



**Diogo Jorge Teixeira de Carvalho**

Licenciado em Ciências da Engenharia Mecânica

**Desenvolvimento e Aplicação de Técnicas  
Inovadoras de Ensaios Não Destrutivos (END)  
com Células Bacterianas**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Engenharia Mecânica

Orientador: Doutor Telmo Jorge Gomes dos Santos,  
Faculdade de Ciências e Tecnologia

Co-Orientador: Doutora Carla C. C. R. de Carvalho, Instituto  
Superior Técnico

**Setembro 2012**



Desenvolvimento e Aplicação de Técnicas Inovadoras de Ensaios Não Destrutivos (END) com Células Bacterianas

Copyright © 2012 Diogo Jorge Teixeira de Carvalho

Faculdade Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Doutor Telmo Santos, pela sua disponibilidade e constante ajuda ao longo da realização deste trabalho, assim como pelas críticas, correcções e sugestões relevantes feitas durante todo o processo.

À minha co-orientadora, Doutora Carla Carvalho, agradeço a sua total disponibilidade desde o primeiro momento, conhecimentos transmitidos e estímulo ao longo de todo o trabalho.

Ao Eng. Mário Fonseca agradeço a ajuda e a solicitude prestada durante a preparação e realização dos ensaios.

Ao Eng. Daniel Leitão, pelo disponibilizar de conhecimentos enriquecedores para o trabalho e pela ajuda dada na realização dos ensaios utilizando Líquidos Penetrantes.

Ao Professor Stanimir Valtcher, pelo disponibilizar de equipamentos fundamentais para os ensaios realizados.

Aos meus colegas e amigos Bruno Mateus e Mestre João Gonzalez, pelo incentivo, apoio, convívio, compreensão e amizade que se construiu para além dos espaços da Universidade. Ao João, pela transmissão de conhecimentos essenciais à concepção dos mecanismos fundamentais para a realização dos ensaios. Ao Bruno, agradeço em especial a constante ajuda, disponibilidade e companheirismo indispensável a um verdadeiro trabalho de equipa.

À minha família pelo constante apoio e confiança do meu trabalho recebido ao longo de toda a minha vida.

À Priscila pelo carinho, incentivo e confiança demonstrados ao longo do meu percurso académico.

Aos meus amigos e colegas de curso, pelo companheirismo ao longo dos últimos anos.

Aos técnicos das oficinas do DEMI da FCT, Senhor António Campos e Senhor Paulo Magalhães pelos ensinamentos e ajuda prestada nas diversas operações realizadas, bem como pelo companheirismo nas horas de trabalho passadas com eles.

Ao Mestre João Borges pelo desenvolvimento prévio deste trabalho.



Desejo agradecer também às seguintes entidades:

Ao Departamento de Engenharia Mecânica e Industrial (DEMI) e ao Departamento de Engenharia Electrotécnica (DEE) da Faculdade de Ciências e Tecnologia (FCT).

Ao Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia (IBB) do Instituto Superior Técnico (IST) por possibilitar o uso das suas instalações e equipamentos necessários à realização deste projecto.

À Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT – MEC), pelo suporte financeiro concedido a este trabalho no âmbito do projecto I&D MicroBac (PTDC/EME – TME/ 118678/ 2010).



## **RESUMO**

O aparecimento de novos materiais e novas tecnologias de produção criou um novo paradigma nos Ensaio Não Destrutivos (END). Exemplo disso é a microfabricação, cuja evolução não tem sido acompanhada por um desenvolvimento consentâneo das técnicas de END, não existindo actualmente capacidade para detectar defeitos submilimétricos com a fiabilidade desejada. Recentemente foram dados os primeiros passos no desenvolvimento de uma nova metodologia de END baseada em células bacterianas para a detecção de micro-defeitos.

O objectivo deste trabalho é continuar a explorar a dimensão, mobilidade, aderência, e fluorescência de células bacterianas para identificar micro-defeitos. Pretende-se validar a metodologia experimentalmente, compreender a influência dos vários parâmetros e determinar o limiar de detectabilidade.

Foram produzidos defeitos artificiais em diferentes materiais, e foram realizados ensaios com diferentes bactérias e parâmetros de inspecção. Foi comparado o desempenho da técnica com os Líquidos Penetrantes e a nova metodologia foi também aplicada a componentes micro fabricados.

Os resultados mostram que a metodologia é funcional e fiável na identificação de defeitos com dimensões superiores a 12,7 µm no cobre e 12,5 µm no alumínio e 9,6 µm no aço inoxidável 304 L. Comprovou-se que é possível e útil tirar partido das propriedades das bactérias, e que as diferentes variantes da metodologia são adequadas a esse fim.

## **PALAVRAS-CHAVE**

Ensaio Não Destrutivos

Suspensão de Células Bacterianas

Micro-defeitos

Microfabricação



## **ABSTRACT**

The appearance of new materials and technologies of production created a new paradigm in the Non Destructive Tests. An example of that is the micro-fabrication, which evolution has not been accompanied by a consensual development of the NDT technics. Currently the capacity to detect sub-millimetric defects with the desired feasibility does not exist. Recently the first steps were taken to develop a new NDT based methodology on bacterial cells to detect micro-defects.

The aim of this project is to continue to explore the dimension, mobility, adhesion and fluorescence of the bacterial cells to identify micro-defects. It is intended to validate the methodology experimentally, understand the influence of various parameters and determine the threshold of detectability.

Artificial defects were produced in different materials and tests were performed with different bacteria and inspection parameters. The technic performance was compared with Penetrating Liquids and the new methodology was also applied to micro-fabricated components.

The results showed the methodology is functional and feasible to identify defects with dimensions superior to 12,7  $\mu\text{m}$  in copper, 12,5  $\mu\text{m}$  in aluminum and 9,6  $\mu\text{m}$  in stainless steel 304 L. It was concluded that it is possible to take advantage of bacteria properties, and that different variants of the methodology are adequate.

## **KEY-WORDS**

Non Destructive Test

Suspension of Bacterial Cells

Micro-defects

Microfabrication



## **ÍNDICE**

AGRADECIMENTOS.....	V
RESUMO .....	IX
PALAVRAS-CHAVE.....	IX
ABSTRACT.....	XI
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. ESTADO DA ARTE E MOTIVAÇÃO .....	1
1.2. OBJECTIVOS .....	3
1.3. TRABALHO REALIZADO .....	3
1.4. RESULTADOS E CONCLUSÕES .....	4
2. REVISÃO DO ESTADO DA ARTE.....	5
2.1. INTRODUÇÃO .....	5
2.2. ENSAIOS NÃO DESTRUTIVOS .....	5
2.3. ENSAIOS NÃO DESTRUTIVOS POR LÍQUIDOS PENETRANTES (LP).....	6
2.4. RECENTES EVOLUÇÕES NOS END POR LÍQUIDOS PENETRANTES .....	8
2.5. ENSAIOS NÃO DESTRUTIVOS BASEADO EM SUSPENSÃO DE CÉLULAS BACTERIANAS ..	9
2.5.1. Descrição da Técnica .....	9
2.5.2. Paralelismo entre Líquidos Penetrantes e Suspensão de Células Bacterianas .....	13
2.7. MICRO-FABRICAÇÃO.....	14
2.7.1. <i>Powder Injection Molding</i> .....	14
2.7.2. Hot Embossing.....	15
2.7.3. Micro Fresagem .....	16
2.7.4. Ablação Laser .....	18
2.8. CÉLULAS BACTERIANAS E BIOFILMES.....	18
2.9. BIOCORROSÃO .....	20
2.10. EFEITO ANTIBACTERIANO DO COBRE.....	21
2.11. MAGNETOTAXIA .....	21

2.12.	OUTROS TRABALHOS DESENVOLVIDOS .....	22
3.	PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE DEFEITOS PARA VALIDAÇÃO EXPERIMENTAL .....	25
3.1.	INTRODUÇÃO .....	25
3.2.	PRODUÇÃO DE DEFEITOS POR MICRO INDENTAÇÃO .....	25
3.3.	PRODUÇÃO DE DEFEITOS POR ELECTROEROSÃO .....	30
3.4.	CRIAÇÃO DE DEFEITOS ATRAVÉS DE LIXAS .....	32
3.5.	COMPONENTES MICROFABRICADOS COM DEFEITOS CARACTERIZADOS .....	33
4.	BACTÉRIAS E EQUIPAMENTO UTILIZADO PARA VALIDAÇÃO EXPERIMENTAL .....	37
4.1.	INTRODUÇÃO .....	37
4.2.	CARACTERIZAÇÃO DAS BACTÉRIAS UTILIZADAS.....	37
4.3.	DESCRIÇÃO DO EQUIPAMENTO UTILIZADO .....	38
4.3.1.	Dispositivo com Quatro Solenóides Horizontais para Microscópio .....	38
4.3.2.	Dispositivo com Rotação de Campo Magnético para Microscópio.....	39
4.3.4.	Solenóide Vertical.....	40
4.3.5.	Dispositivo Automatizado para Campo Magnético Horizontal e Vertical.....	40
4.3.6.	Dispositivo Automatizado com Rotação de Campo Magnético no Plano Horizontal e Vertical .....	41
4.3.7.	Dispositivo para Aplicação de Campo Eléctrico.....	41
4.3.8.	Equipamento para Eliminação do Excesso de Suspensão Bacteriana.....	42
4.3.9.	Equipamento Dedicado à Avaliação Experimental da Técnica END por LP .....	44
5.	ENSAIOS LABORATORIAIS .....	47
5.1.	INTRODUÇÃO .....	47
5.2.	AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL DA TÉCNICA DE END POR LP .....	47
5.4.	EFEITO DO CAMPO MAGNÉTICO NO MOVIMENTO DAS CÉLULAS.....	49
5.6.	EFEITO DO CAMPO ELÉCTRICO NO MOVIMENTO DAS CÉLULAS .....	53
5.7.	ENSAIOS REALIZADOS COM EQUIPAMENTO PARA APLICAÇÃO DE CAMPO MAGNÉTICO .....	55

5.7.1.	Ensaio nos Provetes com Defeitos Produzidos por Indentação.....	55
5.7.2.	Ensaio no Provetete Eletroerodido.....	63
5.7.3.	Ensaio Laboratoriais no Provetete com Diferentes Rugosidades.....	65
5.8.	ENSAIOS LABORATORIAIS UTILIZANDO CAMPOS ELÉTRICOS.....	67
5.8.1.	Ensaio nos Provetes com Defeitos Produzidos por Indentação.....	67
5.8.2.	Ensaio no Provetete Eletroerodido.....	72
5.8.3.	Ensaio Laboratoriais no Provetete com diferentes rugosidades.....	74
5.9.	ENSAIOS LABORATORIAIS NOS COMPONENTES MICROFABRICADOS.....	76
6.	CONCLUSÕES.....	79
7.	PROPOSTAS PARA DESENVOLVIMENTOS FUTUROS.....	81
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83



## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Gráfico publicações de END por LP ao longo dos anos .....	9
Figura 2.2 - Metodologia genérica de teste [1] .....	10
Figura 2.3 – Variantes de aplicação de Bactérias [1] .....	10
Figura 2.4 - Modos de Inspeção e avaliação dos defeitos [1].....	11
Figura 2.5 – Principais etapas dos ensaios a efectuar [1].....	12
Figura 2.6 – Exemplos de aplicações da técnica micro-PIM: a) Coroa dentária [12] , rodas de engrenagem [12], c) Lentes esféricas [13] .....	15
Figura 2.7 – Exemplos de aplicação da técnica <i>Hot Embossing</i> : a) Sensor de fluxo para medição de gases e líquidos [12], b) micro espectrómetro, c) placa para titulação.....	16
Figura 2.8 – Exemplos de micro componentes electrónicos micro fresados .....	17
Figura 2.9 – Gráfico da influência do avanço por dente na rugosidade superficial [18].....	18
Figura 2.10 – Desenvolvimento de um biofilme bacteriano [24].....	19
Figura 2.11 – Comportamento de bactérias na presença de um campo magnético [30] .....	22
Figura 2.12 – Sensor gustativo para avaliação de líquidos [2].....	24
Figura 2.13 - Curativo a brilhar quando em contacto com bactérias [3].....	24
Figura 3.1 – Materiais utilizados na produção de defeitos: a) Acrílico, b) Alumínio, c) Cobre, d) Aço inoxidável AISI 304 L .....	26
Figura 3.2 – Ilustração das matrizes de defeitos produzidas nos provetes.....	28
Figura 3.3 – Matriz reduzida produzida em: a) Acrílico, b) Alumínio, c) Cobre e d) Aço Inox 304 L .....	29
Figura 3.4 – Esquema de equipamento utilizado em Electroerosão [33] .....	31
Figura 3.5 – a) Diferentes Texturas produzidas no provete de Alumínio ( $Ra_1=1,61 \mu m$ , $Ra_2=1,63 \mu m$ , $Ra_3=1,83 \mu m$ , $Ra_4= 2,85 \mu m$ ), b) Punção de cobre utilizado para produzir diferentes texturas .....	32
Figura 3.6 – Componente com diferentes superfícies lixadas ( $Ra_{fila1}=0,13 \mu m$ , $Ra_{fila2}=0,23 \mu m$ , $Ra_{fila3}=0,47 \mu m$ , $Ra_{fila4}=0,80 \mu m$ ) .....	33
Figura 3.7 – Caracterização dos defeitos fornecidos da Universidade de Coimbra.....	34
Figura 3.8 – Componentes microfabricados .....	35
Figura 4.1 – Mesa com 4 solenóides: a) vista de topo, b) acoplado no microscópio .....	39
Figura 4.2 – Mesa com estator de motor passo-a-passo: a) vista de topo, b) acoplada no microscópio.....	39
Figura 4.3 – Solenóide Vertical.....	40
Figura 4.4 – Mesa com solenóide vertical e horizontal: a) Modelo no Solidworks, b) Dispositivo .....	40

Figura 4.5 – Representação no <i>Solidworks</i> da mesa com dois estatores .....	41
Figura 4.6 – Dispositivo para aplicação de Campo Eléctrico: a) Modelo no Solidworks, b) Dispositivo .....	42
Figura 4.7 – Dispositivo para aplicação de Campo Eléctrico para acoplar no microscópio .....	42
Figura 4.8 – Lâmpada Osram HNS 8 W G5 .....	43
Figura 4.9 - Modelo em SolidWorks do Equipamento para aplicação de luz UV .....	43
Figura 4.10 – Equipamentos utilizados nos ensaios da técnica de END por LP .....	46
Figura 5.1 – Metodologia teste aplicada na amostra de cobre: a) Aplicação do <i>spray</i> penetrante, b) Remoção do excesso do <i>spray</i> penetrante, c) Aplicação do <i>spray</i> revelador, d) Revelação dos defeitos .....	48
Figura 5.2 – Dispositivo com rotação de campo magnético .....	49
Figura 5.3 – Amplitude média do movimento das células de <i>S. aureus</i> sujeitas a campos magnéticos.....	52
Figura 5.4 – Amplitude média de movimento das células de <i>S. hominis</i> sujeitas a campos magnéticos.....	52
Figura 5.5 – Microscópio disponível no laboratório .....	55

## LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Cargas utilizadas para a produção de indentações.....	28
Tabela 3.2 – Dimensão das diagonais de cada indentação.....	30
Tabela 4.1 – Propriedades das bactérias utilizadas nos ensaios laboratoriais .....	38
Tabela 4.2 – Propriedades <i>spray</i> de limpeza KD-PR 1 [36] .....	44
Tabela 4.3 – Propriedades do Líquido Penetrante KD FWP-1 [36].....	45
Tabela 4.4 – Propriedades do Spray Revelador (KD-SD1) [36] .....	45
Tabela 5.1 – Rasto das células de <i>Staphylococcus aureus</i> sobre o efeito do campo magnético proveniente do estator com um tempo de exposição de 10 segundos e 150x de ampliação .....	50
Tabela 5.2 – Amplitude do movimento das células sujeitas a campos eléctricos .....	54
Tabela 5.3 – Parâmetros escolhidos nos ensaios no PMMA (ampliação de 150x).....	56
Tabela 5.4 – Parâmetros escolhidos nos ensaios no cobre (ampliação de 150x) .....	58
Tabela 5.5 – Parâmetros escolhidos nos ensaios no alumínio (ampliação de 150x).....	59
Tabela 5.6 – Parâmetros escolhidos nos ensaios no aço inoxidável 304 L (ampliação de 150x) 60	
Tabela 5.7 - Parâmetros experimentais com melhores resultados de todos os ensaios com campos magnéticos .....	62
Tabela 5.8 – Resultados obtidos nas peças eletroerodidas (ampliação de 150x) .....	64
Tabela 5.9 – Resultados obtidos no provete com diferentes rugosidades (ampliação de 150x) .	66
Tabela 5.10 - Parâmetros escolhidos nos ensaios no PMMA (ampliação de 150x).....	68
Tabela 5.11 - Parâmetros escolhidos nos ensaios no cobre (ampliação de 150x).....	69
Tabela 5.12 - Parâmetros escolhidos nos ensaios no alumínio (ampliação de 150x).....	70
Tabela 5.13 - Parâmetros escolhidos nos ensaios no aço inoxidável 304 L (ampliação de 150x).....	71
Tabela 5.14 - Parâmetros experimentais com melhores resultados com campos magnéticos ....	72
Tabela 5.15 – Resultados obtidos nas peças eletroerodidas (ampliação de 150x) .....	73
Tabela 5.16 – Resultados obtidos no provete com diferentes rugosidades (ampliação de 150x)	75
Tabela 5.17 - Resultados obtidos nos componentes fornecidos (ampliação de 150x) .....	77



## SIGLAS

END	Ensaio Não Destrutivo
LP	Líquidos Penetrantes
SCB	Suspensão de Células Bacterianas
PIM	<i>Powder injection Molding</i>



# 1. Introdução

## 1.1. Estado da Arte e Motivação

Os Ensaios Não Destrutivos (END) consistem na aplicação de metodologias e técnicas de ensaio de modo a analisar materiais, peças ou equipamentos, para que desta forma se possam detectar possíveis defeitos existentes, sem causar danos irreversíveis nas propriedades dos materiais, permitindo após a sua análise que o componente volte a ser aplicado na sua área de trabalho.

A motivação deste trabalho está relacionada com o aparecimento recente de novos materiais e novas tecnologias de produção. Este paradigma tem conduzido ao aparecimento de defeitos cuja especificidade morfológica é significativamente diferente dos defeitos característicos dos materiais e tecnologias convencionais, exemplo disso é a microfabricação. Com efeito, as actuais técnicas de END não permitem detectar estes defeitos com a fiabilidade exigida em aplicações industriais de elevada responsabilidade.

Recentemente foram dados os primeiros passos no desenvolvimento de uma nova metodologia de inspecção não destrutiva baseada em suspensão de células bacterianas para a detecção de micro-defeitos [1]. Esta técnica tem demonstrado elevado potencial, a avaliar pelos resultados experimentais de alguns ensaios preliminares já realizados [1].

No trabalho realizado por João Borges [1] conclui-se que a técnica pode ser aplicada em todos os materiais não porosos e que as bactérias aderem preferencialmente nos defeitos. Relativamente aos campos magnéticos e eléctricos experimentados, verificou-se que os parâmetros e/ou equipamentos utilizados não produziram os resultados desejados.

Com este projecto pretende continuar-se a explorar a dimensão, a mobilidade, a aderência, a reprodução, a sobrevivência e a fluorescência de células bacterianas para identificar e dimensionar defeitos em materiais de engenharia, em alternativa aos líquidos penetrantes (LP). Para esse efeito serão utilizados novos equipamentos dedicados. Pretende estudar-se novos parâmetros de campos magnéticos e eléctricos de modo a promover movimentos às células facilitando a penetração das bactérias nos defeitos. Na etapa de remoção do excesso da suspensão bacteriana, pretende adicionar-se uma luz ultravioleta com comprimento de onda germicida de modo a matar de células na amostra a analisar.

É usual a aplicação de END em diversas situações para a detecção de bactérias. Estas podem ser uma fonte de infecção em sistemas de abastecimento de água, comida, sistemas de ar

condicionado e utensílios médicos, além de causarem perdas de transferência de massa e de energia em sistemas industriais.

Um exemplo de END para a detecção de bactérias é o recente desenvolvimento de um dispositivo com o nome de língua electrónica, que consiste num sensor gustativo para avaliação de líquidos, sendo capaz de reconhecer substâncias doces e salgadas [2].

Outra aplicação em que se faz uso de ensaios não destrutivos para detectar bactérias acontece na área da medicina. Investigadores da Universidade de Sheffield, na Grã-Bretanha, desenvolveram polímeros que brilham quando entram em contacto com bactérias [3].

É também frequente a aplicação de END para a detecção de bactérias na indústria da madeira, no estudo da desagregação das rochas, na indústria farmacêutica entre outras.

Estes exemplos têm como objectivo detectar bactérias. Neste trabalho pretende fazer-se exactamente o contrário, uma vez que utilizar-se-á bactérias para a detecção de defeitos superficiais em materiais não porosos, utilizando para isso as suas propriedades, nomeadamente a sua dimensão microscópica, mobilidade e aderência. As bactérias utilizadas nestes ensaios não são patogénicas e o método não tem quaisquer riscos a esse nível.

## **1.2. Objectivos**

Com esta tese pretende-se aprofundar e alargar o desenvolvimento e validação de uma técnica inovadora de END, que se baseia na utilização de células bacterianas para a detecção de defeitos. Os objectivos foram os seguintes:

- Avaliar experimentalmente a inadequação das técnicas existentes de END na detecção de micro-defeitos superficiais em materiais de engenharia em diferentes materiais;
- Desenvolver e aperfeiçoar técnicas inovadoras de END baseadas na utilização de células bacterianas para detecção de micro-defeitos;
- Caracterizar experimentalmente a fiabilidade da nova metodologia de END;
- Criar um catálogo referindo possíveis bactérias a aplicar no ensaio referindo as bactérias que melhor resultado apresentam para um determinado material.

## **1.3. Trabalho Realizado**

Procedeu-se à avaliação experimental da inadequação da técnica de END por LP nas amostras produzidas.

Produziu-se provetes de alumínio, aço inoxidável, cobre e acrílico (PMMA) quadrados com 12 mm de lado. Na superfície dos quatro materiais criou-se matrizes de defeitos através de um micro-durómetro. Estes defeitos têm a forma piramidal com tamanhos distintos. No alumínio criou-se diferentes texturas através do processo de electroerosão. Estas texturas são circulares com 3 mm de diâmetro produzidas com um punção de cobre com esse mesmo diâmetro. Novamente na superfície do alumínio produziu-se diferentes níveis de rugosidade provocados por lixas com diferentes granulometrias.

Para aplicação na metodologia teste, recolheu-se bactérias e elaborou-se um catálogo que apresenta as propriedades de cada bactéria utilizada.

Por fim realizaram-se ensaios que permitiram determinar o limiar de detectabilidade de defeitos da técnica desenvolvida tal como a adesão das células nos diferentes sulcos produzidos pelo processo de electroerosão e por polimento.

## 1.4. Resultados e Conclusões

Confirmou-se que a amplitude de movimento das células aumenta quando sujeitas a campos magnéticos e eléctricos. A amplitude máxima registada com a bactéria *Staphylococcus aureus* foi de 80  $\mu\text{m}$  a 40 Hz. À mesma frequência a amplitude do movimento bactéria *Staphylococcus hominis* foi de 40  $\mu\text{m}$ , a da *Rhodococcus erythropolis* com potencial zeta positivo foi de 10,5  $\mu\text{m}$  e com potencial zeta negativo foi de 5,8  $\mu\text{m}$ .

