08	6.92

**Tabela AIV.2.** Valores de potencial e de tempo durante o qual a intensidade de corrente é negativa e positiva, para cada um dos eléctrodos, para as condições de operação: velocidade de varrimento  $0.150 \text{ V s}^{-1}$ , limites de potencial  $-0.5$  e  $1.0\text{V}$ .

Eléctrodo	Limites de potencial para $I < 0$ (V)	Potencial total (V)	Tempo para $I < 0$ (s)	Tempo para $I > 0$ (s)
1	0.65 a -0.5 -0.5 a -0.37	1.28	8.53	11.47
2	0.67 a -0.5 -0.5 a -0,42	1.25	8.33	11.67
3	0,69 a -0,5 0.5 a -0,43	1.26	8.40	11.60
4	0.67 a -0.5 -0.5 a -0.43	1.24	8.27	11.73
5	0.68 a -0.5 -0.5 a -0.44	1.24	8.27	11.73
6	0.78 a -0.5 -0.5 a -0.44	1.34	8.93	11.07
7	0.70 a -0.5 -0.5 a -0.45	1.25	8.33	11.67
8	0.68 a -0.5 -0.5 a -0.43	1.24	8.27	11.73

**Tabela AIV.3.** Valores de potencial e de tempo durante o qual a intensidade de corrente é negativa e positiva, para cada um dos eléctrodos, para as condições de operação: velocidade de varrimento  $0.500 \text{ V s}^{-1}$ , limites de potencial  $-0.5$  e  $1.0 \text{ V}$ .

Eléctrodo	Limites de potencial para $I < 0$ (V)	Potencial total (V)	Tempo para $I < 0$ (s)	Tempo para $I > 0$ (s)
1	0.67 a -0.5 -0.5 a -0.46	1.21	2.42	3.58
2	0.68 a -0.5 -0.5 a -0,45	1.23	2.46	3.54
3	0,67 a -0,5 0.5 a -0,43	1.22	2.44	2.56
4	0.66 a -0.5 -0.5 a -0.46	1.20	2.40	3.60
5	0.70 a -0.5 -0.5 a -0.45	1.25	2.50	3.50
6	0.71 a -0.5 -0.5 a -0.46	1.25	2.50	3.50
7	0.73 a -0.5 -0.5 a -0.46	1.20	2.40	3.60
8	0.66 a -0.5 -0.5 a -0.47	1.19	2.38	3.62

**Tabela AIV.4.** Valores de potencial e de tempo durante o qual a intensidade de corrente é negativa e positiva, para cada um dos eléctrodos, para as condições de operação: velocidade de varrimento  $0.250 \text{ V s}^{-1}$ , limites de potencial  $-0.5$  e  $1.5 \text{ V}$ .

Eléctrodo	Limites de potencial para $I < 0$ (V)	Potencial total (V)	Tempo para $I < 0$ (s)	Tempo para $I > 0$ (s)
1	1.00 a -0.5 -0.5 a -0.24	2.24	8.96	3.04
2	0.95 a -0.5 -0.5 a -0,22	2.17	8.68	3.32
3	0,99 a -0,5 0.5 a -0,21	2.20	8.80	3.20
4	1.00 a -0.5 -0.5 a -0.21	2.21	8.84	3.16
5	0.97 a -0.5 -0.5 a -0.21	2.18	8.72	3.28
6	1.04 a -0.5 -0.5 a -0.20	2.24	8.96	3.04
7	0.99 a -0.5 -0.5 a -0.21	2.20	8.80	3.20
8	0.99 a -0.5 -0.5 a -0.18	2.17	8.68	3.32

**Tabela AIV.5.** Valores médios do tempo durante o qual a intensidade de corrente é negativa e positiva para cada uma das condições de operação.

<b>Ensaio</b>	<b>Tempo para <math>I &lt; 0</math> (s)</b>	<b>Tempo para <math>I &gt; 0</math> (s)</b>
0.250 V s <sup>-1</sup> -0.5 e 1.0 V	4.99	7.02
0.150 V s <sup>-1</sup> -0.5 e 1.0 V	8.42	11.58
0.500 V s <sup>-1</sup> -0.5 e 1.0 V	2.44	3.56
0.250 V s <sup>-1</sup> -0.5 e 1.5 V	8.81	7.20

**Anexo V**

---

**Intervalo de tempo durante o qual o potencial é  
negativo e positivo**

Na Tabela AV.1 são apresentados os valores do tempo durante o qual o potencial é negativo e positivo.

**Tabela AV.1.** Valores do tempo durante o qual o potencial (E) é negativo e positivo para cada uma das condições de operação.

Ensaio	Tempo para E < 0 (s)	Tempo para E > 0 (s)
0.250 V s <sup>-1</sup> -0.5 e 1.0 V	4.0	8.0
0.150 V s <sup>-1</sup> -0.5 e 1.0 V	6.7	13.3
0.500 V s <sup>-1</sup> -0.5 e 1.0 V	2.0	4.0
0.250 V s <sup>-1</sup> -0.5 e 1.5 V	4.0	12

**Anexo VI**

---

**Artigos científicos publicados**

De seguida apresentam-se uma cópia dos 2 artigos publicados em 2 revistas internacionais, resultantes do trabalho efectuado:

1. Monitoring biofilm formation by using cyclic voltammetry – effect of the experimental conditions on biofilm removal and activity.
2. The use of cyclic voltammetry to detect biofilms formed by *Pseudomonas fluorescens* on platinum electrodes.

Existe um artigo aceite e dois em fase de preparação, que no entanto ainda não estão publicados e, por essa razão, não são aqui apresentados.