O limiar de detectabilidade de defeitos registado nos ensaios no cobre foi de 21,9  $\mu\text{m}$ , no PMMA de 132,3  $\mu\text{m}$ , no aço inoxidável 304 L foi de 9,6  $\mu\text{m}$  e no alumínio foi de 22,6  $\mu\text{m}$ .

Nos provetes electroerodidos as bactérias aderiram às diferentes texturas produzidas, e detectou-se erros de padrão nas texturas.

Nos provetes com diferentes rugosidades as bactérias aderiram aos sulcos produzidos pelas diferentes lixas utilizadas. Com esta técnica é possível detectar diferentes níveis de rugosidades através do número de bactérias presentes na superfície do material e falhas na uniformidade da qualidade superficial através da inexistência de células em zonas da superfície.

Com a exploração da dimensão, mobilidade, aderência, e fluorescência de células bacterianas foi possível confirmar a capacidade da técnica de END para detectar micro-defeitos superficiais em materiais não porosos.

## **2. Revisão do Estado da arte**

### **2.1. Introdução**

Neste capítulo apresenta-se o resultado da pesquisa bibliográfica realizada. Será abordado o estado da arte dos principais temas na tese, ou seja, os END, as técnicas de END por LP e também será abordado o tema de biofilmes. Por fim, apresenta-se um levantamento e análise dos trabalhos publicados nestas áreas.

### **2.2. Ensaio Não Destrutivo**

Um Ensaio Não Destrutivo (END) é um método de análise em que o material em teste não é destruído [4]. Existem diversos tipos de END em que a sua escolha depende do tipo de material e dos tipos de defeitos em análise.

Com o rápido desenvolvimento industrial que se tem observado nos últimos anos juntamente com o crescimento da fiabilidade requerida, os END têm um papel cada vez mais importante. Estes ensaios são utilizados para detectar diferentes tipos de defeitos em diferentes materiais, de modo a caracterizá-los, quanto à sua morfologia, localização e dimensão. Os END são utilizados para inspeccionar matérias-primas, produtos em processo de fabrico, produtos acabados e produtos ao longo do seu tempo de vida de utilização [5]. Os métodos mais usuais de END são: a inspeção visual, os líquidos penetrantes, as partículas magnéticas, as correntes induzidas, os ultra-sons e os Raios X, existindo muitas outras variantes destas técnicas que também são vulgarmente aplicadas.

Na actual conjuntura financeira os END ganham uma maior relevância, uma vez que a utilização deste tipo de ensaios resulta num aumento de produtividade e fiabilidade, pois com a detecção de defeitos reduz-se perdas de material, de mão-de-obra e de tempo de produção, implicando redução de custos.

Para que os resultados finais dos ensaios sejam válidos é necessário reunir um conjunto de condições, tais como: pessoal treinado, qualificado e certificado; equipamentos calibrados e procedimentos de execução bem estipulados e claros.

### 2.3. Ensaio Não Destrutivo por Líquidos Penetrantes (LP)

O END por LP é um método utilizado para detectar defeitos superficiais em todo o tipo de materiais, excepto nos porosos ou com rugosidade elevada. Este método começou a ser desenvolvido antes da Primeira Guerra Mundial na indústria ferroviária na inspecção de componentes de caminhos-de-ferro, tais como, carris, veios e rodas [5, 6]. As peças a inspecionar eram colocadas em contacto com óleo mineral durante algum tempo, de seguida eram secas e cobertas com talco. Com o aparecimento de manchas de óleo à superfície, a existência de falhas nos componentes eram reveladas. A grande limitação deste ensaio era o facto de não ser possível detectar defeitos de dimensão reduzida ou com abertura à superfície muito apertada. Através do desenvolvimento de óleos de aplicação com maior poder de penetração e com agentes corantes, esta técnica tem hoje em dia um papel extremamente importante na detecção de defeitos em diferentes tipos de materiais, sejam eles materiais magnéticos, não-magnéticos, metálicos ou não-metálicos, em ligas de alumínio, ligas de titânio, magnésio, bronzes, latões, vidros, cerâmicos e plásticos [5, 6].

O ensaio baseia-se em fazer penetrar no defeito, de uma peça previamente limpa, um líquido, que através do efeito de capilaridade preencherá os defeitos existentes à superfície. O líquido penetrante permanece algum tempo à superfície até ser removido o excesso. Pode ser aplicado um produto absorvente, o revelador, que funciona como mata-borrão, aumentando a visibilidade das indicações de defeito [6].

O nome “penetrante” vem da propriedade essencial que este produto deve ter, ou seja, a sua habilidade de penetrar em aberturas apertadas [6]. Um bom líquido penetrante deve ser fabricado com as seguintes propriedades:

- Boa capilaridade e molhabilidade
- Coloração de modo a que seja visível quando o revelador é utilizado
- Baixa volatilidade
- Ponto de inflamação nunca inferior a 55°C
- Baixa toxicidade
- Estável termicamente: evitando que os pigmentos responsáveis pela coloração sejam afectados
- Inerte quimicamente, não reagindo quimicamente com as peças a analisar
- Fácil remoção da superfície da peça permanecendo nos defeitos
- Sensibilidade adequada ao tipo de defeitos a detectar
- Viscosidade de acordo com o tipo de defeitos a detectar

Em seguida faz-se uma breve explicação das quatro propriedades principais. A propriedade de sensibilidade avalia a capacidade do líquido penetrar no defeito e o seu brilho.

Assim consideram-se 4 níveis de sensibilidade, sendo o mais baixo o que só revela grandes descontinuidades e o nível 4 o que consegue revelar descontinuidades muito reduzidas [5]. A propriedade de viscosidade por si só não define um bom ou mau penetrante [6]. Intuitivamente diz-se que quanto menos viscoso for um líquido maior é a sua capacidade de penetrar numa descontinuidade, mas esta afirmação nem sempre é verdadeira. A viscosidade do líquido interfere na velocidade de penetração na descontinuidade. Um líquido com viscosidade baixa pode não ter tempo suficiente de penetração, pois não permanece muito tempo na superfície da peça, pondo em causa todo o ensaio e em contrapartida líquidos com elevada viscosidade têm tendência a serem removidos das descontinuidades quando a etapa de limpeza da peça é executada [6]. Portanto requer-se uma escolha cuidada e acertada de um líquido penetrante de forma a não pôr em causa a fiabilidade do processo.

A capilaridade é a propriedade física que um fluido tem de subir ou descer em tubos extremamente finos. Assim, ajustando ao END por LP, a capilaridade indica a capacidade do líquido penetrar num defeito, portanto quanto maior for, mais facilmente o líquido preenche um defeito.

Por fim, a propriedade de molhabilidade indica a tendência de um determinado fluido espalhar ou aderir sobre uma superfície sólida. Esta característica é avaliada pelo ângulo de contacto do líquido com a superfície. Quanto menor o ângulo de contacto maior a molhabilidade, isto é, o líquido molha mais a superfície sólida em contacto [5].

O processo de aplicação desta técnica é composto por 6 operações:

1. Limpeza da superfície – esta etapa é extremamente importante, pois uma limpeza imprópria da superfície pode resultar em falsos resultados.
2. Aplicação do penetrante – consiste em aplicar o LP sobre a superfície a inspeccionar. Dois tipos de LP podem ser aplicados, um penetrante colorido ou um fluorescente [5].
3. Remoção do excesso do penetrante – após um certo tempo de penetração, o excesso de líquido é removido da superfície com produtos adequados ao tipo de líquido penetrante. É essencial que durante este processo não se retire o líquido dos defeitos.
4. Aplicação do revelador – Consiste na aplicação de um filme uniforme de revelador sobre a superfície. O revelador é usualmente um pó fino branco. O revelador absorve o penetrante dos defeitos revelando o local dos mesmos.
5. Interpretação dos resultados obtidos – Após a aplicação do revelador os resultados obtidos são analisados e interpretados de modo a concluir se os defeitos são ou não prejudiciais.
6. Limpeza após ensaio – Esta última etapa consiste na limpeza de todos os resíduos de produtos que possam prejudicar um futuro trabalho na peça.

## 2.4. Recentes Evoluções nos END por Líquidos Penetrantes

O END por LP tem sido muito utilizado durante as últimas décadas. O seu estudo e aperfeiçoamento levaram a aumentar o limiar de detectabilidade de descontinuidades em qualquer tipo de material, excepto os porosos.

Com a crescente necessidade de miniaturização de componentes, os END existentes não acompanharam a evolução dos processos de fabricação e da existência de novos materiais. Assim, em relação ao END por LP o limiar de detectabilidade manteve-se inalterado na última década. A avaliar pelo número de trabalhos de investigação publicados concluiu-se que o desenvolvimento desta técnica não sofreu grandes evoluções a partir da década de 90 [7]. A Figura 2.1 ilustra essa situação.

A pesquisa foi realizada no motor de busca “*Sciencedirect*” . Este motor de busca possui a revista “*NDT&E International*” onde publica recentes investigações e desenvolvimentos do tema de END. A pesquisa foi realizada por diferentes palavras-chave. Pesquisou-se por “*liquid penetrant*”, “*dye penetrant*” e “*penetrant testing*”.

No gráfico da Figura 2.1 está representado o número de publicações relacionadas com o tema ao longo dos últimos anos, o que indica que a técnica de END por LP sofreu o seu principal desenvolvimento no início da década de 90, mais precisamente nos primeiros três anos da década de 90 e no último ano da década de 80.

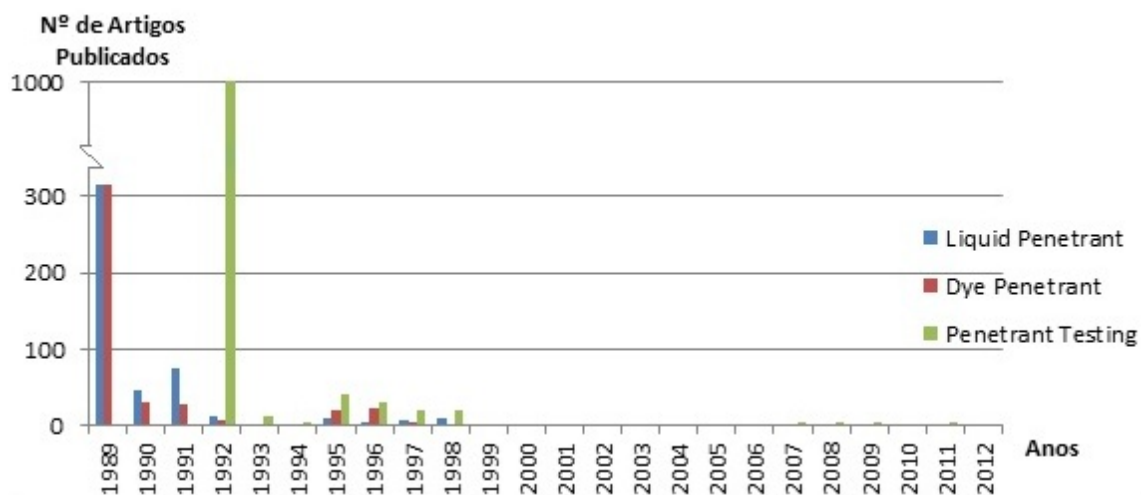


Figura 2.1 - Gráfico publicações de END por LP ao longo dos anos

Na Figura 2.1 a barra representante do ano de 1989, corresponde também à soma de publicações de todos os anos anteriores a esse.

## 2.5. Ensaios Não Destrutivos baseado em Suspensão de Células Bacterianas

### 2.5.1. Descrição da Técnica

A técnica de END baseada em Suspensão de Células Bacterianas é uma técnica pioneira que consiste em aplicar a suspensão para a detecção de micro-defeitos que tem demonstrado elevado potencial, a avaliar pelos resultados experimentais de alguns ensaios preliminares já realizados e que foram apresentados no âmbito da tese de João Borges. [1].

Esta técnica tem como alvo o estudo de defeitos em componentes microfabricados sendo possível tirar proveito das dimensões reduzidas das bactérias. Foi desenvolvida uma metodologia de teste para a aplicação da técnica que consiste em várias etapas. Como em qualquer END a primeira etapa consiste na limpeza prévia da peça a analisar, em seguida é aplicada uma suspensão de células bacterianas. Após um tempo de espera e penetração, para que as bactérias penetrem e adiram no material, o excesso é removido da superfície do material e dá-se início às etapas de revelação, inspeção, interpretação e avaliação dos resultados. De forma a evitar danos na peça analisada, sobretudo por biocorrosão, limpa-se e esteriliza-se com meios adequados ao componente analisado. É importante referir que a duração do ensaio não deve exceder os 10 minutos de modo a evitar a adesão irreversível das células à superfície. Na Figura 2.2 apresenta-se resumidamente a metodologia teste desta técnica.

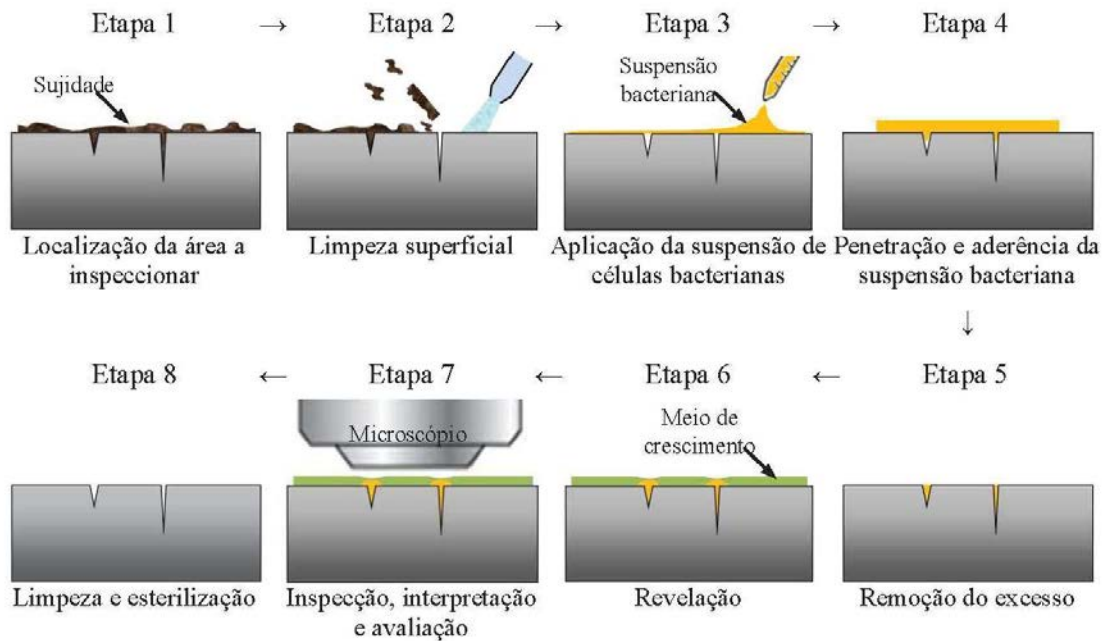


Figura 2.2 - Metodologia genérica de teste [1]

As etapas apresentadas possuem variantes de aplicação, onde a sua escolha depende do tipo de bactérias utilizado de forma a obter os melhores resultados. A 3ª Etapa pode ser realizada por derrame, imersão ou spray (Figura 2.3) [1]. A 4ª Etapa pode ser acelerada induzindo na peça em estudo um campo eléctrico ou magnético, caso as bactérias escolhidas tenham esse tipo de propriedades. Por fim, a 7ª Etapa é realizada, caso seja possível, a olho nu ou por microscópio (Figura 2.4).

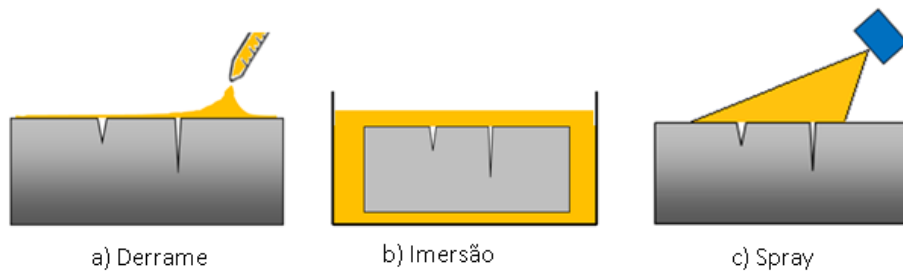


Figura 2.3 – Variantes de aplicação de Bactérias [1]

Os modos de inspeção e avaliação dos defeitos são:



Figura 2.4 - Modos de Inspeção e avaliação dos defeitos [1]

Por forma a clarificar a possível escolha das metodologias de inspeção apresenta-se na Figura 2.5 um organograma das principais etapas dos ensaios a efectuar.

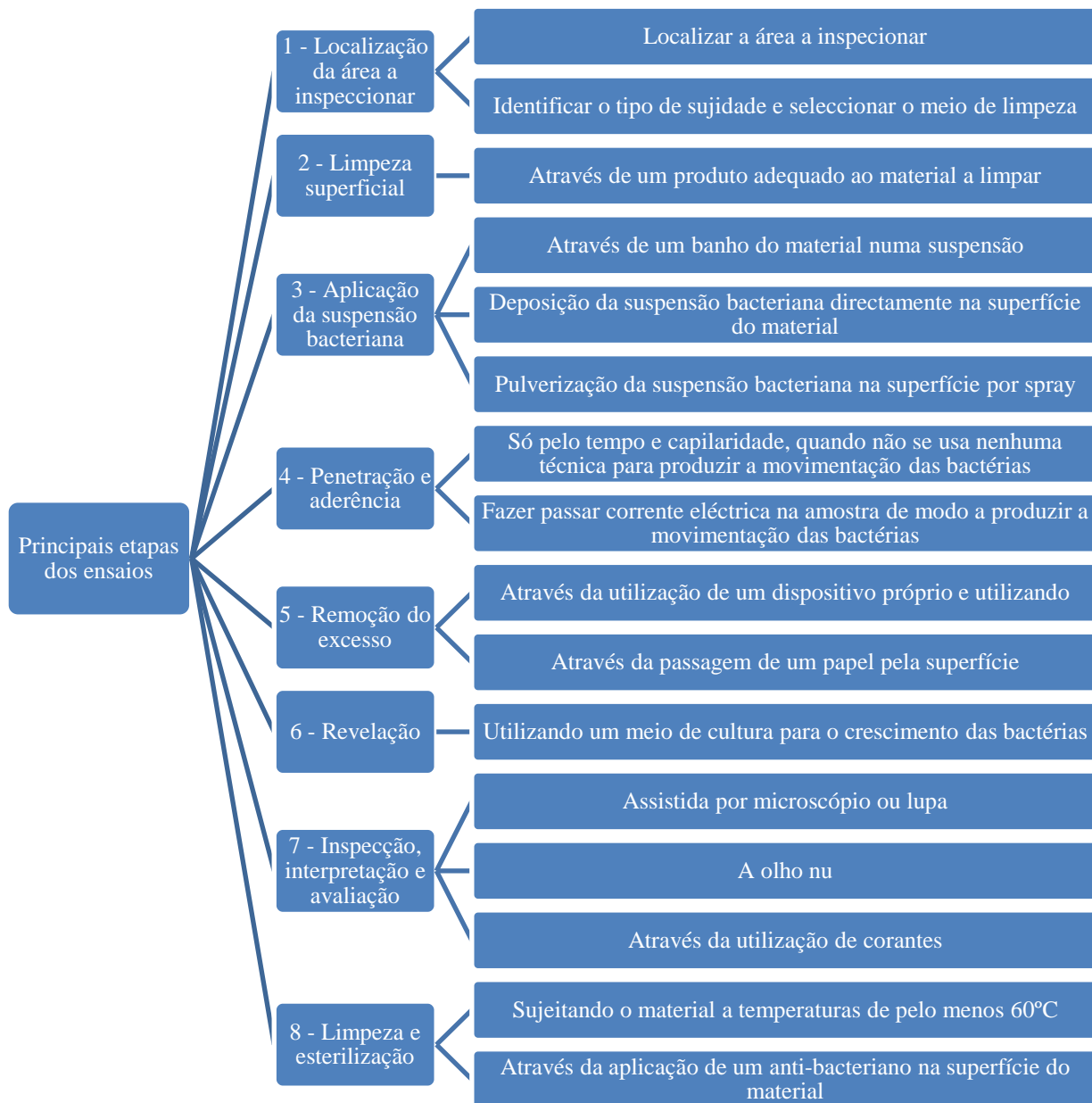


Figura 2.5 – Principais etapas dos ensaios a efectuar [1]

A técnica desenvolvida para aplicar Suspensão de Células Bacterianas para detectar defeitos superficiais, especialmente micro-defeitos, têm uma ampla gama de aplicabilidade, podendo ser aplicadas em diversos tipos de materiais com ou sem propriedades magnéticas ou eléctricas. A microfabricação é o principal alvo de estudo de aplicação desta técnica, devido à dimensão reduzida dos componentes fabricados e ao facto de as técnicas convencionais de END (Ultra-sons, Raios-x, Correntes Induzidas e LP) não serem adequadas à inspecção de componentes microfabricados. Por exemplo, na técnica de END por Correntes Induzidas as sondas de inspecção utilizadas são de maior dimensão que os componentes a analisar, por isso seria impossível a realização da inspecção dos componentes microfabricados.

## **2.5.2. Paralelismo entre Líquidos Penetrantes e Suspensão de Células Bacterianas**

Encontra-se facilmente paralelismo entre a técnica de líquidos penetrantes e a técnica que será desenvolvida baseada na utilização de suspensão de células bacterianas.

A técnica por Líquidos Penetrantes não permite a detecção de defeitos de reduzida dimensão ou com uma abertura à superfície apertada [5].

Existem várias etapas coincidentes durante o processo de aplicação destas duas técnicas. Ambas necessitam de uma limpeza prévia da peça a analisar, de modo a remover possíveis impurezas ou sujidades, de forma a não comprometer o preenchimento dos defeitos pelo líquido penetrante ou da suspensão de células bacterianas. Na etapa de aplicação do líquido penetrante ou do Filme de Células Bacterianas é preciso esperar um tempo certo de penetração do líquido ou do filme nas descontinuidades. Em ambas as técnicas o líquido penetrante ou o filme de células bacterianas podem ser aplicados por *spray*, por derrame ou por imersão. A remoção do excesso também é uma etapa pertencente às duas técnicas, havendo uma variante na técnica a desenvolver, sendo possível a utilização de uma luz ultravioleta com comprimento de onda germicida para remover o excesso de células vivas à superfície sem interferir com as existentes nos defeitos. Na técnica a desenvolver a inspeção de defeitos pode ser realizada a olho nu tal como na dos LP, mas também pode ser necessário a utilização de uma lupa ou de um microscópico. Por fim, a etapa de limpeza da superfície da peça após a realização do ensaio é comum às duas técnicas.

A técnica de END com Suspensão de Células Bacterianas (SCB) tem como base o ensaio por LP mas com a vantagem de se utilizar células bacterianas.

Com o desenvolvimento da técnica de SCB pretende aumentar-se o limiar de detectabilidade de micro defeitos superficiais, podendo significar um enorme avanço neste tipo de ensaios.

## 2.7. Micro-fabricação

A necessidade de miniaturização de componentes teve início quando os componentes existentes não acompanharam a necessidade de novas aplicações, assim durante a década de 50 houve uma grande revolução em variadas tecnologias [8].

Aplicações na medicina, na indústria automóvel e no campo da electrónica são exemplos de áreas em constante evolução necessitando de componentes cada vez mais pequenos para alargarem os horizontes de aplicabilidade e funcionalidades [8]. A tendência de miniaturização criou um novo paradigma de produção na indústria, uma vez que este tipo de componentes necessita de uma base teórica diferente da existente, baseando-se então em resultados empíricos [9]. É importante realçar que normalmente não é possível adaptar as máquinas existentes para produzir os componentes à escala micro, portanto é necessário o desenvolvimento das mesmas para a produção deste tipo de componentes [8].

Microsensores de pressão são exemplos de componentes desenvolvidos nesta década. Durante a década de 80 houve o desenvolvimento do primeiro acelerómetro que foi utilizado no sistema de travagem antibloqueio, o mais conhecido por ABS, nas suspensões activas e nos airbags [8]. Nos últimos anos tem-se verificado um grande desenvolvimento na área de produção de microcomponentes, sendo na área da electrónica que se verifica uma tendência mais forte. Com a redução de escala dos componentes, tecnologias que eram tidas com inviáveis são agora possíveis.

Em seguida apresenta-se uma breve explicação de processos de micro-fabricação mais actuais e utilizados:

### 2.7.1. *Powder Injection Molding*

*Powder Injection Molding* (PIM) é um processo que combina a produtividade de moldagem por injeção de plásticos com a possibilidade de fabricar metais e compostos cerâmicos [10]. Processo utilizado para a produção de peças com formas complexas, com grande qualidade e precisão. É derivado do processo *Polymer Injection Molding*, baseando-se em muito na tecnologia já implementada.

É constituído por várias etapas onde a primeira consiste na mistura de um ligante com a matéria-prima (em pó), que é injectada num molde com o formato final da peça. Em seguida a peça passa pelo processo de *debinding*, que consiste na remoção do ligante adicionado anteriormente. Esta etapa de remoção é muito importante, pois tem de ser realizada de uma forma muito cuidada, uma vez que é possível alterar a forma da peça final. Por fim, realiza-se a etapa de sinterização onde a peça final, através de um tratamento térmico, sofre alterações na

sua estrutura microscópica com o objectivo de obter uma peça mais densa, melhorando assim as suas propriedades mecânicas.

O desenvolvimento deste método veio da necessidade da produção de peças com formas complexas em metais ou compostos cerâmicos com custos competitivos. Este é um processo extremamente atractivo na medida em que pode ser utilizado na produção de peças com espessuras de 0,2 a 20 mm, num de peso de 0,02 a 100 g, com um nível de complexidade elevado e com um acabamento de grande qualidade [11].

Pode ser aplicado em diversas áreas, tais como, a indústria automóvel, tecnologia aeroespacial, componentes médicos e dentários, bens de consumo como a relojoaria e a joalharia, micro sistemas e sensores e na electrónica. O mercado que abrange a área da saúde está fortemente desenvolvido nos Estados Unidos da América, tendo este o seu monopólio. Os materiais mais utilizados nesta técnica de microfabricação são o aço inox 316L, o aço rápido M2 e o carboneto de tungsténio. Coroas dentárias, pequenas rodas de engrenagem [12] e lentes astéricas [13] são exemplos de microcomponentes fabricados por esta técnica apresentam-se na Figura 2.6.



Figura 2.6 – Exemplos de aplicações da técnica micro-PIM: a) Coroa dentária [12] , rodas de engrenagem [12], c) Lentes esféricas [13]

Os defeitos mais comuns aparecem devido à elevada temperatura do molde [14] ou devido a uma falha de preenchimento do mesmo. Estes defeitos traduzem-se no aparecimento de fissuras e de poros.

### 2.7.2. Hot Embossing

*Hot Embossing* é uma técnica que imprime microestruturas num polímero utilizando um molde de silício.

Tal como a tecnologia PIM, é um processo extremamente importante na área da microfabricação. É utilizado para fabricar micro estruturas de plástico com grande qualidade e precisão [15].

Para o fabrico de pequenos protótipos é muito utilizado, mas como é relativamente lento e constantemente associado a uma grande necessidade de trabalho manual, não é uma primeira escolha na indústria [15].

É iniciado pressionando a matriz contra o polímero previamente aquecido acima da temperatura de transição vítrea. Este aquecimento e pressão são feitos em vácuo. Após o arrefecimento do material abaixo da temperatura de transição vítrea, a prensa é aberta e a peça processada é removida da matriz. É de salientar que no final deste processo é sempre necessário executar algum tipo de acabamento na peça final.

Para ter um bom resultado final é importante que a máquina e o molde estejam bem alinhados de forma a evitar estampagem incompleta. A força de pressão tem de ser uniformemente exercida sobre o polímero [16].

Este processo tem a capacidade de produzir componentes extremamente pequenos e tem a grande vantagem de quando implementado na indústria, não necessitar de máquinas novas, uma vez que máquinas já comercializadas podem ser utilizadas. Através da automatização deste processo, consegue-se diminuir custo de produção [15].

Sensores de fluxo para medição de gases e líquidos, micro espectrómetros e placas para titulação são exemplos de produtos produzidos pela técnica *Hot Embossing* (Figura 2.7).



Figura 2.7 – Exemplos de aplicação da técnica *Hot Embossing*: a) Sensor de fluxo para medição de gases e líquidos [12], b) micro espectrómetro, c) placa para titulação

Os defeitos mais comuns ocorrem devido à adesão entre o polímero e o molde na etapa de desmolde e também devido às tensões causadas pela expansão térmica diferente no molde e no polímero. Para evitar o aparecimento destes defeitos, deve otimizar-se os parâmetros de controlo, para garantir uma melhor qualidade [17].

### 2.7.3. Micro Fresagem

O processo de Micro fresagem é muito semelhante à fresagem comum. Envolve a fresagem de micro-componentes cada vez mais utilizados nas diferentes indústrias. Possui os benefícios de fabricar peças na escala micro e macro, uma grande variedade de materiais com geometrias variáveis utilizando ferramentas a partir de 10  $\mu\text{m}$  [18].

É um método extremamente importante no fabrico de utensílios médicos e em equipamentos electrónicos, uma vez que a constante evolução obriga a produção de componentes cada vez mais pequenos, de modo a aperfeiçoar os componentes já existentes.

Esta tecnologia surge como uma escolha válida, aliando o baixo custo de produção com o reduzido número de etapas, para conseguir peças com elevadas razões de dimensões [19].

O processo de Micro Fresagem possui duas componentes principais:

- O fabrico de pequenas ferramentas com arestas de corte extremamente afiadas
- A remoção de material da peça com equipamento de alta precisão e elevada repetibilidade [19].

O tipo de máquinas utilizadas neste processo varia de tamanho consoante o volume de produção pretendido e, através do aperfeiçoamento das mesmas, o tamanho final das peças produzidas diminui, produzindo tolerâncias ao nível dos micrómetros.

Na Figura 2.8 apresentam-se exemplos de micro componentes electrónicos micro fresados.



Figura 2.8 – Exemplos de micro componentes electrónicos micro fresados

Os defeitos mais comuns nos produtos fabricados por esta técnica são rebarbas e rugosidade superficial [18]. A deformação angular da ferramenta e sua flexão são uma das causas do aparecimento de defeitos [18]. Outro factor que provoca altas rugosidades superficiais nos componentes micro fresados é o avanço por dente. Observa-se na Figura 2.9 que um baixo avanço por dente provoca rugosidades mais elevadas [18].

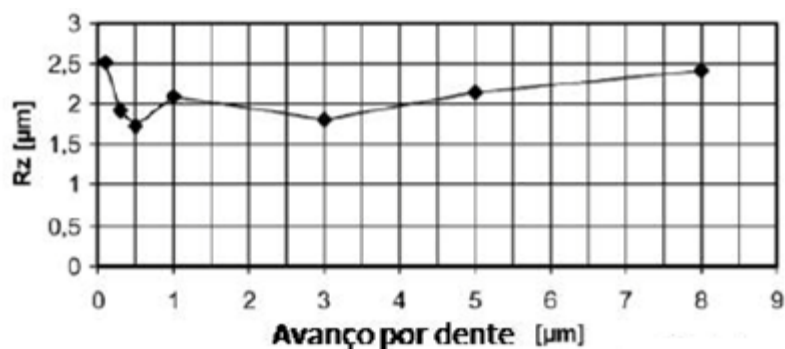


Figura 2.9 – Gráfico da influência do avanço por dente na rugosidade superficial [18]

Defeitos como a rebarba podem ser evitados com a escolha indicada da ferramenta de corte utilizada nos diferentes materiais ou substituindo a ferramenta quando se encontra em fim de vida.

#### 2.7.4. Ablação Laser

Este processo utiliza a elevada potência do laser para vaporizar matéria de uma superfície alvo, chegando a temperaturas superiores a 2000°C. É ejetada nessa superfície uma nuvem de partículas. Essa nuvem de partículas desloca-se a velocidades elevadíssimas, expande-se para longe do alvo e as suas partículas vão condensar-se no substrato colocado em frente à superfície alvo. O processo de ablação ocorre numa câmara de vácuo, em atmosfera controlada [19].

É uma técnica bastante útil na fabricação de micro-componentes, necessitando de impulsos de elevada frequência. As áreas são processadas através de espelhos galvanométricos ou pela movimentação da peça. É aplicada em polímeros. Os defeitos mais comuns surgem na libertação de partículas sólidas nas paredes do reactor que caem sobre os substratos [20].

### 2.8. Células Bacterianas e Biofilmes

Bactéria é um microorganismo unicelular, desprovida de núcleo. As bactérias são geralmente microscópicas. As bactérias habitualmente apresentam dimensões entre os 0,5 e os 5 μm e possuem tamanhos e formas variadas. A dimensão, mobilidade, existência de propriedades magnéticas e eléctricas, aderência, reprodução e fluorescência são exemplos de vantagens existentes na técnica de FCB comparando com a técnica de LP. Neste trabalho utilizou-se bactérias com potencial zeta positivo e negativo que é o indicador da carga eléctrica superficial que as células bacterianas adquirem quando estas são colocadas no meio mineral [35].

Tal como qualquer técnica de END, a técnica FCB tem limitações. O facto de as células bacterianas poderem ser afectadas pelo material em análise, é um exemplo de uma limitação que pode comprometer a utilização desta técnica.

Existem bactérias prejudiciais à saúde do ser humano, pois podem causar inúmeras doenças. Tuberculose, Escarlatina e Tracona [21] são exemplos de doenças causadas por bactérias. As bactérias utilizadas nestes ensaios não são patogénicas e o método não tem quaisquer riscos a esse nível.

Biofilmes são conjuntos de bactérias que se desenvolvem espontaneamente em qualquer superfície sólida em condições fisiológicas adequadas e à qual se ligam através de uma matriz. Cerca de 99% dos micro-organismos presentes na Terra vivem nestas comunidades microbianas [22]. Esta agregação de microorganismos tem grande importância em várias actividades humanas como a saúde e a indústria. As micro-colónias que constituem o biofilme são compostas por espécies únicas ou por um conjunto de diferentes tipos de espécies dependendo do meio a que elas se formam [23]. Biofilmes são a forma mais bem sucedida do mundo de colonialismo [22].

Diversas condições, como a superfície, a disponibilidade de nutrientes e a composição das bactérias afectam directamente a estrutura do biofilme. O seu desenvolvimento está representado na Figura 2.10.

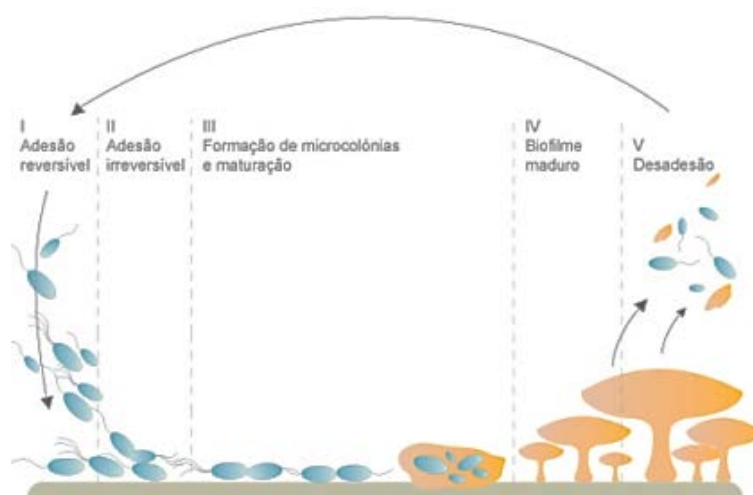


Figura 2.10 – Desenvolvimento de um biofilme bacteriano [24]

O desenvolvimento de um biofilme é constituído por várias etapas: a adesão inicial à superfície, numa primeira fase a adesão é reversível e em seguida torna-se irreversível, em seguida dá-se a formação de micro-colónias e sua maturação e crescimento. Na última fase da formação de um biofilme, as células dispersam-se e multiplicam-se levando a colonização em novas superfícies.

Neste trabalho, a formação de biofilmes não é pretendida, pois este fenómeno pertence ao domínio de adesão irreversível, comprometendo assim os resultados finais e o futuro uso da peça em estudo.

## **2.9. Biocorrosão**

A formação de biofilmes dá-se em todas as superfícies expostas a condições favoráveis ao seu desenvolvimento.

O ataque em metais é facilmente localizado através da presença de corrosão e formação de incrustações resultantes da actividade bacteriana [25]. A corrosão depende do grau de oxidação que um composto pode sofrer, assim materiais como o acrílico ou compostos cerâmicos geralmente não são afectados pelo fenómeno da biocorrosão.

Sendo os materiais cerâmicos, mais resistentes a altas temperaturas e ambientes agressivos comparando com metais, a biocorrosão é um fenómeno que só ocorre em casos extremos. Tais como os materiais cerâmicos, os plásticos não são propensos à biocorrosão.

A inibição do crescimento e/ou actividade metabólica dos microorganismos e a modificação do ambiente em que o processo de corrosão, são métodos que foram implementados de forma a prevenir a biocorrosão em materiais, de modo a evitar alterações nas suas propriedades [26].

Neste trabalho, este fenómeno tem de ser evitado, uma vez que materiais como o alumínio e o aço inoxidável podem sofrer com a sua acção. A maior preocupação durante os ensaios será a de não ultrapassar os 10 minutos, protegendo assim os componentes analisados de sofrerem danos irreversíveis. Este fenómeno pode comprometer a técnica de END, uma vez que os danos provocados serão constituídos como defeitos, comprometendo os futuros resultados.

## **2.10. Efeito Antibacteriano do Cobre**

O cobre tem sido alvo de inúmeras pesquisas, pelo que as suas vantagens e benefícios encontram-se bem documentados. Muito antes de determinados microrganismos terem sido identificados como a causa de infecções e doenças já os Romanos utilizavam o cobre para proteger e melhorar a saúde pública [27]. O cobre já era utilizado em canalizações, talheres, panelas, entres outras aplicações para melhorar a saúde pública [28].

Hoje em dia a utilização de cobre em instalações públicas, como hospitais, é crucial, pois impede a propagação de infecções. É importante que se utilize nas maçanetas das portas, bancas e noutros objectos frequentemente tocados em locais onde se presta assistência médica ou que se encontram abertos ao público em geral para evitar a propagação de doenças infecciosas [27].

Estudos recentes afirmam que o cobre é eficaz na morte das três estirpes mais comuns de MRSA no Reino Unido [28]. A acção antibacteriana do cobre tem recebido cada vez mais atenção na utilização do material em estabelecimentos de saúde e no processamento de alimentos [29]. Em contraste com o cobre, no aço inoxidável células poderão manter-se vivas durante 28 dias [29].

Assim, o cobre, como uma superfície antibacteriana desempenha um papel importante de ajuda no controle de bactérias responsáveis por infecções.

Esta acção antibacteriana pode comprometer os resultados deste trabalho, pois os ensaios não podem exceder um determinado tempo, pois as células serão mortas pelo cobre, não sendo possível detectar os defeitos pretendidos. É necessário estudar para cada bactéria o tempo máximo de ensaios no cobre.

## **2.11. Magnetotaxia**

O comportamento de organismos na presença de um campo magnético é basicamente descrito pela interacção dipolo magnético celular com o campo magnético externo, pode entender-se que o movimento é o comportamento destes microorganismos. Ao resultado da acção do campo magnético dá-se o nome de magnetotaxia (Figura 2.11) [30].

Estudos recentes têm mostrado que a interacção entre várias espécies animais com o campo magnético terrestre pode ser um importante factor de adaptação [30].

A interacção entre o campo geomagnético e um ser vivo é mais evidente no caso de uma grande gama de microorganismos encontrados em sedimentos do leito de rios, lagos e

lagoas. Nestes casos, o mecanismo que rege a interacção é conhecido e pode ser explicado através da interacção entre o momento magnético do organismo e o campo externo. De facto, várias bactérias são capazes de biomineralizar pequenos cristais de óxido magnético de ferro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) ou sulfeto magnético de ferro ( $\text{Fe}_3\text{S}_4$ ).

Esta característica é essencial para o sucesso deste trabalho, uma vez que é estritamente necessário as células tenham propriedades magnéticas para ser adequado o uso de equipamentos que produzam campos magnéticos. A produção de campos magnéticos acelerará o movimento das células sobre a superfície do material a analisar, permitindo que as mesmas se desloquem para os defeitos.

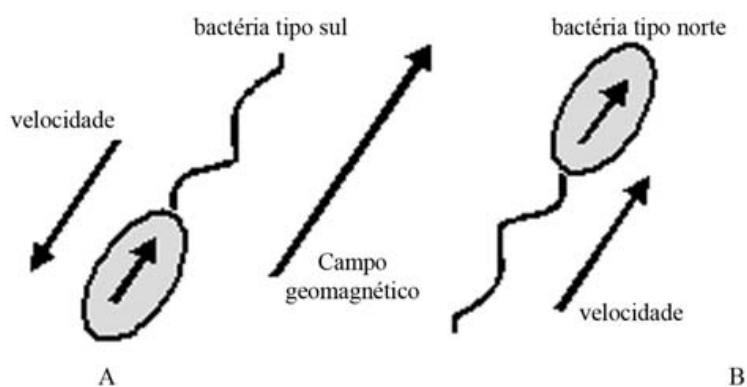


Figura 2.11 – Comportamento de bactérias na presença de um campo magnético [30]

## 2.12. Outros Trabalhos Desenvolvidos

Após uma extensa pesquisa sobre a utilização de bactérias na detecção de defeitos, verificou-se que os desenvolvimentos relacionados com este tópico são quase inexistentes. Encontrou-se publicado apenas um estudo da autoria de Siores et. al [31] onde mostra que bactérias podem ser utilizadas como ferramenta de diagnóstico na detecção de discontinuidades e concluiu que bactérias são capazes de orientarem-se conforme o campo magnético da Terra de Sul para Norte. Utilizando então a técnica por Partículas Magnéticas (PM), a presença de um defeito é descoberto através de uma distorção do fluxo magnético. Estas bactérias com propriedades magnéticas orientam-se em cadeias ao longo de um campo magnético.

Assim conclui-se que o uso de micro/nano partículas, possivelmente soluciona os problemas na detecção de defeitos de dimensões reduzidas.

João Borges [1] estudou a possibilidade de utilização da dimensão microscópica, da aderência, das propriedades de mobilidade e a da existência de propriedades eléctricas e magnéticas de células bacterianas, de forma a identificar, dimensionar e caracterizar defeitos existentes nos materiais analisados. Deste modo, teve como objectivo o desenvolvimento e

caracterização da fiabilidade de uma técnica inovadora de END baseada em suspensão de células bacterianas.

Foram realizados ensaios laboratoriais com e sem a utilização de campos eléctricos. Nos vários ensaios não se conseguiu obter a movimentação desejada por parte das bactérias, mas verificou-se que as bactérias aderem preferencialmente aos defeitos. Este comportamento possibilita, através de uma melhor escolha das mesmas, estudar e caracterizar defeitos padrão e definir o limiar de detectabilidade da técnica. Não foi possível definir um limiar de detecção inferior a 20,3  $\mu\text{m}$ .

Em virtude de falta de tempo para cumprir um dos objectivos, não foi realizada a avaliação experimental da inadequação das técnicas de END já existentes, na detecção de micro-defeitos superficiais em materiais de engenharia sujeitos a processos tecnológicos. No âmbito deste trabalho, analisaram-se componentes microfabricados pela técnica micro-pim.

Após o trabalho desenvolvido, concluiu-se que através de um estudo aprofundado e melhoramento desta técnica inovadora, existe um elevado potencial enquanto técnica de END para detecção de defeitos superficiais. Ficou por explorar a utilização de campos magnéticos e eléctricos nos ensaios e avaliar a sua influência na amplitude de movimento das bactérias.

O dispositivo da “Língua Electrónica” é utilizado no controle ambiental, controlando os níveis contaminação por metais pesados e pesticidas em rios, e no saneamento básico, controlando a qualidade da água nas estações de tratamento. Na indústria alimentar, o dispositivo pode aumentar o rigor do controlo de qualidade na fabricação de bebidas, por meio da monitorização contínuo. O dispositivo desenvolvido é mais sensível que a língua humana e o sensor permite com rapidez, precisão e simplicidade verificar a qualidade da água, a existência de contaminantes, pesticidas, substâncias húmicas e metais pesados. A Língua Electrónica é formada por um conjunto específico de plásticos que conduzem electricidade e que são sensíveis às substâncias responsáveis pelos diferentes tipos de paladar. Por enquanto, o equipamento (Figura 2.12) está apto para operar com vinhos, café, e água mineral, mas estão a desenvolver sensores específicos para análise de leite e sumos de frutas [2].



Figura 2.12 – Sensor gustativo para avaliação de líquidos [2]

Este dispositivo só actua em meio aquoso e executa precisamente o contrário do que se pretende com a realização deste trabalho, uma vez que este dispositivo é utilizado para detectar bactérias e neste trabalho pretende utilizar-se as bactérias para detectar micro-defeitos superficiais em diversos materiais não porosos.

O polímero desenvolvido por Investigadores da Universidade de Sheffield, na Grã-Bretanha, consiste em aplica-lo juntamente com um corante fluorescente sobre uma ferida iluminando-o em seguida com uma luz negra. O nível de brilho alcançado pelo polímero (Figura 2.13) indicará a gravidade da situação, sendo maior quanto maior for o número de bactérias presentes nos ferimentos. Actualmente determinar o nível de infecção bacteriana exige cultivar em laboratório partes recolhidas da ferida, o que leva vários dias para se obter o resultado. Com este novo polímero, esta verificação passará a ser possível em poucas horas.

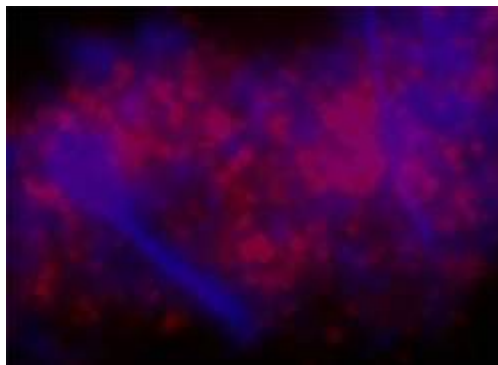


Figura 2.13 - Curativo a brilhar quando em contacto com bactérias [3]

Tal como o dispositivo da “Língua Electrónica” este polímero realiza o contrário do que se pretende com este trabalho, uma vez que o polímero foi criado para detectar bactérias em feridas e como já foi dito, neste trabalho pretende detectar-se micro-defeitos superficiais em diversos materiais.

### **3. Produção e Caracterização de defeitos para Validação Experimental**

#### **3.1. Introdução**

A necessidade de criar defeitos artificiais está relacionada com a validação experimental da técnica inovadora de END. O principal objectivo de João Borges [1] foi confirmar a preferência de alojamento das bactérias nos defeitos. Tendo esse objectivo sido cumprido, existe a agora a necessidade de observar o comportamento das bactérias em diversos tipos de defeitos e materiais, para determinar qual o menor tamanho que consegue-se detectar.

Como o objectivo é detectar discontinuidades superficiais em diferentes materiais alvo, é importante identificar as variáveis necessárias para o desenvolvimento desta técnica. O tipo de bactéria, o tempo de adesão das células, a morfologia dos defeitos, o material analisado e os parâmetros associados aos campos magnéticos e eléctricos são os factores necessários a ajustar para otimizar a metodologia desta técnica.

Em seguida apresentam-se as diferentes técnicas utilizadas para a produção de defeitos.

Numa primeira fase de aplicabilidade do novo END por SCB, a técnica será aplicada em defeitos padrão, para garantir a não aleatoriedade da dimensão e morfologia dos defeitos detectados. Assim é possível determinar o limiar de detectabilidade da técnica desenvolvida para cada material.

#### **3.2. Produção de Defeitos por Micro Indentação**

A produção de micro defeitos por indentação foi realizada por um micro-durómetro que através da variação de cargas e tempos de indentação diferentes produz defeitos artificiais de diferentes tamanhos. Usualmente um micro-durómetro é utilizado para medir a dureza dos materiais. Neste trabalho este aparelho foi utilizado para produzir diversos tipos de matrizes de defeitos, que combinem as posições dos diferentes tipos de defeitos de forma variada. É importante que defeitos com a mesma dimensão se encontrem em sítios diferentes da superfície do componente a analisar, pois em caso de não uniformidade da disposição das bactérias ou em virtude da dificuldade de obtenção de superfícies perfeitamente polidas, a fiabilidade da técnica pode ser posta em causa.

A produção de matrizes com defeitos é essencial para conferir fiabilidade e estudar o limiar de detectabilidade dos defeitos que esta técnica de END permite detectar, mas não só, é também importante observar o comportamento das bactérias em diversos tipos de defeitos e materiais.

Os defeitos foram produzidos em diferentes materiais para analisar o comportamento das bactérias nas diferentes superfícies. Os materiais utilizados foram o cobre, o aço inoxidável AISI 304L, Alumínio e Acrílico (Figura 3.1). Estes materiais têm características diferentes, por isso é importante fazer um breve estudo antes de proceder aos ensaios experimentais de modo a ser mais célere o processo de escolha dos parâmetros experimentais.

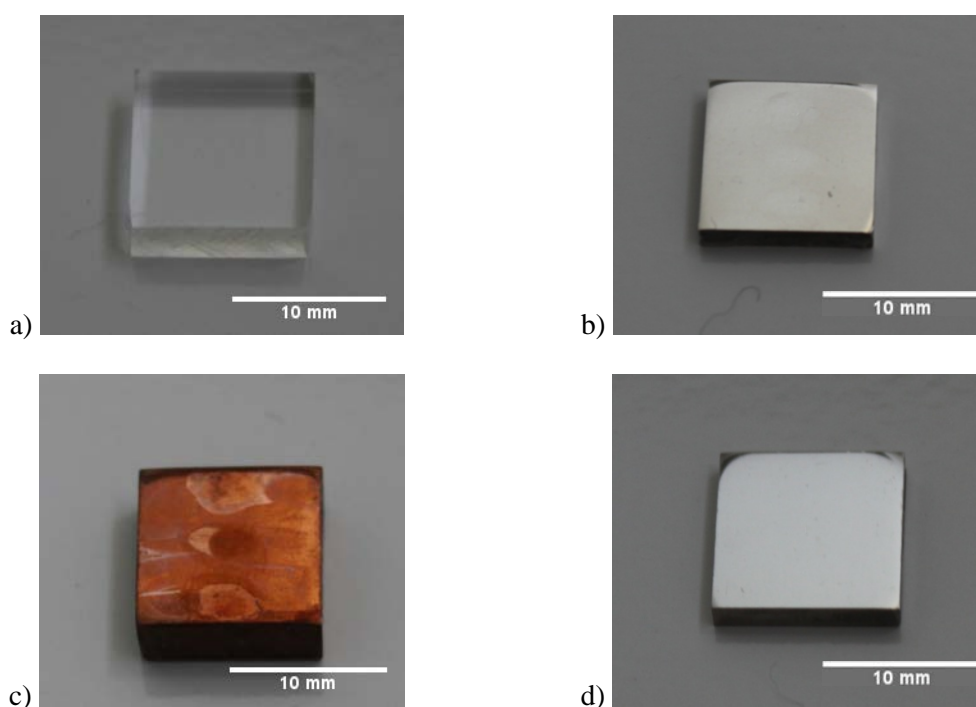


Figura 3.1 – Materiais utilizados na produção de defeitos: a) Acrílico, b) Alumínio, c) Cobre, d) Aço inoxidável AISI 304 L

O aço inoxidável utilizado em diversas aplicações, devido às suas vantagens técnicas tais como electrodomésticos, pequenos utensílios domésticos e na construção de edifícios e mobiliários. É utilizado nestas aplicações por ser um material resistente à corrosão e com grande resistência mecânica. Para utilização neste trabalho é importante referir que não é atraído nem repellido por ímanes.

As ligas de alumínio são ligas não ferrosas, e apresentam uma boa leveza, deformabilidade, resistência à corrosão e um custo relativamente baixo [32]. O alumínio é um metal abundante na crosta terrestre, possuindo reduzida densidade, boa ductilidade, boa condutividade térmica e eléctrica, não sendo atraído nem repellido por ímanes, nem é magnetizável.

O acrílico (PMMA) é um material termoplástico rígido, transparente e incolor, relativamente rígido e resistente, onde as suas vantagens são a sua baixa densidade, resistência à corrosão e a sua característica de isolante eléctrico. Outras propriedades que são bastantes úteis em diversas aplicações são a presença de brilho, boas propriedades térmicas, facilidade de pigmentação, facilidade de gravação e boa maleabilidade. Não pode ser sujeito a forças traccionárias e comparando com outros materiais tem uma temperatura de utilização baixa. Para aplicação nesta técnica inovadora a grande vantagem é o facto de não ser atraído nem repellido por ímanes nem ser um material magnetizável, assim não sofrerá qualquer tipo de acções provenientes dos campos eléctricos ou magnéticos provenientes dos equipamentos a serem utilizados nos ensaios experimentais.

O cobre é um material não-ferroso com pigmentação avermelhada e é utilizado há milhares de anos por diversas culturas. É extremamente resistente à corrosão. Este material é simultaneamente resistente e maleável contrariando as propriedades dos materiais do uso geral. Como já foi dito referido anteriormente o cobre é um material com propriedades antibacterianas, sendo então necessário adaptar os ensaios de modo a que os resultados possam ser observados antes da total eliminação das bactérias na superfície do cobre.

Esta escolha de materiais cobre uma larga gama de materiais de Engenharia, permitindo validar a metodologia em materiais com propriedades químicas e físicas diversas.

De modo a continuar o trabalho do João Borges [1] escolheu-se a matriz reduzida para produzir nos provetes., uma vez que é possível observar a matriz no microscópio na sua totalidade com as lentes existentes.

A distância entre cada indentação é igual a 300  $\mu\text{m}$  e é medida desde o seu centro. Existem 8 cargas de indentação diferentes no micro-durómetro, sendo então possível produzir 8 tamanhos diferentes de defeitos, onde cada indentação produzida tem uma duração de 10 segundos. Na Tabela 3.1 observa-se a carga que está associada a cada defeito. Para ser possível realizar três ensaios em simultâneo foram produzidas 3 matrizes de defeitos na superfície dos provetes, onde cada tem 8 tamanhos diferentes de defeitos e 12 no total. Cada matriz de defeitos tem a forma rectangular com 0,9 mm de largura e 0,6 mm de altura. A distância entre cada matriz é igual a 3 mm e estão centradas na superfície. Na Figura 3.2 representa-se a matriz de defeitos, distâncias em milímetros e posicionamento das matrizes na superfície dos materiais.

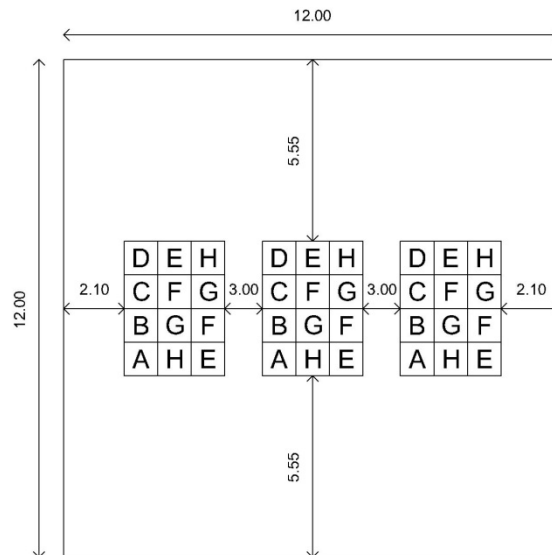


Figura 3.2 – Ilustração das matrizes de defeitos produzidas nos provetes

Poliu-se previamente a superfície das diferentes amostras, de modo a eliminar defeitos pré-existentes na superfície para que no final esteja presente somente a matriz de defeitos pretendida. Uma vez que é difícil garantir uma superfície perfeitamente polida, na matriz escolhida estão presentes tamanhos de indentações iguais em posições diferentes. Assim elimina-se uma possível influência do estado da superfície no comportamento nas bactérias.

Tabela 3.1 – Cargas utilizadas para a produção de indentações

Carga (Kg)	1	0,5	0,3	0,2	0,1	0,05	0,025	0,01
<b>Defeito</b>	A	B	C	D	E	F	G	H

Definida a matriz, produziu-se na superfície dos materiais a matriz.

Na Figura 3.3 está representada a matriz dos defeitos em acrílico, aço inox, alumínio e cobre.

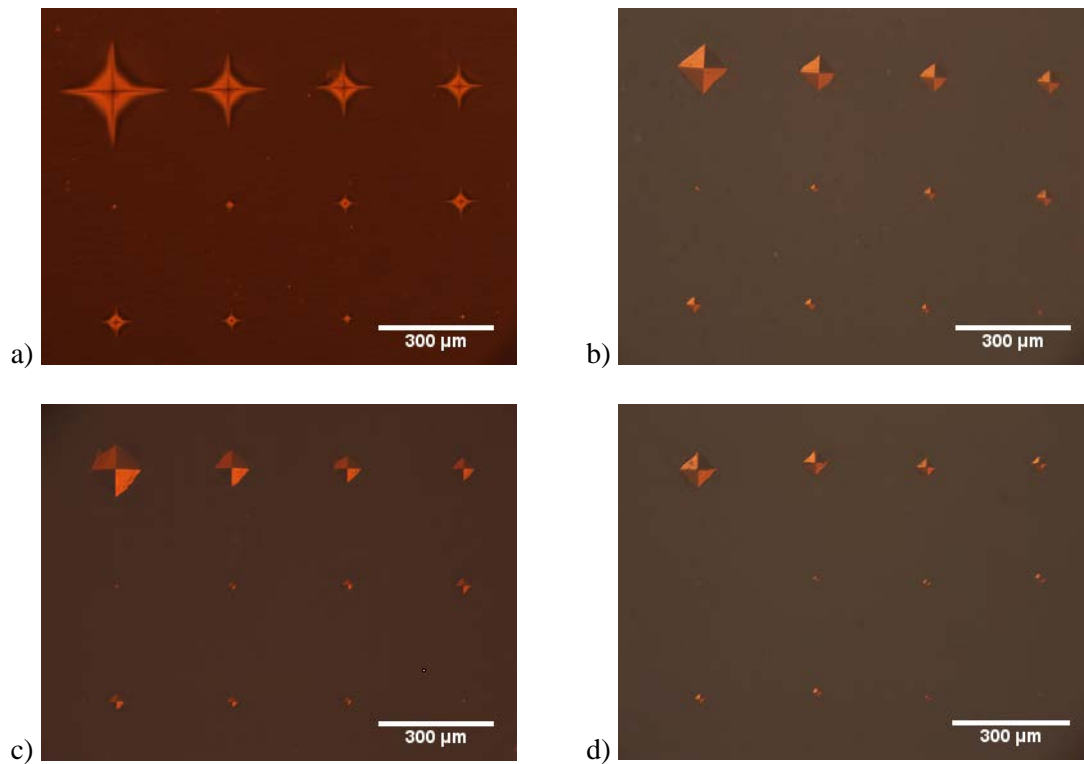


Figura 3.3 – Matriz reduzida produzida em: a) Acrílico, b) Alumínio, c) Cobre e d) Aço Inox 304 L

Apesar da carga de indentação ser a mesma, o tamanho dos defeitos nos diversos materiais são diferentes. Este fenómeno deve-se ao facto da dureza dos materiais ser diferente. Na Tabela 3.2 observa-se o tamanho médio de cada defeito obtido por micro-indentação.

Tabela 3.2 – Dimensão das diagonais de cada indentação

Dimensão de defeitos ( $\mu\text{m}$ )					
Tipo de defeito	Carga de Indentação (Kg)	Acrílico	Alumínio	Cobre	Aço Inox
A	1	282,1	132,3	139,6	98,2
B	0,5	201,2	92,5	96,7	68,9
C	0,3	162,7	71,9	72,9	52,3
D	0,2	133,1	58,5	62,1	43,1
E	0,1	93,7	41,4	42,6	31,3
F	0,05	65,1	30,5	30,34	22,3
G	0,025	45,3	22,6	21,9	17,9
H	0,01	27,5	12,5	12,7	9,6

### 3.3. Produção de Defeitos por Electroerosão

Electroerosão ou *Electrical Discharge Machining* (EDM) é um processo térmico de fabricação caracterizado pela remoção de material através de descargas eléctricas que ocorrem entre um eléctrodo e uma peça, através de um líquido dieléctrico.

A peça é submersa num líquido, onde não existe força de corte, uma vez que não há contacto entre a ferramenta e a peça não formando as tensões comuns dos processos convencionais de maquinagem. Para que este processo de remoção de material seja utilizado, os materiais envolvidos têm de ser bons condutores de electricidade. Na Figura 3.4 observa-se um esquema de equipamento utilizado em electroerosão.

No alumínio, produziu-se texturas com tamanhos pré-definidos. O tamanho do defeito produzido varia com o tamanho do eléctrodo utilizado no processo. Variando os parâmetros do

processo (diferença de potencial entre o eléctrodo e a peça, corrente de descarga e tempo de descarga) consegue produzir-se texturas com diferentes níveis de rugosidade.

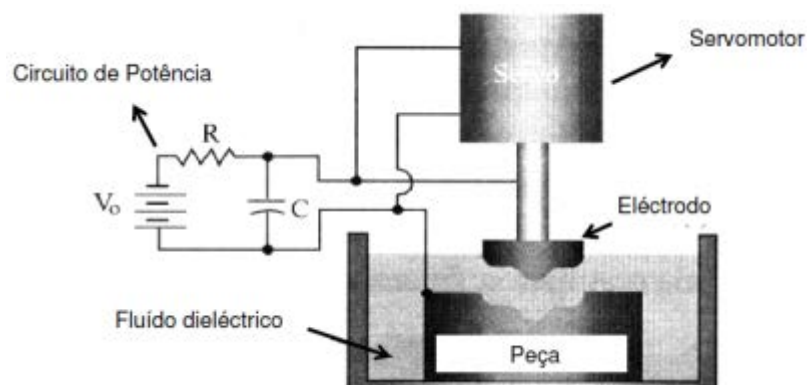


Figura 3.4 – Esquema de equipamento utilizado em Electroerosão [33]

De modo a estudar os diferentes comportamentos das bactérias produziu-se uma matriz de 4 texturas circulares, uma vez que o punção em cobre tem a forma cilíndrica com 3 mm de diâmetro. De seguida, procedeu-se à caracterização das texturas através de um rugosímetro Mitutoyo SurfTest 301 disponível no Laboratório de Tecnologia Industrial LTI do DEMI da Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa. A medição da rugosidade das superfícies é importante para estudar o comportamento das bactérias nos diferentes níveis para definir o limiar de detectabilidade de defeitos em diferentes níveis de acabamento superficial, para num trabalho futuro direccionar o desenvolvimento desta técnica inovadora, isto é, perceber em que níveis de rugosidades é possível aplicar a técnica. Na Figura 3.5 observam-se as texturas produzidas, os valores da rugosidade média de cada textura e o punção de cobre utilizado.

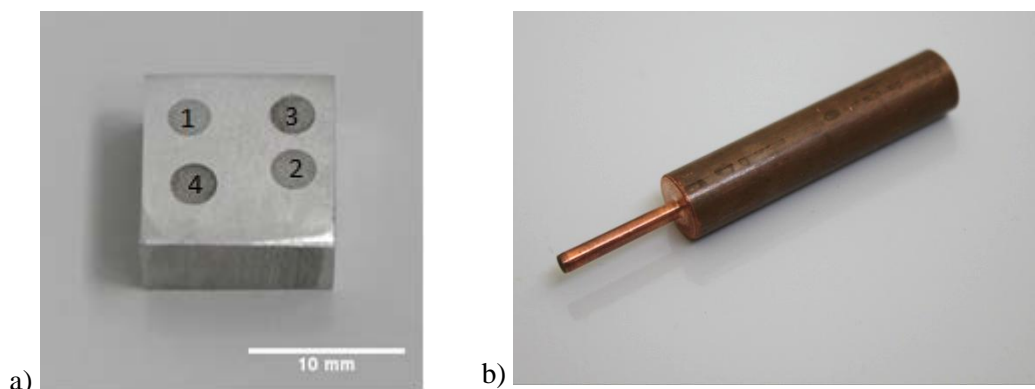


Figura 3.5 – a) Diferentes Texturas produzidas no provete de Alumínio ( $Ra_1=1,61 \mu\text{m}$ ,  $Ra_2=1,63 \mu\text{m}$ ,  $Ra_3=1,83 \mu\text{m}$ ,  $Ra_4= 2,85 \mu\text{m}$ ), b) Punção de cobre utilizado para produzir diferentes texturas

### 3.4. Criação de defeitos através de lixas

O uso de lixas com diferentes granulometrias é bastante importante no sentido de estudar a capacidade das bactérias em alojarem-se nos diferentes sulcos produzidos. Uma lixa com maior granulometria irá produzir sulcos maiores. Deste modo, produziu-se um provete de alumínio como exemplifica-se na Figura 3.6.

O provete foi produzido polindo as diferentes filas da superfície com diferentes granulometrias de lixas.

Maquinou-se quatro provetes de secção quadrada com 12 mm de lado. Comprimindo os quatro provetes com um material de sacrifício poliu-se todas as superfícies com a lixa de maior granulometria (P80), ficando as superfícies a analisar todas alinhadas entre sim. De seguida destacou-se uma amostra e repetiu-se o mesmo processo com a lixa P240. Repetiu-se o processo até à última amostra, onde se utilizou a lixa P600 e a P2400 no último provete. A cada designação de lixa corresponde a diferentes diâmetros médios das partículas dos materiais abrasivos incorporados nas lixas. A lixa P80 tem um diâmetro médio de  $201 \mu\text{m}$ , a P240 de  $58,5 \mu\text{m}$ , a P600 de  $25,8 \mu\text{m}$  e a P2500 tem de  $8,4 \mu\text{m}$ . Quanto menor for este diâmetro menores serão os sulcos produzidos na superfície do material pelas lixas. Após os diferentes polimentos estarem completos, juntou-se os quatro provetes de modo a obter um provete final com quatro filas com quatro rugosidades superficiais diferentes. Deste modo obteve-se um conjunto de provetes como se representa na Figura 3.6.

Aplicando a técnica das amostras produzidas, estudou-se a adesão de diferentes tipos de bactérias em diferentes níveis de rugosidades.

Diferentes níveis de rugosidades não são defeitos. Assim com este processo pretende estudar-se o limiar de rugosidades a que as bactérias aderem, evitando a ocorrência de erros na aplicação da técnica END, não confundido rugosidade com defeitos nas peças.

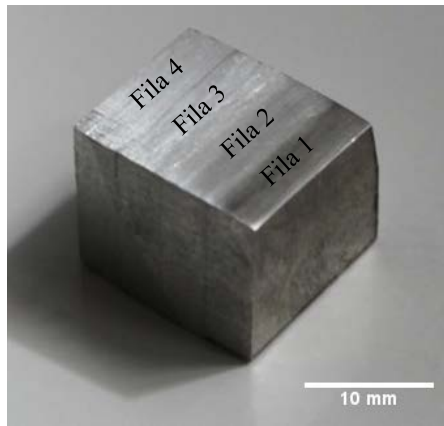
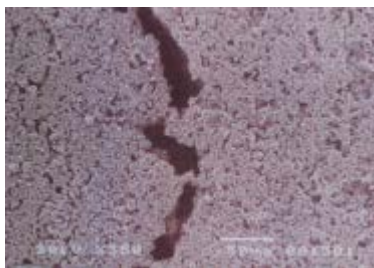


Figura 3.6 – Componente com diferentes superfícies lixadas ( $Ra_{\text{fila1}}=0,13 \mu\text{m}$ ,  $Ra_{\text{fila2}}=0,23 \mu\text{m}$ ,  $Ra_{\text{fila3}}=0,47 \mu\text{m}$ ,  $Ra_{\text{fila4}}=0,80 \mu\text{m}$ )

### 3.5. Componentes Microfabricados com Defeitos Caracterizados

Para garantir a fiabilidade desta técnica é importante aplicá-la em componentes com defeitos reais. O Centro de Engenharia Mecânica da Universidade de Coimbra forneceu microcomponentes utilizados na medicina dentária produzidos pela técnica micro-PIM já com defeitos devidamente identificados e caracterizados.

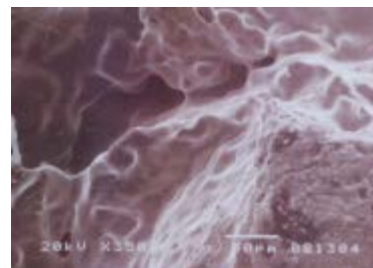
É importante realçar que os defeitos existentes foram produzidos durante o seu processo de fabricação, mas é importante não excluir os defeitos existentes nos moldes. Assim que numa etapa seguinte será essencial aplicar a técnica de END nos diversos moldes alargando a aplicabilidade da mesma. Na Figura 3.7 observa-se a caracterização dos defeitos existentes nas diferentes amostras.



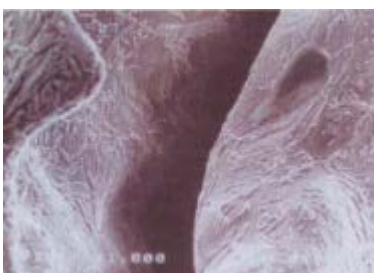
Amostra 38  
Após o ciclo térmico de *debinding*  
Defeito - Fissura



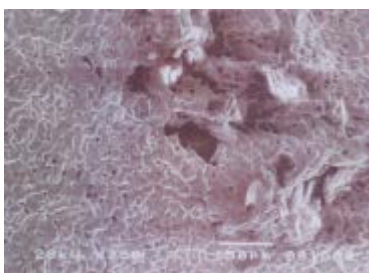
Amostra 1A (fila B)  
Sinterizada  
Defeito - Poros



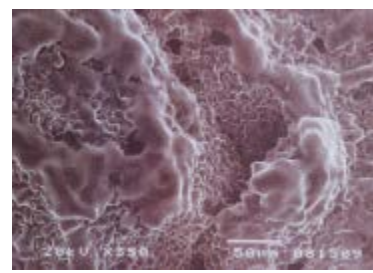
Amostra 7A (fila B)  
Sinterizada  
Defeito - Fissura



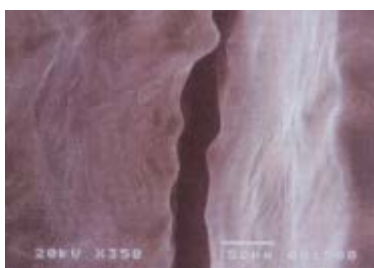
Gito (fila B)  
Sinterizada  
Defeito - Fissura



Amostra 1A (fila C)  
Sinterizada  
Defeito - Poros



Amostra 28A  
Sinterizada  
Defeitos – Poros e fissuras



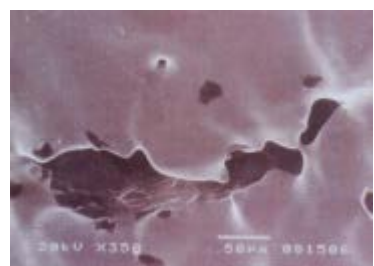
Gito 7  
Sinterizado  
Defeito - Fissura



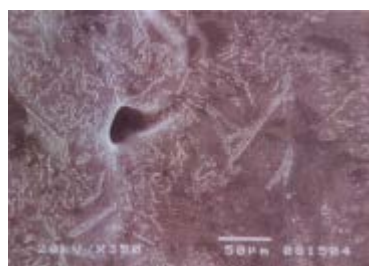
Gito 10  
Sinterizado  
Defeito - Poro



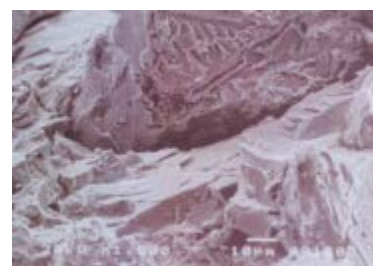
Gito 10  
Sinterizado  
Defeito - Fissura



Gito 16  
Sinterizado  
Defeito - Fissura



Gito 26  
Sinterizado  
Defeito - Poro



Gito 26  
Sinterizado  
Defeito - Fissura

Figura 3.7 – Caracterização dos defeitos fornecidos da Universidade de Coimbra

Na Figura 3.8 estão representados todos os componentes microfabricados fornecidos pelo Centro de Engenharia Mecânica da Universidade de Coimbra.



Figura 3.8 – Componentes microfabricados



## 4. Bactérias e Equipamento Utilizado para Validação Experimental

### 4.1. Introdução

Neste capítulo será descrito de uma forma breve as bactérias aplicadas nos ensaios laboratoriais da técnica END por SCB, o equipamento elaborado no âmbito da tese de Mestrado de Bruno Mateus [34] a ser utilizado nos ensaios e o equipamento utilizado para avaliar experimentalmente a técnica de END por LP.

Nos ensaios da técnica de END por SCB utilizaram-se equipamentos com o intuito de promover o movimento de bactérias com propriedades magnéticas e eléctricas. Foi também usado um dispositivo que incorpora uma luz ultravioleta de comprimento de onda germicida para ser utilizada na etapa de remoção de excesso de fluido bacteriano.

### 4.2. Caracterização das Bactérias Utilizadas

De modo a que a utilização dos equipamentos nos ensaios tenha sucesso é imprescindível que as bactérias escolhidas tenham propriedades adaptadas às especificidades dos ensaios.

Para os equipamentos dedicados à aplicação de campos eléctricos utilizou-se a bactéria a *Rhodococcus erythropolis* DCL14. Devido às condições de crescimento, a bactéria apresentou dimensões na ordem dos 0,92  $\mu\text{m}$ , sendo possível detectar menores defeitos que os detectados anteriormente por João Borges [1]. Consoante a sua fonte de carbono, etanol ou *n*-Hexadecano, as células apresentam carga negativa ou positiva respectivamente [35].

Para os equipamentos dedicados à aplicação de campos magnéticos utilizaram-se as bactérias *Staphylococcus aureus* e a *Staphylococcus hominis* com dimensões de 1.24  $\mu\text{m}$  e 0,57  $\mu\text{m}$  respectivamente. Estas bactérias foram recolhidas isoladas de amostras recolhidas em telemóveis dos alunos e investigadores do Centro de Engenharia Biológica e Química do Instituto Superior Técnico. Foram seleccionadas por apresentarem propriedades magnéticas superiores às restantes bactérias isoladas. A sua identificação foi feita por perfil de ácidos gordos, usando o sistema “Sherlock<sup>®</sup> Microbial Identification System (MIS)” da MIDI, Inc. (E.U.A.).

Na Tabela 4.1 apresentam-se as propriedades das bactérias utilizadas nos diversos ensaios.

Tabela 4.1 – Propriedades das bactérias utilizadas nos ensaios laboratoriais

Nome	Gram	Dimensão (µm)	Morfologia	Prop. Eléctricas/ Magnéticas	Condições de sobrevivência	Temp. Ideal	Tensão superficial do meio (mN/m)	Fonte de Carbono
<i>R.erythropolis</i>	Positiva	0,92	Coccus	Eléctricas	24 °C-35 °C	28°C	22 (crescida em hexadecano)	Etanol ou Hexadecano
<i>S. aureus</i>	Positiva	1,24	Coccus	Magnéticas	8-45°C	35-37°C	n.d.	Glucose
<i>S. hominis</i>	Positiva	0,57	Coccus	Magnéticas	20-45°C	28-37°C	n.d.	Glucose

### 4.3. Descrição do Equipamento Utilizado

#### 4.3.1. Dispositivo com Quatro Solenóides Horizontais para Microscópio

A finalidade desta mesa é a possibilidade de conseguir observar-se em tempo real o comportamento das bactérias ao microscópio quando em contacto com um campo magnético. Sendo assim, Bruno Mateus [34] produziu esta mesa (Figura 4.1) onde existem 4 solenóides dispostos ortogonalmente. Uma vez que o espaço disponível no microscópio para adaptar qualquer tipo de equipamento é reduzida, os solenóides utilizados são de pequenas dimensões, logo o campo magnético produzido não foi suficientemente forte para se obter movimento por parte das células. Os solenóides podem estar os 4 ligados simultaneamente, como também é possível escolher a combinação de solenóides activados pretendida.

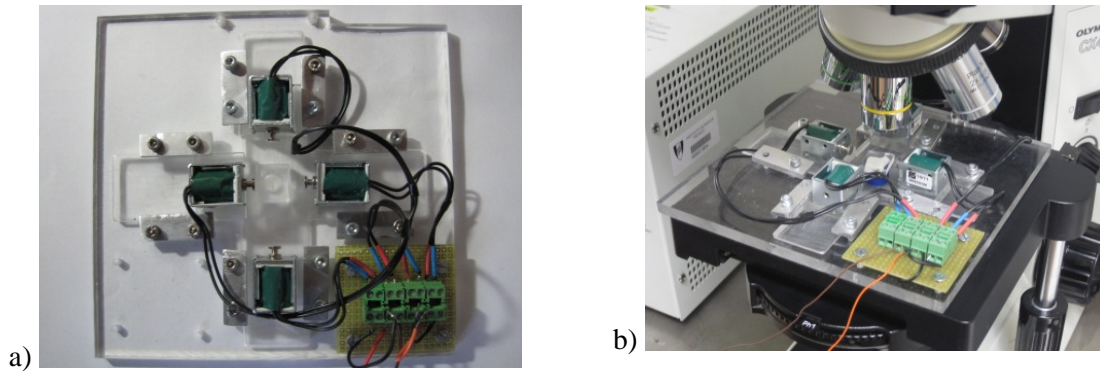


Figura 4.1 – Mesa com 4 solenóides: a) vista de topo, b) acoplado no microscópio

#### 4.3.2. Dispositivo com Rotação de Campo Magnético para Microscópio

Este equipamento foi produzido para induzir campos magnéticos em várias direcções de modo a criar movimento e pode observar-se na Figura 4.2. A abertura do estator é suficiente para colocar a lente do microscópio e assim observar em tempo real o comportamento das células com propriedades magnéticas.

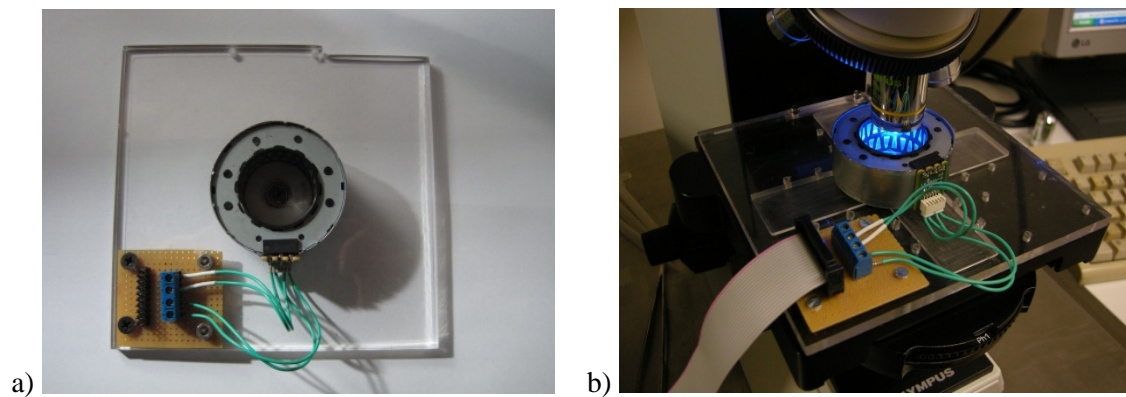


Figura 4.2 – Mesa com estator de motor passo-a-passo: a) vista de topo, b) acoplada no microscópio

#### 4.3.4. Solenóide Vertical

Com o objectivo de criar campos magnéticos na vertical, criou-se um pequeno solenóide móvel (Figura 4.3). Este solenóide foi criado no Laboratório de Tecnologia Industrial LTI do DEMI da Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, em que enrolou-se fio de cobre em onze espiras em torno de uma peça de aço.

Tirando proveito da sua pequena dimensão, foi possível acoplar o dispositivo na base do microscópio e observar as células sujeitas ao campo magnético vertical.

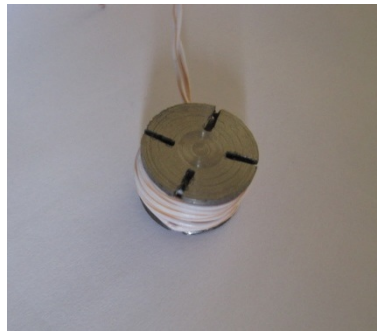


Figura 4.3 – Solenóide Vertical

#### 4.3.5. Dispositivo Automatizado para Campo Magnético Horizontal e Vertical

Com o intuito de produzir campos magnéticos em duas direcções distintas, de forma a produzir um maior efeito sobre as bactérias, foi produzida uma mesa com um solenóide que gera linhas de campo verticais e outro para criar um campo horizontal. Com o auxílio de um pequeno motor é possível movimentar de forma automatizada a amostra a analisar entre os 2 solenóides.

Com o equipamento representado na Figura 4.4 analisou-se as amostras com defeitos, sendo possível a escolha de diversos parâmetros, tais como, a frequência, tempo de excitação de cada solenóide e o número de ciclos desejado.

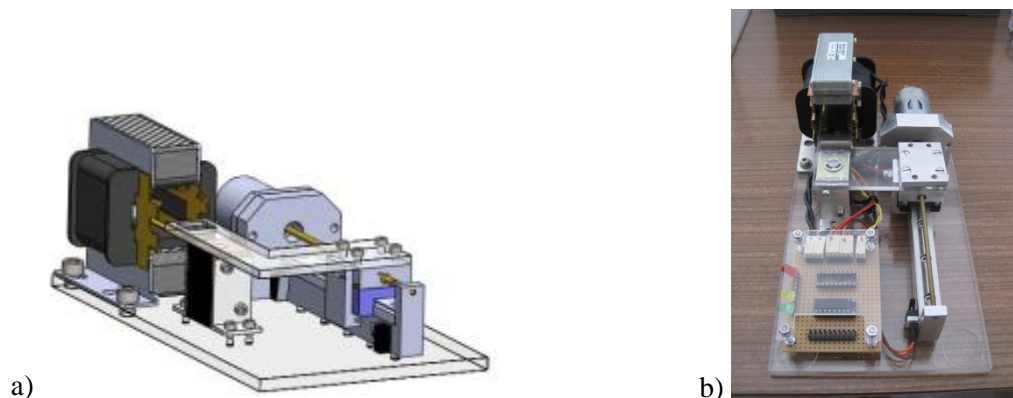


Figura 4.4 – Mesa com solenóide vertical e horizontal: a) Modelo no Solidworks, b) Dispositivo

#### 4.3.6. Dispositivo Automatizado com Rotação de Campo Magnético no Plano Horizontal e Vertical

Este equipamento consiste numa mesa com 2 estatores de um motor passo-a-passo, que permite a aplicação de campos magnéticos em variadas direcções. Um estator está colocado sobre a base do dispositivo, logo a excitação a diferentes direcções é feita no plano horizontal. O outro estator está colocado no plano vertical. Com as diferentes direcções de campos magnéticos produzidos, pretende conseguir-se uma maior mobilidade das bactérias.

Como se observa na Figura 4.5 com o auxílio de um motor e de uma estrutura ligada a um motor, é possível movimentar a amostra para o estator na horizontal ou na vertical. Como acontece no equipamento descrito em 4.3.4, é possível escolher os parâmetros dos ensaios, tais como, frequência, tempo em cada estator e número de ciclos.

Com este equipamento, a excitação das bactérias é maior uma vez que a direcção do campo magnético aplicado é variada.

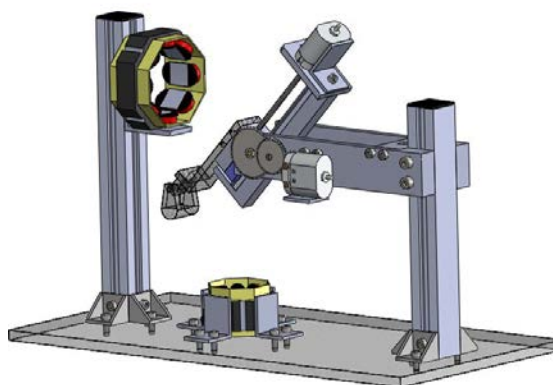


Figura 4.5 – Representação no *Solidworks* da mesa com dois estatores

#### 4.3.7. Dispositivo para Aplicação de Campo Eléctrico

Ao contrário dos equipamentos previamente descritos, este utilizado-se nas bactérias com propriedades favoráveis à utilização de campos eléctricos. Este equipamento permite aplicar campos eléctricos em direcções perpendiculares, horizontal e vertical, promovendo maior movimento às bactérias com propriedades favoráveis à utilização deste equipamento.

O dispositivo (Figura 4.6) é automatizado, sendo possível movimentar a amostra a analisar entre os dois pares de placas paralelas responsáveis pela aplicação dos campos eléctricos e escolher os parâmetros dos ensaios, o número de ciclos, o tempo de ensaio e a tensão.

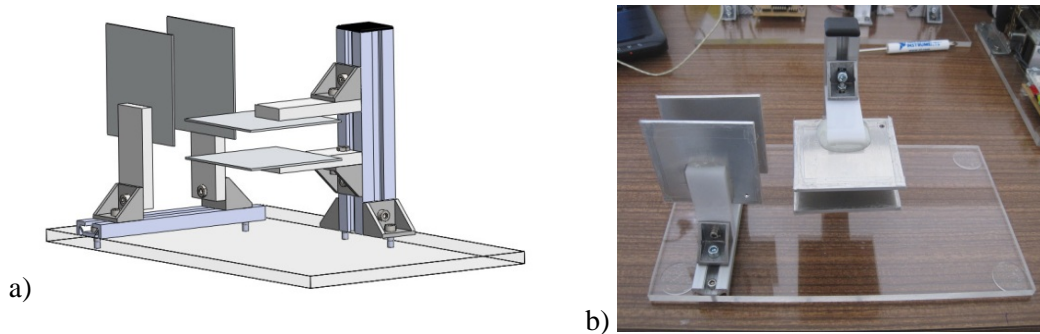


Figura 4.6 – Dispositivo para aplicação de Campo Eléctrico: a) Modelo no Solidworks, b) Dispositivo

O equipamento produzido por João Borges [1] foi utilizado para observar em tempo real o comportamento das bactérias com propriedades favoráveis à aplicação de campos eléctricos.

Este equipamento (Figura 4.7) consiste numa pequena base onde estão acopladas duas placas metálicas paralelas. Este dispositivo não é automatizado, mas é possível controlar manualmente a distância entre as placas. Os parâmetros variáveis foram o tempo de ensaio e a tensão escolhida. Devido às suas pequenas dimensões é possível acoplá-lo no microscópio para observar em tempo real o movimento das células.

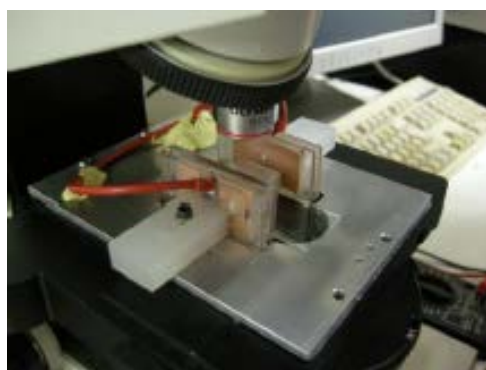


Figura 4.7 – Dispositivo para aplicação de Campo Eléctrico para acoplar no microscópio

#### 4.3.8. Equipamento para Eliminação do Excesso de Suspensão Bacteriana

Com o intuito de melhorar a etapa de remoção do excesso de suspensão bacteriana, teve-se necessidade de criar um dispositivo onde fosse possível acoplar uma lâmpada ultravioleta com comprimento de onda germicida de modo a eliminar o excesso de células existentes na superfície do material a analisar.

A lâmpada (Figura 4.8) tem um comprimento de onda entre 200 e 275 nm, que é o necessário para matar células bacterianas. De modo a aliar a maneabilidade com a potência da lâmpada escolheu-se a lâmpada da marca Osram HNS 8 W G5, pois é uma lâmpada de pequenas dimensões com as características necessárias para a aplicação pretendida.



Figura 4.8 – Lâmpada Osram HNS 8 W G5

Como as amostras a analisar são de dimensões reduzidas, foi necessário produzir um dispositivo onde fosse possível acoplar a lâmpada de modo a ser possível variar o ângulo de incidência da luz, altura relativa a amostra e confinar o feixe de luz emitido pela lâmpada. Assim, através destes parâmetros juntamente com o tempo de incidência é possível ter a precisão necessária para eliminar as bactérias da superfície do material sem interferir com as células existentes no interior dos defeitos.

Na Figura 4.9 apresenta-se o dispositivo final com a lâmpada acoplada.

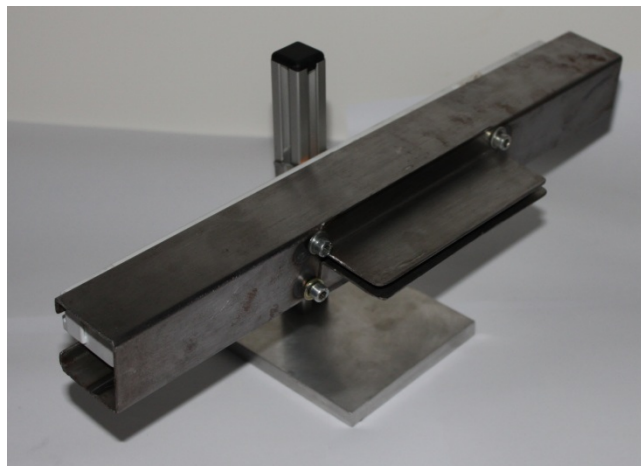


Figura 4.9 - Equipamento para aplicação de luz UV

#### 4.3.9. Equipamento Dedicado à Avaliação Experimental da Técnica END por LP

Para avaliar experimentalmente utilizaram-se produtos adequados à detecção de defeitos através da técnica de END por LP a utilizar nas diferentes etapas existentes na metodologia teste desta técnica que já foram apresentadas no subcapítulo 2.3.

Para a etapa da limpeza foi utilizado o *spray* de Líquido de limpeza (KD-PR1) que é um solvente. Este *spray* é utilizado para assegurar que a superfície a analisar está livre de óleos, areias e outras impurezas. Deste modo garante-se que os defeitos estão abertos à superfície. É extremamente importante secar a peça após a utilização do *spray* para este não interferir com a aplicação do penetrante na etapa seguinte.

Na Tabela 4.2 apresentam-se as propriedades do produto de limpeza.

Tabela 4.2 – Propriedades *spray* de limpeza KD-PR 1 [36]

Densidade a 20 °C (DIN 51 757)	0,7708 g/cm <sup>3</sup>
Ingredientes corrosivos (DIN EN ISO 3452)	Halogénio (F + Cl): 8 ppm Enxofre: 9ppm
Prazo de validade	Mínimo 3 anos (a temperatura ambiente)

Para a etapa de aplicação do penetrante, utilizou-se um fluorescente (KD FWP-1). O penetrante na forma de *spray* é aplicado na superfície limpa e seca, sendo necessário 5 a 10 minutos de tempo de penetração.

Na Tabela 4.3 apresentam-se as propriedades do *spray* penetrante.

Tabela 4.3 – Propriedades do Líquido Penetrante KD FWP-1 [36]

Sensibilidade (DIN EN ISSO 3452)	2 (alta)
Sensibilidade (DIN 54 152)	4 (muito elevada)
Tolerância a água (DIN EN ISSO 3452)	11%
Viscosidade a 20 °C (EN ISSO 3104)	6,3 mm <sup>2</sup> /s
Ingredientes corrosivos	Halogénio (F + CL): 4 ppm
	Enxofre: 1 ppm
Prazo de validade	Mínimo 3 anos a temperatura ambiente

Para a etapa de remoção do excesso do líquido penetrante, utilizou-se o mesmo produto da etapa de limpeza prévia da peça.

Utilizou-se o *spray* KD-SD1 como revelador. O revelador (Tabela 4.4) é aplicado na superfície seca a uma distância de 20 mm de um modo a que fique um fundo branco produzido na superfície. Uma aplicação em excesso do revelador pode esconder os defeitos, sendo impossível a sua detecção. Após um tempo de espera entre 5 a 10 minutos os defeitos começam a ser revelados.

Tabela 4.4 – Propriedades do Spray Revelador (KD-SD1) [36]

Densidade (DIN 51 757)	0,7853 g/cm <sup>3</sup>
Ingredientes corrosivos (DIN EN ISO 3452)	Halogénio (F + Cl): 40 ppm
	Enxofre: 40 ppm
Prazo de validade	Mínimo 3 anos (a temperatura ambiente)

Para a etapa de revelação utilizou-se uma pequena lanterna com leds de luz negra, para auxiliar na detecção de defeitos.

Na Figura 4.10 observam-se os equipamentos utilizados nos ensaios.



Figura 4.10 – Equipamentos utilizados nos ensaios da técnica de END por LP

## **5. Ensaaios Laboratoriais**

### **5.1. Introdução**

Neste capítulo descrevem-se os ensaios realizados para avaliar experimentalmente a técnica de END por LP e os seus resultados. São também apresentados os ensaios realizados, resultados e conclusões da nova técnica de END baseado em FCB.

### **5.2. Avaliação Experimental da Técnica de END por LP**

A realização destes ensaios tem como objectivo avaliar experimentalmente a inadequação da técnica de END por LP. Para tal aplicou-se a metodologia teste descrita no subcapítulo 2.3 sobre os provetes com defeitos produzidos pelo micro-durómetro.

Os ensaios realizaram-se baseados no critério de máxima sensibilidade, de forma a detectar o menor tamanho de defeitos possível. Para tal definiu-se um tempo de penetração do *spray* fluorescente e do revelador de 15 minutos. Com a ajuda do Eng. Daniel Leitão, técnico de Líquidos Penetrantes nível 1 do ISQ, procedeu-se à realização dos ensaios.

Uma vez que defeitos produzidos no micro-durómetro têm pouca profundidade, para evitar que na etapa de remoção do excesso do penetrante este fosse removido das cavidades, utilizou-se, juntamente com o *spray* de limpeza, um papel absorvente.

Na Figura 5.1 observa-se a metodologia teste aplicada.

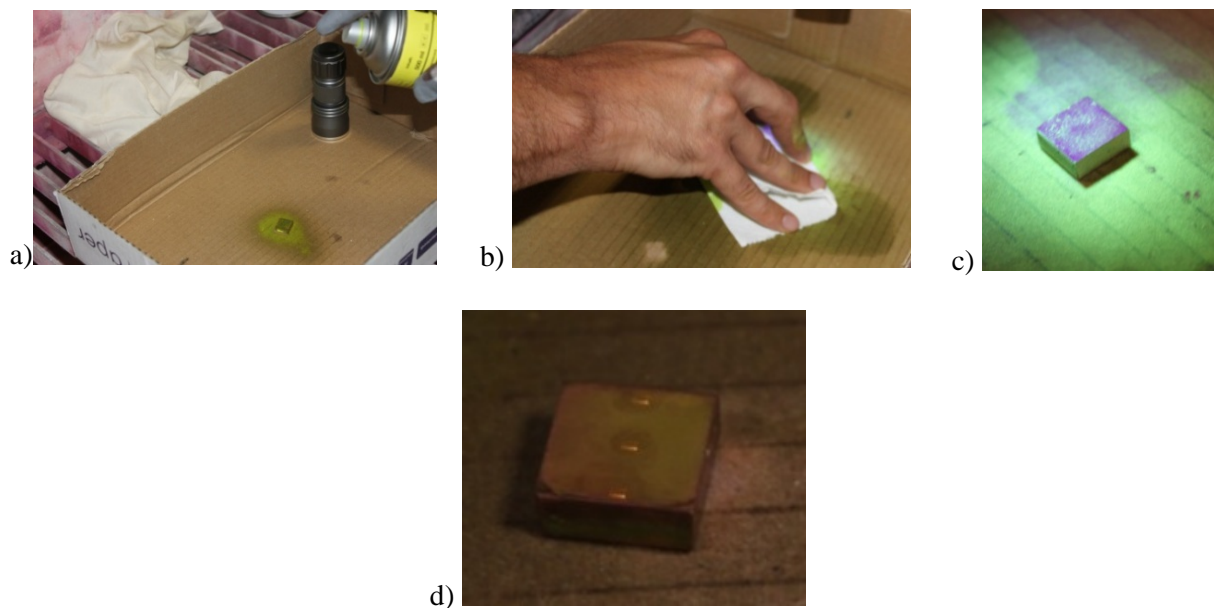


Figura 5.1 – Metodologia teste aplicada na amostra de cobre: a) Aplicação do *spray* penetrante, b) Remoção do excesso do *spray* penetrante, c) Aplicação do *spray* revelador, d) Revelação dos defeitos

Na Figura 5.1 observa-se que os defeitos detectados correspondem à primeira linha de cada matriz, ou seja, corresponde aos defeitos de maior tamanho. Assim, o limiar de detectabilidade alcançado utilizando a técnica de END por LP no provete de cobre com as matrizes de defeitos foi igual a 62.1  $\mu\text{m}$ .

## 5.4. Efeito do Campo Magnético no Movimento das Células

Como foi referido no subcapítulo 4.3, o equipamento com 4 solenóides horizontais não provocou quaisquer movimentos às bactérias. Portanto, para observar o movimento das células sujeitas a campos magnéticos, utilizou-se o dispositivo com rotação de campo magnético descrito em 4.3.2 (Figura 5.2).

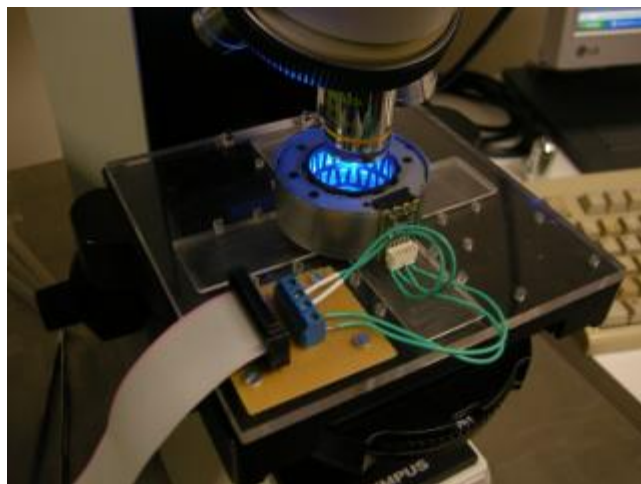
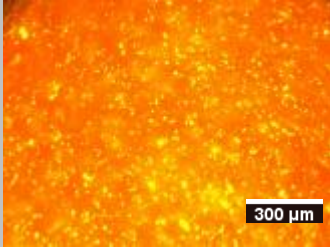
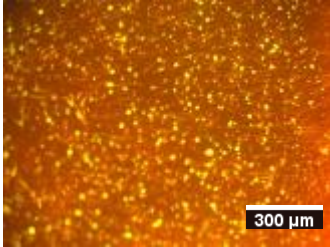
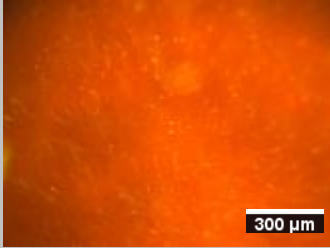
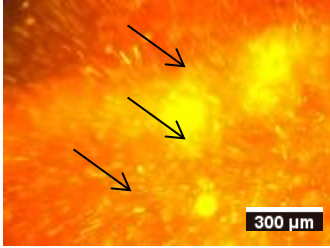
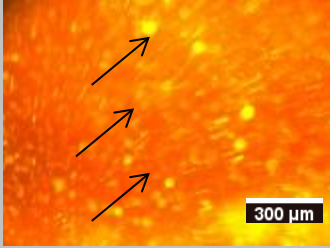


Figura 5.2 – Dispositivo com rotação de campo magnético

No dispositivo colocou-se uma lamela com uma gota da bactéria *Staphylococcus aureus* e excitou-se o estator a diferentes frequências. Com o aumento gradual da frequência dos campos magnéticos, observou-se que o movimento das bactérias era tanto maior quanto maior fosse a frequência escolhida, como pode observar-se na Tabela 5.1. Devido ao efeito de Joule, o estator a frequências superiores a 40 Hz aquecia de tal modo que secava a suspensão bacteriana, sendo impossível observar a amplitude de movimento das bactérias a frequências superiores.

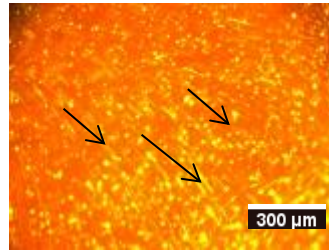
Na Tabela 5.1 observa-se o rasto das células sobre o efeito dos campos magnéticos produzidos pelo dispositivo. As imagens foram captadas com 10 segundos de tempo exposição e ampliação 150 vezes.

Tabela 5.1 – Rasto das células de *Staphylococcus aureus* sobre o efeito do campo magnético proveniente do estator com um tempo de exposição de 10 segundos e 150x de ampliação

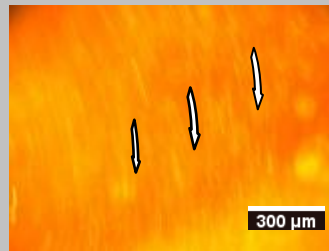
Frequência (Hz)	Imagem do Rasto
0	
0,5	
1	
5	
10	

---

20



40



Para observar o movimento das células *Staphylococcus hominis* utilizou-se o solenóide vertical e procedeu-se do mesmo modo que anteriormente. Neste equipamento foi possível observar o movimento das células a frequências até 100 Hz sem que a gota secasse.

Na Figura 5.3 e na Figura 5.4 estão representadas as amplitudes médias do movimento das células *S. aureus* e *S.hominis* sujeitas aos campos magnéticos.

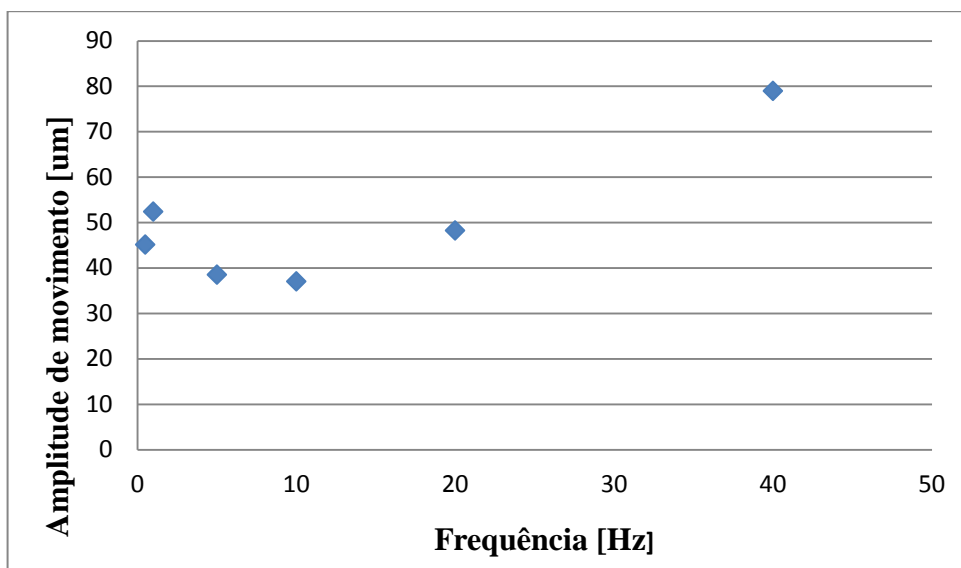


Figura 5.3 – Amplitude média do movimento das células de *S. aureus* sujeitas a campos magnéticos

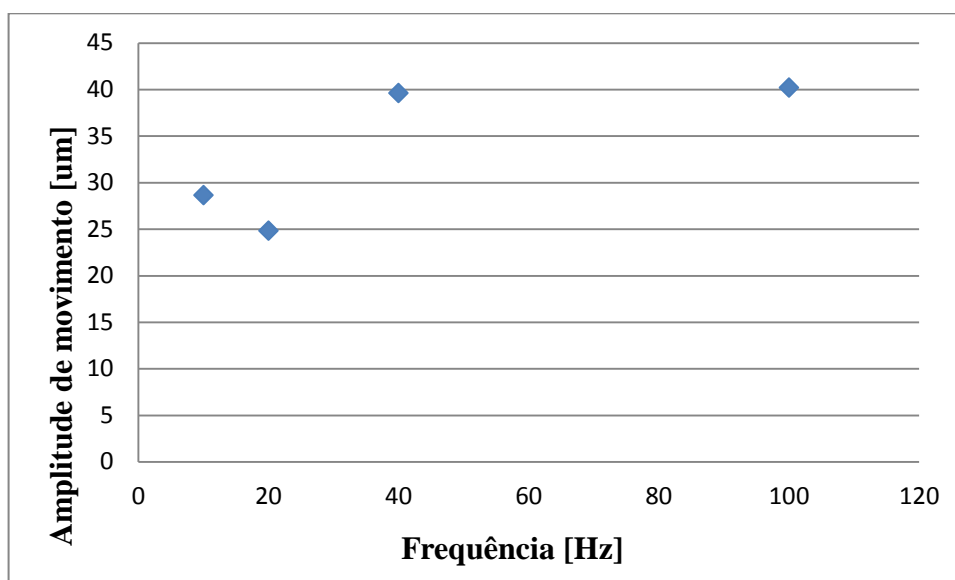


Figura 5.4 – Amplitude média de movimento das células de *S. hominis* sujeitas a campos magnéticos

Da análise gráfica percebe-se que a amplitude de movimento de ambas as células sujeitas a campos magnéticos com frequências inferiores ou iguais a 10 Hz é superior à amplitude observada a 20 Hz. A explicação deste acontecimento está relacionada com a diferente vibração das células sujeitas a baixas ou a altas frequências. Observa-se também que a partir de 20 Hz a amplitude de movimento das bactérias aumenta até os 40 Hz mantendo-se inalterado até os 100 Hz.

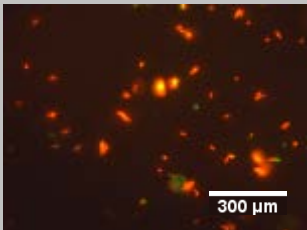
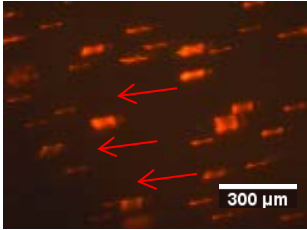
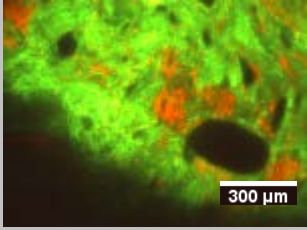

## 5.6. Efeito do Campo Eléctrico no Movimento das Células

Para observar em tempo real o comportamento das bactérias sujeitas a campos eléctricos, utilizou-se o equipamento dedicado à aplicação de campos magnéticos já produzido por João Borges [1] e procedeu-se do mesmo modo que nos ensaios anteriores. Nestes ensaios foi utilizada a bactéria *R. erythropolis* com potencial zeta positivo (crescidas em Hexadecano) e com potencial negativo (crescidas em etanol).

Na Tabela 5.2 apresentam-se os resultados obtidos do movimento resultante da interacção do campo magnético com a bactéria. Observa-se que as células movimentam-se quando sujeitas ao campo eléctrico e permaneceram estáticas quando não se aplicou campo. Com uma fonte variável de alta tensão apenas foi possível observar movimento com uma tensão igual a 8 KV. As imagens foram captadas com um tempo de exposição de 10 segundos e uma ampliação de 150 vezes.

A amplitude do movimento das células com potencial zeta positivo foi de 10,47  $\mu\text{m}$ , e nas com potencial zeta negativo foi de 5,83  $\mu\text{m}$ .

Tabela 5.2 – Amplitude do movimento das células sujeitas a campos eléctricos

Tensão	Potencial Zeta	Trajectória
<b>0 KV</b>	Negativo	
<b>8 KV</b>	Negativo	
<b>0 KV</b>	Positivo	
<b>8 KV</b>	Positivo	

## 5.7. Ensaio Realizados com Equipamento para Aplicação de Campo Magnético

Nestes ensaios utilizaram-se as bactérias *S. aureus* e *S. hominis* nos equipamentos dedicados à aplicação de campos magnéticos nos diversos provetes com defeitos produzidos e nos componentes fornecidos. A metodologia teste descrita no subcapítulo 2.5 foi aplicada em todos os ensaios. Os parâmetros variáveis dos ensaios foram o tempo de deposição das bactérias, o tempo de aplicação dos campos magnéticos, a frequência do campo magnético e o tempo de incidência da luz ultravioleta.

### 5.7.1. Ensaio nos Provetes com Defeitos Produzidos por Indentação

Nestes ensaios aplicou-se a metodologia teste descrita subcapítulo 2.5 nos provetes com defeitos produzidos por indentação de modo a determinar o limiar de detectabilidade da técnica aplicando campos magnéticos. Nos ensaios realizados nos provetes utilizaram-se as células *S. aureus* e *S. hominis*.

Na Figura 5.5 observa-se o microscópio utilizado para observar a presença de bactérias nos diferentes defeitos, que será utilizado em todos os ensaios posteriores a este.

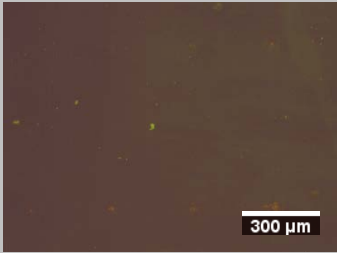
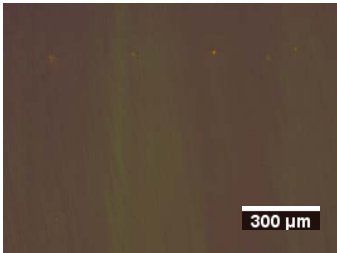
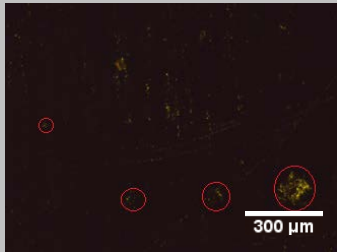
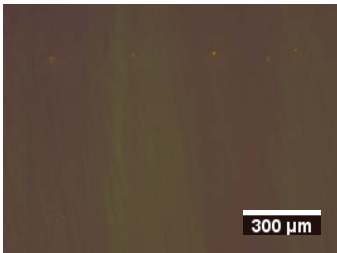


Figura 5.5 – Microscópio disponível no laboratório

Uma gota com suspensão bacteriana foi depositada sobre a superfície do provete com a matriz de defeitos e sujeitou-se aos campos magnéticos. O excesso de fluido foi removido com um lenço anti-riscos de limpeza de lentes e incidiu-se sobre a superfície uma luz ultravioleta com comprimento de onda germicida com um ângulo rasante para eliminar as células fora dos defeitos. Em seguida os resultados foram observados ao microscópio. Para evitar danos permanentes nos provetes, após os ensaios, foram esterilizados com etanol. O procedimento foi igual para todos os provetes.

Na Tabela 5.3 apresentam-se os parâmetros obtidos nos ensaios com melhores resultados realizados no PMMA.

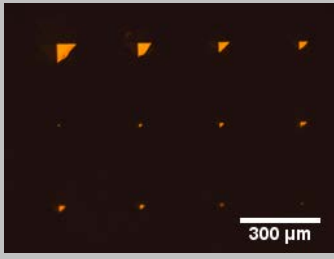
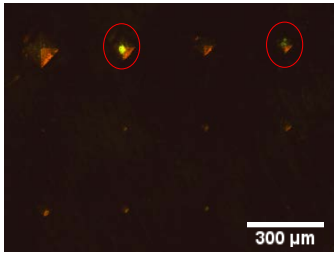
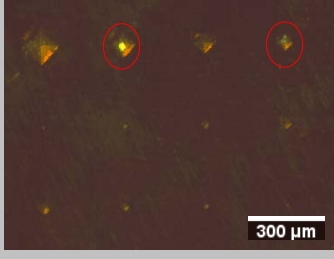
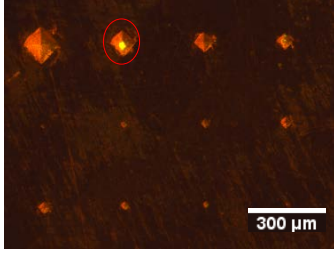
Tabela 5.3 – Parâmetros escolhidos nos ensaios no PMMA (ampliação de 150x)

Ensaio	Bactéria	Equipamento	Tempo de excitação	Tempo de luz UV	Frequência [Hz]	Nº de ciclos	Imagem
#1	<i>S. aureus</i>	Campo Mag. Horizontal e Vertical	4 min	1 min	40	60	
#2	<i>S. hominis</i>	Campo Mag. Horizontal e Vertical	4 min.	1 min	40	60	
#3	<i>S. aureus</i>	Campo Magnético no Plano Horizontal e Vertical	4 min.	1 min.	40		
#4	<i>S. hominis</i>	Campo Magnético no Plano Horizontal e Vertical	4 min.	1 min.	40		

Observa-se nas imagens dos ensaios da Tabela 5.3, apenas no ensaio #3 foi possível observar bactérias nos defeitos de maior dimensão (pontos verdes fluorescentes). A falta de células nos defeitos pode ser explicada com a pouca profundidade que os defeitos têm no material de PMMA e devido à existência de forças electrostáticas. Esta pouca profundidade deve-se ao facto de o acrílico ser um material com baixa dureza, então a acção do punção sobre a sua superfície não é tão eficaz quanto aos outros materiais, sofrendo somente uma pequena deformação. Nestes ensaios não faz sentido falar em limiar de detectabilidade uma vez que as bactérias apresentam incompatibilidade com o PMMA.

Na Tabela 5.4 apresentam-se os parâmetros obtidos nos ensaios com melhores resultados realizados no cobre.

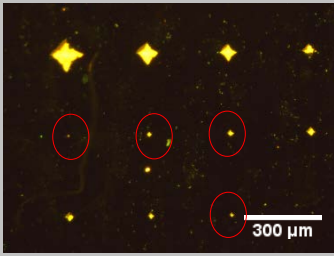
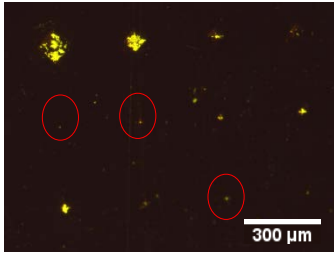
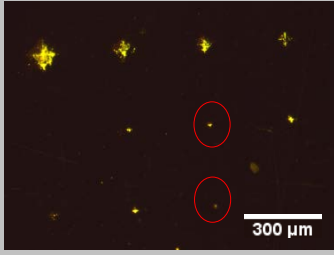
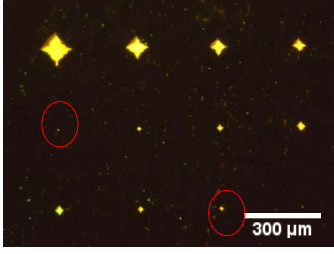
Tabela 5.4 – Parâmetros escolhidos nos ensaios no cobre (ampliação de 150x)

Ensaio	Bactéria	Equipamento	Tempo de excitação	Tempo de luz UV	Frequência [Hz]	Nº de ciclos	Imagem
#1	<i>S. aureus</i>	Campo Mag. Horizontal e Vertical	30 seg.	1 min	40	15	
#2	<i>S. hominis</i>	Campo Mag. Horizontal e Vertical	30 seg.	1 min	40	15	
#3	<i>S. aureus</i>	Campo Magnético no Plano Horizontal e Vertical	30 seg.	1 min.	40		
#4	<i>S. hominis</i>	Campo Magnético no Plano Horizontal e Vertical	30 seg.	1 min.	40		

Na Tabela 5.4 observa-se que o tempo de excitação das células na superfície do cobre é bastante inferior aos ensaios realizados no PMMA. Para tentar evitar a acção antibacteriana do cobre reduziu-se o tempo dos ensaios. Os resultados obtidos nos dois equipamentos utilizando as duas bactérias pode observar-se que os resultados são similares. Verifica-se a presença de bactérias nos defeitos de tamanhos maiores. O limiar de detectabilidade utilizando campos magnéticos no cobre é igual a 96,7  $\mu\text{m}$ .

Na Tabela 5.5 apresentam-se os parâmetros obtidos nos ensaios com melhores resultados realizados no alumínio.

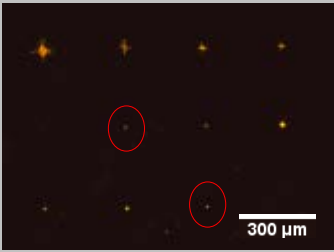
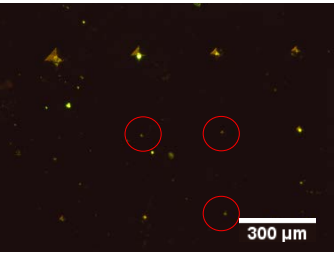
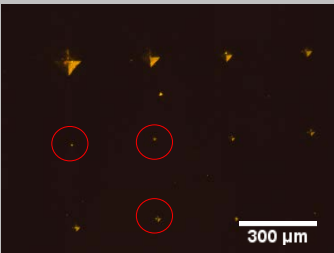
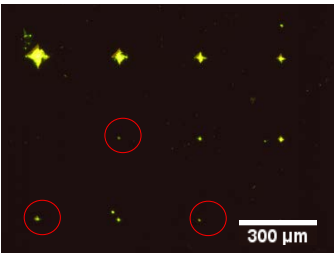
Tabela 5.5 – Parâmetros escolhidos nos ensaios no alumínio (ampliação de 150x)

Ensaio	Bactéria	Equipamento	Tempo de excitação	Tempo de luz UV	Frequência [Hz]	Nº de ciclos	Imagem
#1	<i>S. aureus</i>	Campo Mag. Horizontal e Vertical	4 min.	1 min	40	60	
#2	<i>S. hominis</i>	Campo Mag. Horizontal e Vertical	4 min.	1 min	40	60	
#3	<i>S. aureus</i>	Campo Magnético no Plano Horizontal e Vertical	4 min.	1 min.	40		
#4	<i>S. hominis</i>	Campo Magnético no Plano Horizontal e Vertical	4 min.	1 min.	40		

Como pode verificar-se na Tabela 5.5 as bactérias penetraram em todos os defeitos excepto no mais pequeno. O limiar de detectabilidade é igual a 12,5  $\mu\text{m}$ .

Na Tabela 5.6 apresentam-se os parâmetros obtidos nos ensaios com melhores resultados realizados no aço inoxidável 304 L.

Tabela 5.6 – Parâmetros escolhidos nos ensaios no aço inoxidável 304 L (ampliação de 150x)

Ensaio	Bactéria	Equipamento	Tempo de excitação	Tempo de luz UV	Frequência [Hz]	Nº de ciclos	Imagem
#1	<i>S. aureus</i>	Campo Mag. Horizontal e Vertical	4 min.	1 min	40	60	
#2	<i>S. hominis</i>	Campo Mag. Horizontal e Vertical	4 min.	1 min	40	60	
#3	<i>S. aureus</i>	Campo Magnético no Plano Horizontal e Vertical	4 min.	1 min.	40		
#4	<i>S. hominis</i>	Campo Magnético no Plano Horizontal e Vertical	4 min.	1 min.	40		

Na Tabela 5.6 observam-se os ensaios realizados com a bactéria *S. hominis* e *S. aureus* no dispositivo automatizado com rotação de campo magnético no plano horizontal e vertical foram os que verificaram-se presença de células em todos os defeitos existentes no material. Assim o limiar de detectabilidade para o material de aço inoxidável 304 L é de 9,6 µm.

A não igualdade de presença de células nos defeitos utilizando os dois equipamentos, justifica-se com o facto do campo magnético produzido pelo dispositivo automatizado com rotação de campo magnético no plano horizontal e vertical promover maior mobilidade e

penetração das bactérias nos defeitos do que o dispositivo automatizado para campo magnético horizontal e vertical.

Na Tabela 5.7 apresentam-se de forma resumida os parâmetros e resultados obtidos nos ensaios com campos magnéticos, onde o equipamento “1” é o dispositivo automatizado para campo magnético horizontal e vertical e o “2” é o dispositivo automatizado com rotação de campo magnético no plano horizontal e vertical.

Tabela 5.7 - Parâmetros experimentais com melhores resultados de todos os ensaios com campos magnéticos

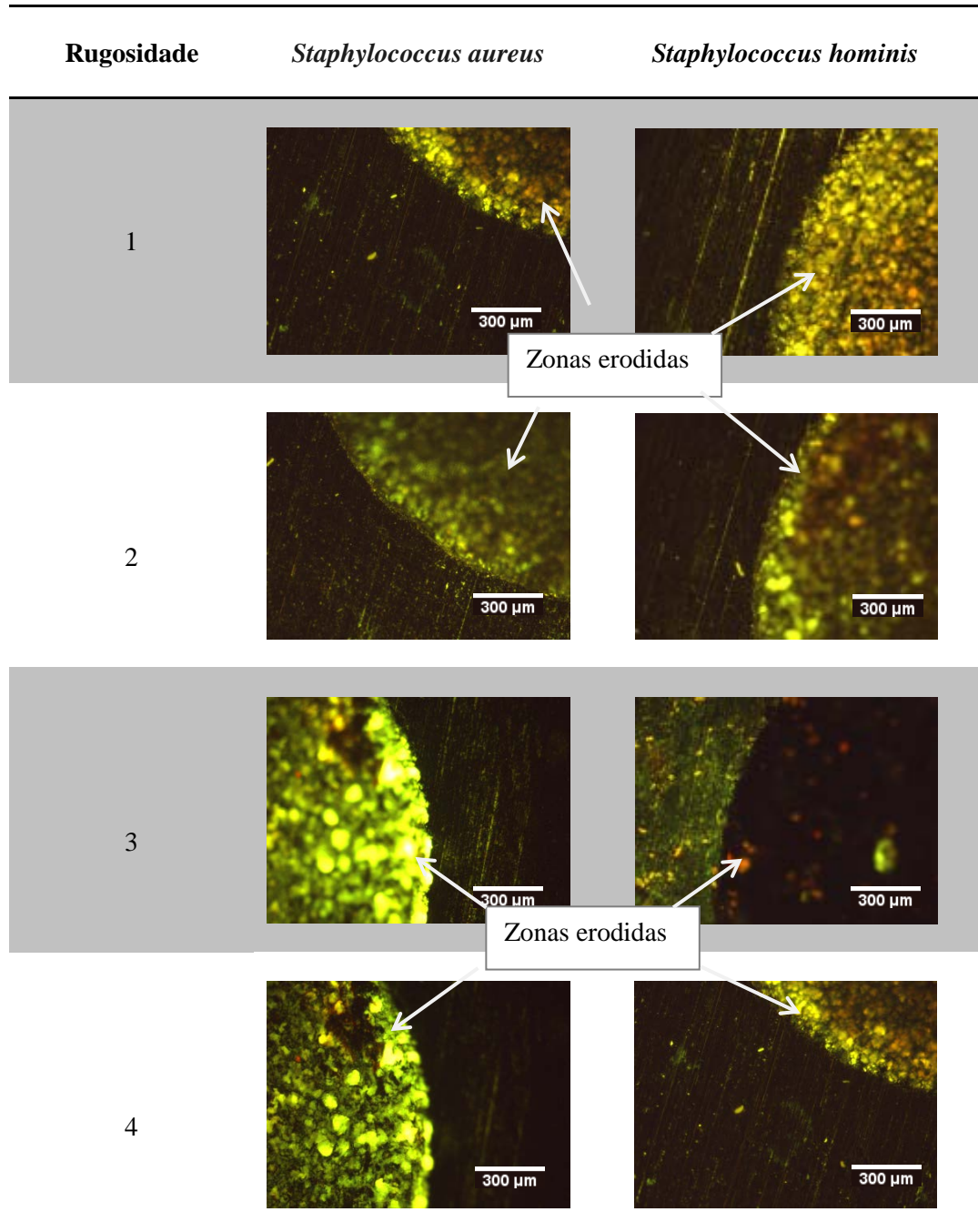
Material	Bactéria	Equipamento	Frequência [Hz]	Tempo de deposição	Tempo e Ângulo de incidência UV	Limiar de detectabilidade (µm)
Alumínio	<i>S. aureus</i>	1	40	4 min.	1 min. 0°	12,5
	<i>S. hominis</i>	1	40	4 min.	1 min. 0°	
	<i>S. aureus</i>	2	40	4 min.	1 min. 0°	
	<i>S. hominis</i>	2	40	4 min.	1 min. 0°	
Aço inox 304 L	<i>S. aureus</i>	1	40	4 min.	1 min. 0°	9,6
	<i>S. hominis</i>	1	40	4 min.	1 min. 0°	
	<i>S. aureus</i>	2	40	4 min.	1 min. 0°	
	<i>S. hominis</i>	2	40	4 min.	1 min. 0°	
PMMA	<i>S. aureus</i>	1	40	4 min.	1 min. 0°	-
	<i>S. hominis</i>	1	40	4 min.	1 min. 0°	
	<i>S. aureus</i>	2	40	4 min.	1 min. 0°	
	<i>S. hominis</i>	2	40	4 min.	1 min. 0°	
Cobre	<i>S. aureus</i>	1	40	30 seg	1 min. 0°	96,7
	<i>S. hominis</i>	1	40	30 seg	1 min. 0°	
	<i>S. aureus</i>	2	40	30 seg	1 min. 0°	
	<i>S. hominis</i>	2	40	30 seg	1 min. 0°	

### **5.7.2. Ensaios no Provetete Eletroerodido**

Nestes ensaios pretendeu-se estudar a aderência das bactérias nas diferentes rugosidades produzidas no alumínio pelo processo de electroerosão. Para tal utilizaram-se as bactérias *S. aureus* e a *S. Hominis* no dispositivo automatizado para campo magnético horizontal e vertical.

A metodologia teste foi a mesma que nos ensaios anteriores. Para estes ensaios o tempo de excitação dos solenóides foi de 4 minutos, incidiu-se sobre o provete a luz ultravioleta com um ângulo rasante e frequência igual a 40 Hz, e na Tabela 5.8 apresentam-se os resultados obtidos.

Tabela 5.8 – Resultados obtidos nas peças eletroerodidas (ampliação de 150x)



Na Tabela 5.8 observa-se que as bactérias alojaram-se até ao limite das zonas erodidas. Conclui-se que as células aderem preferencialmente às diferentes rugosidades existentes no provete quando sujeitas a campos magnéticos. Na figura da linha 3 e 4 utilizando a bactéria *S. aureus*, observa-se uma falta de células. Conclui-se então que a aplicação desta técnica de END permite observar erros de padrão na superfície do material, pois as zonas (a preto) sem células correspondem a locais com profundidades diferentes.

### **5.7.3. Ensaios Laboratoriais no Provete com Diferentes Rugosidades**

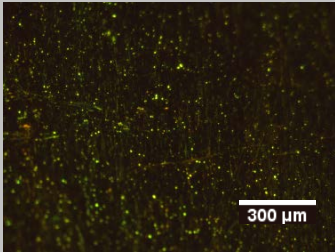
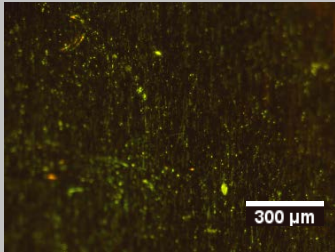
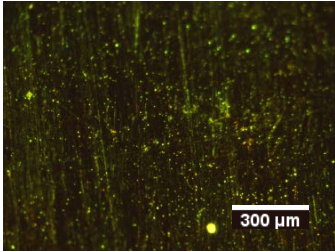
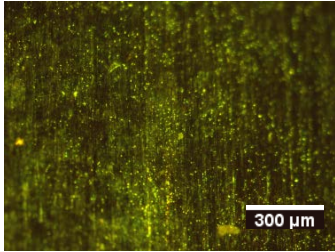
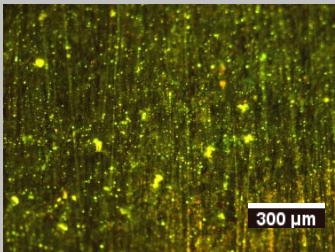
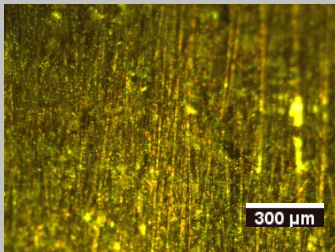
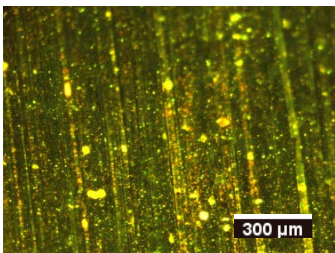
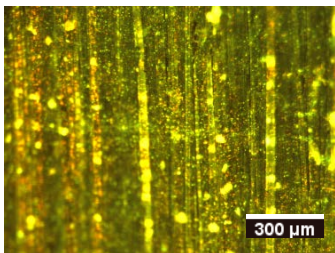
Nestes ensaios pretendeu estudar-se a aderência das bactérias nos diferentes sulcos produzidos pelas diferentes granulometrias de lixas. A metodologia teste aplicada foi a mesma que nos últimos ensaios.

Por motivos de tamanho excessivo do provete, apenas foi possível aplicar a técnica de END no dispositivo automatizado para campo magnético horizontal e vertical.

A metodologia aplicada foi igual à aplicada nos ensaios anteriores colocando sobre cada fila de rugosidade, uma gota de suspensão bacteriana. Os parâmetros utilizados com que se detectaram defeitos de menores dimensões foram: tempo de excitação dos solenóides de 4 minutos, 1 minuto de incidência da luz ultravioleta no provete com um ângulo rasante e frequência de campo igual a 40 Hz.

Na Tabela 5.9 observam-se os resultados obtidos.

Tabela 5.9 – Resultados obtidos no provete com diferentes rugosidades (ampliação de 150x)

Fila	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus hominis</i>
1		
2		
3		
4		

Na Tabela 5.9 verifica-se um aumento do número de bactérias presentes ao longo dos sulcos à medida que a superfície tem um acabamento mais grosseiro. Este fenómeno deve-se ao facto de que a granulometria aumenta com a fila. Com estes ensaios conclui-se que as bactérias aderem aos sulcos produzidos pelas lixas. Conclui-se também que através da utilização desta técnica é possível detectar diferentes níveis de rugosidade, isto é, quanto maior for a presença de células nos sulcos da superfície dos componentes, mais fundos serão os sulcos existentes na superfície do material.

## **5.8. Ensaios Laboratoriais Utilizando Campos Eléctricos**

Nestes ensaios utilizou-se a bactéria *Rhodococcus erythropolis* com potencial zeta positivo e negativo. Em semelhança com os ensaios realizados com equipamentos dedicados à aplicação de campos magnéticos realizaram-se ensaios utilizando equipamentos dedicados a aplicação de campos eléctricos nos provetes com defeitos produzidos por indentação, com diferentes texturas produzidas por electroerosão e com diferentes rugosidades produzidas com lixas. A metodologia teste descrita no subcapítulo 2.5 foi aplicada em todos os ensaios. Os parâmetros variáveis dos ensaios foram o tempo de deposição das bactérias, o tempo de aplicação dos campos eléctricos, a tensão e o tempo de incidência da luz ultravioleta.

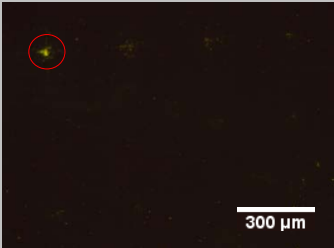
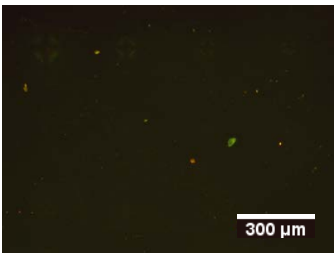
### **5.8.1. Ensaios nos Provetes com Defeitos Produzidos por Indentação**

Nestes ensaios pretendeu aplicar-se a metodologia teste descrita no subcapítulo 2.5 nos provetes com defeitos produzido por indentação de modo a determinar o limiar de detectabilidade da técnica aplicando campos eléctricos.

A bactéria utilizada foi a *R. erythropolis* com potencial zeta positivo e negativo. Em seguida apresentam-se os parâmetros de cada ensaio e os seus resultados.

Na Tabela 5.10 apresentam-se os parâmetros obtidos nos ensaios com melhores resultados realizados no PMMA.

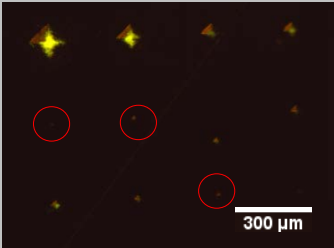
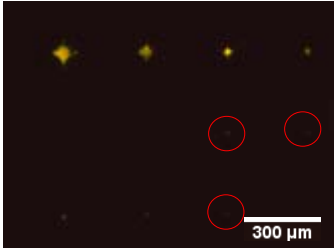
Tabela 5.10 - Parâmetros escolhidos nos ensaios no PMMA (ampliação de 150x)

Ensaio	Bactéria	Equipamento	Tempo de excitação	Tempo de luz UV	Frequência [Hz]	Nº de ciclos	Imagem
#1	<i>R. erythropolis.</i> (+)	Dedicado à aplicação de campo eléctrico	4 min.	1 min.	40	60	
#2	<i>R. erythropolis.</i> (-)	Dedicado à aplicação de campo eléctrico	4 min.	1 min.	40	60	

Na Tabela 5.10, em semelhança com os resultados obtidos com aplicação de campos magnéticos, não é possível observar presença de bactérias nos defeitos existentes no material, excepto no defeito de maiores dimensões. Nestes ensaios não faz sentido falar em limiar de detectabilidade uma vez que as bactérias apresentam incompatibilidade com o PMMA.

Na Tabela 5.11 apresentam-se os parâmetros obtidos nos ensaios com melhores resultados realizados no cobre.


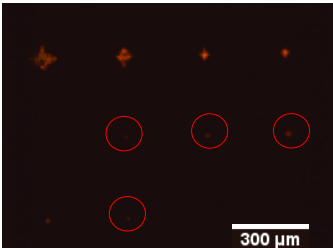
Tabela 5.11 - Parâmetros escolhidos nos ensaios no cobre (ampliação de 150x)

Ensaio	Bactéria	Equipamento	Tempo de excitação	Tempo de luz UV	Frequência [Hz]	Nº de ciclos	Imagem
#1	<i>R. erythropolis</i> . (+)	Dedicado à aplicação de campo eléctrico	30 seg.	1 min.	40	120	
#2	<i>R. erythropolis</i> . (-)	Dedicado à aplicação de campo eléctrico	30 seg.	1 min.	40	120	

Na Tabela 5.11 observa-se que a acção antibacteriana do cobre não eliminou as bactérias *R. erythropolis* durante o tempo de ensaio. Verifica-se a presença de células em todos os defeitos, excepto o de menores dimensões. Conclui-se que a bactéria *R. erythropolis* DCL14 é mais resistente à acção antibacteriana do cobre do que a *S. aureus* e a *S. hominis*. O limiar de detectabilidade desta técnica neste material foi de 12,7 µm.

Na Tabela 5.12 apresentam-se os parâmetros obtidos nos ensaios com melhores resultados realizados no alumínio.

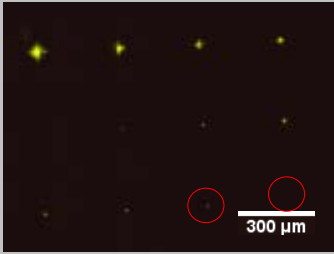
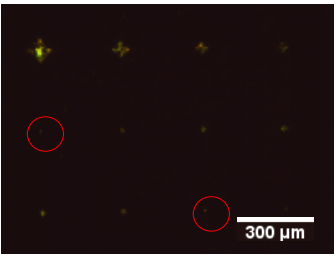
Tabela 5.12 - Parâmetros escolhidos nos ensaios no alumínio (ampliação de 150x)

Ensaio	Bactéria	Equipamento	Tempo de excitação	Tempo de luz UV	Frequência [Hz]	Nº de ciclos	Imagem
#1	<i>R. erythropolis.</i> (+)	Dedicado à aplicação de campo eléctrico	4 min.	1 min.	40	60	
#2	<i>R. erythropolis.</i> (-)	Dedicado à aplicação de campo eléctrico	4 min.	1 min.	40	60	

Na Tabela 5.12 observa-se a presença de células em todos os defeitos excepto no de menores dimensões. Assim o limiar de detectabilidade desta técnica utilizando campos eléctricos no alumínio é igual a 22,6 µm.

Na Tabela 5.13 apresentam-se os parâmetros obtidos nos ensaios com melhores resultados realizados no aço inoxidável 304 L.

Tabela 5.13 - Parâmetros escolhidos nos ensaios no aço inoxidável 304 L (ampliação de 150x)

Ensaio	Bactéria	Equipamento	Tempo de excitação	Tempo de luz UV	Frequência [Hz]	Nº de ciclos	Imagem
#1	<i>R. erythropolis.</i> (+)	Dedicado à aplicação de campo eléctrico	4 min.	1 min.	40	60	
#2	<i>R. erythropolis.</i> (-)	Dedicado à aplicação de campo eléctrico	4 min.	1 min.	40	60	

Na Tabela 5.13 observa-se a presença de células em todos os defeitos excepto no de menores dimensões quando utilizou-se a bactéria *R. erythropolis* com potencial zeta positivo, e com a com potencial zeta negativo verifica-se a existência em todos os defeitos. Assim o limiar de detectabilidade no aço inoxidável 304 L aplicando campos eléctricos na bactéria *R. erythropolis* com potencial zeta negativo é de 9,6 µm.

Na Tabela 5.14 apresentam-se resumidamente os parâmetros e resultados obtidos nos ensaios utilizando o dispositivo para aplicação de campo eléctrico.

Tabela 5.14 - Parâmetros experimentais com melhores resultados com campos magnéticos

Material	Bactéria	Tensão [KV]	Tempo de deposição	Tempo e Ângulo de incidência UV	Limiar de detectabilidade ( $\mu\text{m}$ )
Alumínio	<i>R. erythropolis.</i> (+)	8	4 min.	1 min. 0°	22,6
	<i>R. erythropolis.</i> (-)	8	4 min.	1 min. 0°	
Aço inox 304 L	<i>R. erythropolis.</i> (+)	8	4 min.	1 min. 0°	9,6
	<i>R. erythropolis.</i> (-)	8	4 min.	1 min. 0°	
PMMA	<i>R. erythropolis.</i> (+)	8	4 min.	1 min. 0°	-
	<i>R. erythropolis.</i> (-)	8	4 min.	1 min. 0°	
Cobre	<i>R. erythropolis.</i> (+)	8	30 seg.	1 min. 0°	21,9
	<i>R. erythropolis.</i> (-)	8	30 seg.	1 min. 0°	

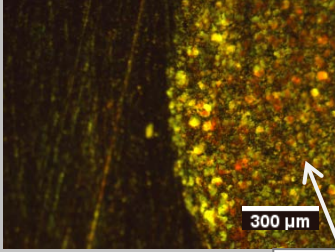
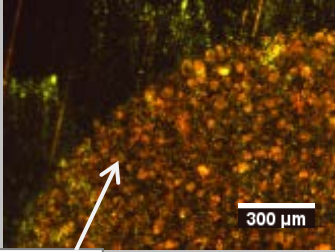
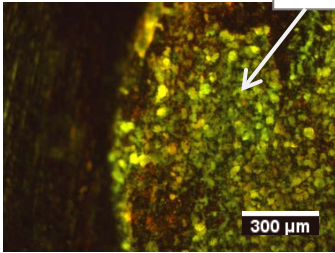
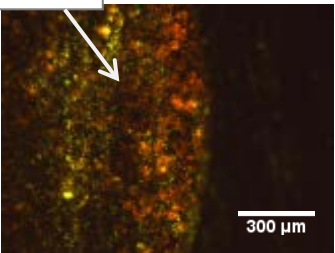
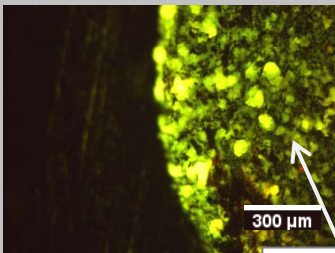
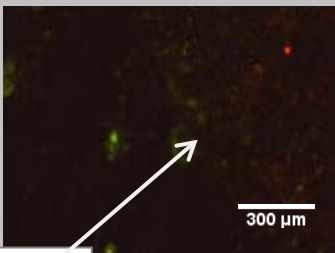
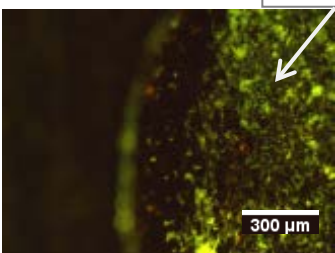
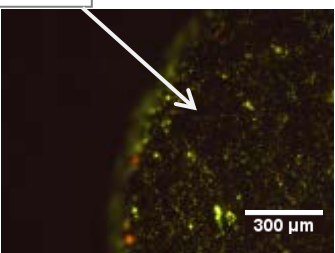
### 5.8.2. Ensaios no Provette Electroerodido

Nestes ensaios pretendeu-se estudar a aderência das bactérias nas diferentes rugosidades produzidas no alumínio pelo processo de electroerosão. Para tal utilizou-se a bactéria *R. erythropolis* com potencial zeta positivo e negativo no equipamento dedicado à aplicação de campo eléctrico.

A metodologia de teste aplicada nos ensaios realizados no provete electroerodido foi igual nos realizados com campo magnético juntamente com os tempos escolhidos, de deposição e de incidência da luz ultravioleta.

Na Tabela 5.15 observam-se os resultados obtidos nos ensaios.

Tabela 5.15 – Resultados obtidos nas peças eletroerodidas (ampliação de 150x)

Rugosidade	<i>R. erythropolis</i> (+)	<i>R. erythropolis</i> (-)
1		
Zonas erodidas		
2		
3		
Zonas erodidas		
4		

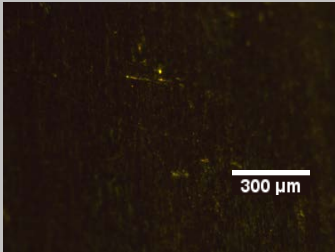
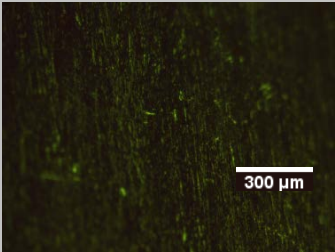
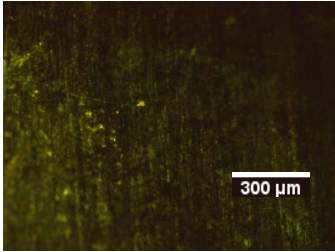
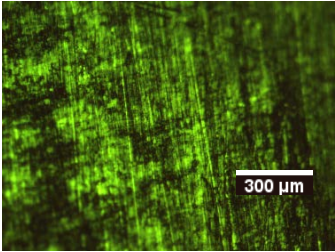
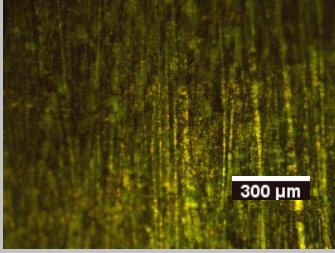
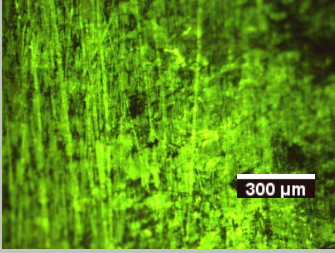
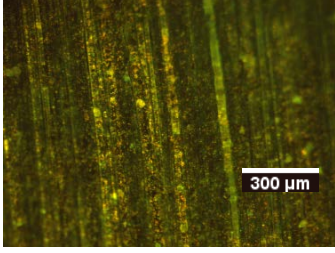
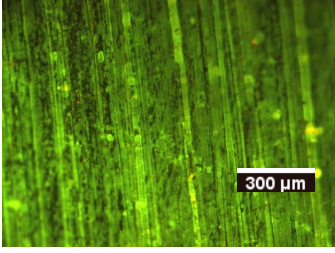
Na Tabela 5.15 observa-se que as bactérias alojaram-se até ao limite das zonas erodidas. Em semelhança com os resultados obtidos em 5.5.2 verifica-se a aderência das células nas rugosidades existentes. Na Tabela 5.15 nas linhas 2, 3 e 4 utilizando a bactéria *R. erythropolis* com potencial zeta positivo verifica-se a existência de uma zona sem células (a preto). A inexistência de células numa determinada zona da textura representa uma falha no padrão da rugosidade. Conclui-se então que a aplicação desta técnica de END permite observar erros de padrão na superfície do material, pois as zonas (a preto) sem células correspondem a locais com profundidades diferentes.

### **5.8.3. Ensaios Laboratoriais no Provet com diferentes rugosidades**

Nestes ensaios, tal como anteriormente, pretendeu estudar-se a aderência das bactérias nos diferentes sulcos produzidos pelas diferentes lixas. Neste caso, utilizaram-se as bactérias *Rhodococcus erythropolis* com potencial zeta positivo e negativo. A metodologia teste utilizada foi a mesma que a utilizada nos ensaios anteriores, tais como os parâmetros escolhidos.

Na Tabela 5.16 observam-se os resultados obtidos.

Tabela 5.16 – Resultados obtidos no provete com diferentes rugosidades (ampliação de 150x)

Fila	<i>R. erythropolis</i> (+)	<i>R. erythropolis</i> (-)
1		
2		
3		
4		

Em semelhança com os resultados obtidos em 5.5.3 na Tabela 5.16 observa-se que o número de bactérias presentes nas diferentes filas aumenta à medida que o nível de acabamento superficial piora. Este fenómeno era esperado, uma vez que os sulcos produzidos pelas lixas são tanto mais fundos quanto maior for a granulometria da lixa utilizada. Conclui-se também que através da utilização desta técnica é possível detectar diferentes níveis de rugosidade, isto é, quanto maior for a presença de células nos sulcos da superfície dos componentes, mais fundos serão os sulcos existentes na superfície do material. Em semelhança com os resultados obtidos em 5.5.2 e em 5.6.2, na fila 2 e 3 utilizando a bactéria com potencial zeta negativo observa-se a

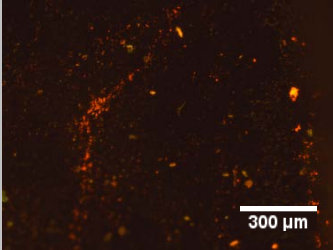
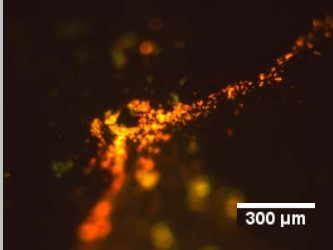
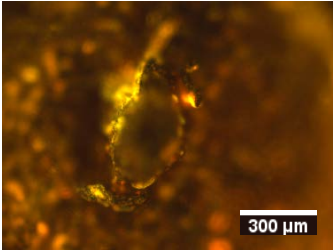
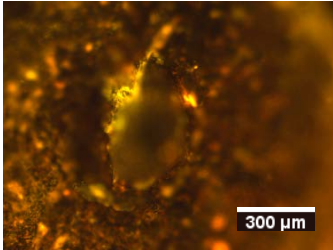
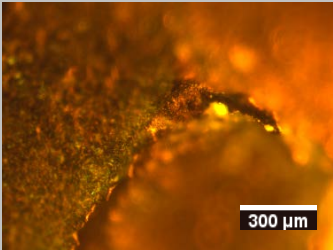
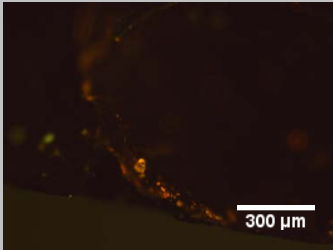
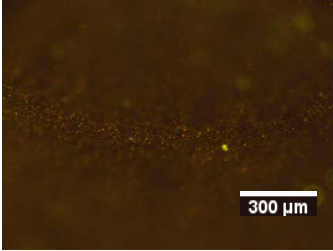
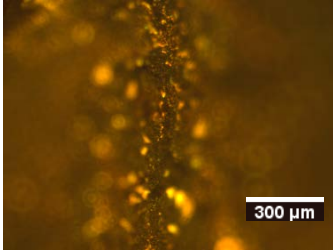
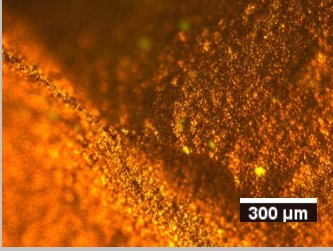
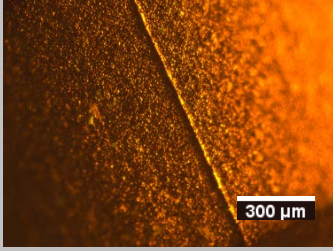
falta de células em determinada zona (a preto), o que indicia a não uniformidade da qualidade de superfície.

## **5.9. Ensaios Laboratoriais nos Componentes Microfabricados**

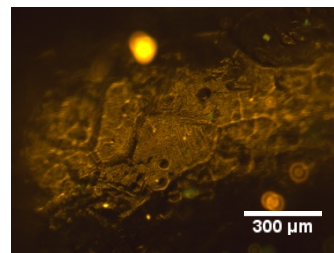
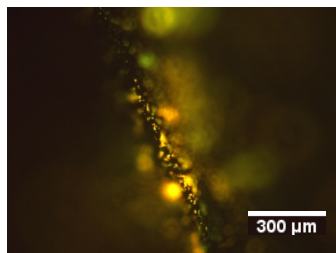
Nestes ensaios pretendeu-se detectar defeitos em componentes microfabricados pela técnica *micro-PIM*. Sobre os diversos componentes, depositou-se uma gota sobre os componentes e utilizou-se o dispositivo dedicado a aplicação decampo eléctrico. Os parâmetros dos ensaios foram: 4 minutos de tempo de excitação, 1 minuto de incidência de luz ultravioleta e tensão igual a 8 KV.

Na Tabela 5.17 observam-se os resultados obtidos.

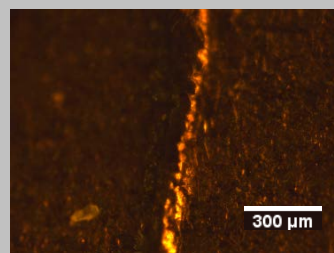
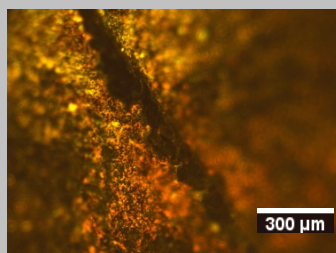
Tabela 5.17 - Resultados obtidos nos componentes fornecidos (ampliação de 150x)

Componente	<i>R. erythropolis</i> (+)	<i>R. erythropolis</i> (-)
Amostra 1A (fila B)		
Amostra 7A		
Gito 0		
Amostra 1A (fila C)		
Amostra 28A		

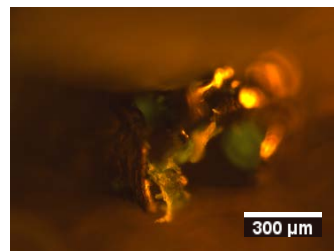
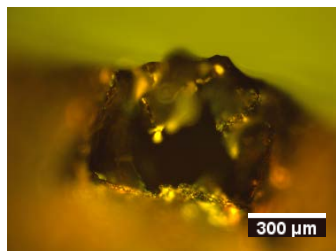
**Gito 7**



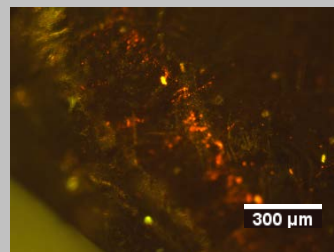
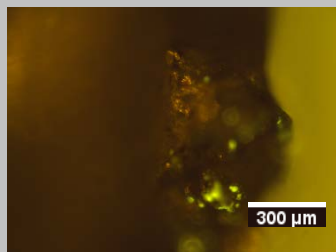
**Gito 10**



**Gito 16**



**Gito 26**



Na Tabela 5.17 observa-se que as bactérias aderiram à superfície dos componentes. Verificou-se a detecção de vários defeitos, poros e fissuras. Nas imagens da Tabela 5.17 confirma-se que a etapa de limpeza não foi eficaz nestes componentes, uma vez que observa-se a presença de células ao longo da superfície fora dos poros e fissuras e poucas nos defeitos. Este acontecimento pode ser explicado pelo método de limpeza de excesso de fluido bacteriano não ser adequado para este formato de componentes analisados.

## 6. Conclusões

Ao longo deste trabalho desenvolveu-se e validou-se a técnica inovadora de END, que se baseia na utilização de células bacterianas para a detecção de defeitos

Os ensaios realizados com LP convencionais permitiram concluir que a técnica é inadequada para detectar micro-defeitos, uma vez que com esta técnica, não foi possível detectar os defeitos com dimensões inferiores a 62,1  $\mu\text{m}$ .

Nos dispositivos dedicados a aplicação de campos magnéticos observou-se em tempo real o movimento das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus hominis*. Nestes ensaios o limiar de detectabilidade de defeitos no cobre foi de 96,7  $\mu\text{m}$ , no aço inoxidável 304 L foi de 9,6  $\mu\text{m}$  e no alumínio foi de 22,6  $\mu\text{m}$ . A amplitude de movimento registada das bactérias nos ensaios foi de 80  $\mu\text{m}$  para a *S. aureus* e 40  $\mu\text{m}$  para a *S. hominis*.

Nos dispositivos dedicados a aplicação de campos eléctricos observou-se em tempo real o movimento da bactéria *Rhodococcus erythropolis* com potencial zeta positivo e negativo. Nestes ensaios o limiar de detectabilidade de defeitos no cobre foi de 21,9  $\mu\text{m}$ , no aço inoxidável 304 L foi de 9,6  $\mu\text{m}$ , no alumínio foi de 22,6  $\mu\text{m}$  e no PMMA foi de 132,3  $\mu\text{m}$ . A amplitude de movimento registada das bactérias nos ensaios foi de 10,5  $\mu\text{m}$  para a *S. aureus* e 5,8  $\mu\text{m}$  para a *R. erythropolis* com potencial zeta positivo e negativo respectivamente.

Nos vários ensaios realizados conclui-se que o tempo óptimo de aplicação de campos magnéticos e eléctricos foi de 4 minutos para os materiais de alumínio, aço inoxidável 304L e PMMA. Para o cobre 30 segundos foi o tempo obtido para a aplicação de campos. Na etapa de remoção de excesso de fluido bacteriano, 1 minuto de incidência de luz ultravioleta foi o tempo com melhores resultados na eliminação de células à superfície sem interferir com as existentes nos defeitos. Estes parâmetros foram obtidos em todos os materiais, células e equipamentos.

Aplicou-se a metodologia teste no provete electroerodido e no de diferentes rugosidades. Os ensaios foram realizados no dispositivo automatizado para aplicação de campos magnéticos e no dispositivo para aplicação de campos eléctricos. Verificou-se que as células aderem nas diferentes texturas e nas diferentes rugosidades. Observaram-se também zonas sem existência de células. Assim esta técnica permite detectar erros de padrão nas texturas e nas rugosidades. Possibilita também detectar diferentes rugosidades através do número de células existentes na superfície. Conclui-se que quanto mais profundos são os sulcos produzidos pelas lixas, maior é a acumulação de células.

Nos ensaios realizados nos componentes microfabricados pela técnica micro-PIM, verificou-se que o método de remoção do excesso de fluido bacteriano não era o mais adequado. Detectaram-se micro-defeitos previamente caracterizados nos diversos componentes.

Os resultados mostram que a metodologia é funcional e fiável na identificação de defeitos e comprovam que é possível tirar partido das propriedades das bactérias, e que as diferentes variantes da metodologia são adequadas a esse fim.

## **7. Propostas para Desenvolvimentos Futuros**

Terminado este trabalho, propõe-se como desenvolvimento futuro a recolha e estudo de novas bactérias para aplicar nesta técnica.

Devem ser analisados novos materiais de modo a estudar o comportamento das bactérias e determinar novos limiares de detectabilidade.

Deve ser explorada a etapa de revelação das bactérias nos defeitos, de modo a que seja possível observar defeitos a olho nu.

Devem ser explorados novos tipos de defeitos, como por exemplo através da interação das bactérias com os materiais (biocorrosão). Assim, justamente com os resultados já obtidos, é possível verificar qual a morfologia de defeitos a que a utilização desta técnica mais se adequa.

Repetir e realizar novos ensaios em defeitos reais existentes em componentes microfabricados, tendo em vista otimizar os parâmetros de inspeção nessas condições.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] João P. dos S. Borges, “Desenvolvimento de Técnicas Baseadas em Filmes de Células Bacterianas para Aplicação em Ensaio Não Destrutivos de Materiais de Engenharia”, Faculdade de Ciências e Tecnologia – UNL, Almada, Portugal 2011.
- [2] Redetec, disponível em: <http://www.redetec.org.br/inventabrasil/lingua.htm>, Acesso em Abril 2012
- [3] Diário da Saúde, disponível em: <http://www.diariodasaude.com.br/news.php?article=curativo-brilha-quando-entra-contato-bacterias&id=6951>, Acesso em Abril 2012.
- [4] R. Prakash, "Non-Destructive Testing Techniques," New Age Science, 2009.
- [5] Telmo G. Santos, “Tecnologia Mecânica IV Aula P4 – Líquidos Penetrantes (LP)”, Faculdade de Ciências e Tecnologia – UNL DEMI Núcleo de Tecnologia Industrial, 2010.
- [6] Ricardo Andreucci, “Ensaio por Líquidos Penetrantes”, Agosto 2010.
- [7] Daniel Leitão, ISQ, Comunicação particular, Setembro de 2012.
- [8] Telmo G. Santos, “Tecnologia Mecânica IV – Microfabricação”, Faculdade de Ciências e Tecnologia – UNL DEMI Núcleo de Tecnologia Industrial, 2010.
- [9] Gilmar Ferreira Batalha, Renato Luiz Lehnert Portela Cerveira, Flavia Renata Dantas Alves Silva, "Simulação de processos de microfabricação: influência do efeito de escala"
- [10] Moldação por Injecção de Pós (PIM), disponível em [www.ctcv.pt](http://www.ctcv.pt). Acesso em Janeiro 2012
- [11] R. Zauner, "Micro powder injection moulding," *Microelectronic Engineering*, vol. 83, pp. 1442-1444, Apr-Sep 2006.
- [12] Volker Pötte, Andreas E. Guber, Matthias Hecke, Andreas Gerlach "Micro Moulding of Medical Device Components", *Business Briefing: Medical Device Manufacturing & Technology*, 2004.
- [13] HKPC, disponível em: [http://www.hkpc.org/index.php?option=com\\_content&view=article&id=3121&Itemid=275&lang=en](http://www.hkpc.org/index.php?option=com_content&view=article&id=3121&Itemid=275&lang=en), Acesso em Agosto 2012
- [14] B. Sha, S. Dimov, C. Griffiths, and M. S. Packianather, "Investigation of microinjection moulding: Factors affecting the replication quality," *Journal of Materials Processing Technology*, vol. 183, Mar 23 2007.
- [15] M. Hecke, W. Bacher, and K. D. Muller, "Hot embossing - The molding technique for plastic microstructures," *Microsystem Technologies*, vol. 4, pp. 122-124, May 1998
- [16] Cheng-Hsien Wu, Hsien-Chang Ku, "Parametric study of injection molding and hot embossing in polymer microfabrication," *Journal of Mechanical Science and Technology*, vol. 21, pp. 1477-1482, Oct 2007.
- [17] Y. He, J. Z. Fu, and Z. C. Chen, "Optimization of control parameters in micro hot embossing," *Microsystem Technologies-Micro-and Nanosystems-Information Storage and Processing Systems*, vol. 14, pp. 325-329, Mar 2008.
- [18] Ricardo Arai, "Estudo teórico-experimental do efeito da flexão da ferramenta no processo de microfresamento," Universidade de São Paulo - Escola de Engenharia de São Carlos, São Paulo, Brasil 2008.
- [19] Joel O. C. Vasco, “A Micro-Fabricação aplicada ao processo de Micro-Injecção”, Escola de Engenharia - Universidade do Minho, Minho, Portugal 2006.

- [20] Pedro M. de M. B. Tavares, "Filmes Finos Supercondutores do Sistema Bi-Sr-Ca-Cu-O Obtidos por Deposição Química de Vapores Organometálicos Assistida por Aerossol", Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Trás-os-Montes, Portugal 2008.
- [21] Sua Pesquisa. disponível em: <<http://www.suapesquisa.com/ecologiasaude/bacterias/>>, Acessado em Junho 2012
- [22] Carla C. C. R. de Carvalho, —Biofilms: Recent Developments on an Old Battle, Recent Patents on Biotechnology , Vol. 1, pp. 49-57, 2007.
- [23] Davey ME e O'Toole GA., —Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics, Microbiol Mol Biol Rev, Vol. 64, pp. 847-867, 2000.
- [24] E-escola disponível em: <<http://www.e-escola.pt/topico.asp?id=354&ordem=2>>, Acesso em Agosto 2012
- [25] Iwona B. Beech, "Corrosion of technical materials in the presence of biofilms— current understanding and state-of-the art methods of study", International Biodeterioration & Biodegradation, Vol. 53, pp. 177 – 183, 2004
- [26] Hector A. Videla, "Prevention and control of biocorrosion," *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 49, pp. 259-270, 2002.
- [27] APC disponível em: <[http://www.al-ambiq.com/saber.php?lang=pt&subm\\_id=15](http://www.al-ambiq.com/saber.php?lang=pt&subm_id=15)>, Acesso em Abril 2012
- [28] Carla C.C.R. de Carvalho e Maria J. Caramujo, "Ancient Procedures for the High-Tech World: Health Benefits and Antimicrobial Compounds from the Mediterranean Empires", *The Open Biotechnology Journal*, Vol. 2, pp. 235-246, 2008.
- [29] Cristina Molteni, Helge K. Abicht e Marc Solioz, —Killing of Bacteria by Copper Surfaces Involves Dissolved Copper, APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, pp. 4099–4101, 2010.
- [30] Bianca Margato, Maylla dos Santos, Henrique L. de Barros, "Propriedades magnéticas de organismos magnetotáticos: um trabalho multidisciplinar", Revista Brasileira de Ensino de Física, vol. 29, pp. 347-353, 2007.
- [31] Elias Siores, Andrew S. Lamb, e Lee M. Swallow, —Bacterial Magnetic Particles for Applications in NDT&E, Detection of Flaws and Cracks in Sample Materials, 17<sup>th</sup> World Conference on Nondestructive Testing, Shanghai, China, pp. 25-28, 2008.
- [32] W. F. Smith, *Princípios de Ciência e Engenharia de Materiais*, McGRAW-HILL, 3<sup>a</sup> ed., 1988.
- [33] Rosa. M. M. Miranda, "Tecnologia Mecânica IV aula T6 – Processos de remoção de material EDM US Jacto de água," Faculdade de Ciências e Tecnologia – UNL, Almada, Portugal, 2011
- [34] Bruno S. Mateus, "Desenvolvimento e Aplicação de Equipamento Para Detecção de Defeitos Através de Suspensão de Células Bacterianas em Componentes Microfabricados," Faculdade de Ciências e Tecnologia – UNL, Almada, Portugal (2012)
- [35] Carla C.C.R. de Carvalho, Wick, L.Y., Heipieper, H.J. "Cell wall adaptations of planktonic and biofilm *Rhodococcus erythropolis* cells to growth on C5 to C16 n-alkane hydrocarbons", *Appl. Microbiol. Biotechnol*, Vol. 82, pp. 311-320, 2009
- [36] Karl Deutsch, disponível em: <[http://www.karldeutsch.de/KD\\_GENERAL\\_DL\\_SIDAT\\_TMB\\_EN\\_M1.html](http://www.karldeutsch.de/KD_GENERAL_DL_SIDAT_TMB_EN_M1.html)>, Acesso em Julho 2012