



Joana Patrícia Dutra Lopes

Licenciada em Ciências da Engenharia Mecânica

Aplicação e Caracterização de Ensaios não Destrutivos com Células Bacterianas

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Mecânica

Orientador: Doutor Telmo Jorge Gomes dos Santos, Professor Auxiliar da
Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa

Co-orientador: Doutora Carla da Conceição Caramujo Rocha de Carvalho,
Investigadora principal no iBB, Instituto Superior Técnico

Júri

Presidente: Prof. Doutora Carla Maria Moreira Machado

Arguente: Prof. Doutora Rosa Maria Mendes Miranda

Vogal: Prof. Doutor Telmo Jorge Gomes dos Santos

Joana Patrícia Dutra Lopes

Licenciada em Ciências da Engenharia Mecânica

Aplicação e Caracterização de Ensaios Não Destrutivos com Células Bacterianas

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Mecânica

Orientador: Doutor Telmo Jorge Gomes dos Santos, Professor Auxiliar da
Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa

Co-orientador: Doutora Carla da Conceição Caramujo Rocha de Carvalho,
Investigadora principal no iBB, Instituto Superior Técnico

Júri

Presidente: Prof. Doutora Carla Maria Moreira Machado
Arguente: Prof. Doutora Rosa Maria Mendes Miranda
Vogal: Prof. Doutor Telmo Jorge Gomes dos Santos

Setembro, 2016

Aplicação e Caracterização de Ensaios Não Destrutivos com Células Bacterianas

Copyright © 2016 Joana Patrícia Dutra Lopes

Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm 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 objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

*« Quanto maior
a dificuldade, tanto maior
é o mérito em superá-la. »*

Henry Beecher

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não teria sido possível sem a contribuição de inúmeras pessoas às quais desejo agradecer:

Ao meu orientador, Telmo Santos, pela sua energia e interesse demonstrados ao longo das etapas deste trabalho e por todas as pertinentes críticas, correções e sugestões feitas.

À minha co-orientadora, Carla de Carvalho, por facilitar as condições de trabalho necessárias à realização dos ensaios de END, por toda a preocupação, disponibilidade e conhecimentos transmitidos.

Ao Sr. António Campos e ao Sr. Paulo Magalhães por toda a ajuda prestada e pela preciosa companhia em alturas mais críticas. O meu enorme obrigada.

Ao Professor João Sotomayor, do Departamento de Química, pela disponibilidade, em qualquer altura, e fornecimento de compostos químicos fundamentais para a correta preparação dos materiais a ensaiar.

Aos colegas do Núcleo de Tecnologia Industrial pela boa disposição, apoio e partilha de conhecimentos.

Ao Gonçalo, por todo o apoio e paciência destes últimos dias, por toda a confiança e segurança que me transmitiu e por todo o amor e carinho inconfundíveis que me deram força para continuar esta caminhada. O mais sincero e sentido obrigada.

A todos os amigos que a faculdade me deu para a vida, obrigada por me terem acompanhado e por todos os bons momentos que levo comigo destes cinco anos.

Aos meus amigos e colegas de casa deixo um enorme obrigada por toda a companhia, amizade, preocupação e carinho.

A todos os meus amigos de infância pelo carinho, apoio e amizade de sempre.

À minha mãe, ao meu pai e à minha irmã Inês, sem os quais não conseguiria ter atingido esta meta, por fazerem de mim a pessoa que sou hoje, por acreditarem sempre em mim e me animarem em momentos menos bons, pela união e partilha, pelos abraços e palavras curativas, pelo otimismo que consegue sempre mover os muros que construo, e por tornarem o meu dia sempre melhor, mesmo a 2000 km de distância.

A todos os Dutras e os Lopes, aos presentes e às minhas estrelas, obrigada por todo o amor e união e obrigada pela alegria e energia tão habituais que nos caracterizam.

Desejo também agradecer às seguintes instituições:

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

Ao Instituto de Bioengenharia e Biociências (iBB) do Instituto Superior Técnico (IST).

RESUMO

O desenvolvimento de novos materiais e tecnologias de fabrico têm levado ao aparecimento de diferentes morfologias de micro defeitos superficiais extremamente difíceis de detetar. Neste contexto, tem sido desenvolvida uma técnica inovadora de Ensaio Não Destrutivo (END) que pretende utilizar células bacterianas (CB) como indicadores de micro defeitos superficiais. Este esforço pode representar, pela primeira vez desde a 2ª Grande Guerra, a introdução de um novo princípio físico nos END: o fenómeno biológico. Atualmente há vários aspetos da técnica que necessitam de desenvolvimento, nomeadamente, a interação das bactérias com outros materiais e as condições para a sua utilização fora de laboratório. Pretendeu-se aumentar o conhecimento sobre a interação bactéria-material, determinando os respetivos limiares de detetabilidade, identificar e testar novas aplicações industriais ou condições superficiais e desenvolver meios para facilitar o processo de inspeção em ambiente industrial. A bactéria *Rhodococcus erythropolis* DCL14 foi testada em diversos materiais, destacando-se o nióbio, a liga CuAlMn, revestimentos superficiais e materiais com diferentes fases cristalinas. Foi também desenvolvido e testado um protótipo customizado para a etapa da inspeção. Concluiu-se que a topografia é preponderante no comportamento das CB e que a fase martensítica ou austenítica da liga CuAlMn parece influenciar os resultados da inspeção.

PALAVRAS CHAVE

Ensaio Não Destrutivo (END)

Células Bacterianas (CB)

Hidrofobicidade

Biomédica

ABSTRACT

The emergence of new materials and manufacturing techniques have led to the appearance of surface micro defects with different morphologies extremely difficult to detect. In this context it has been developed an innovative technique of Non-Destructive Testing (END) using bacterial cells (CB) as micro defects indicators. This effort may represent and introduce, for the first time since 2nd World War, a new physical principle in END: the biological phenomenon. Currently, there are several details of the technique that have to developed and studied, in particular, the interaction between bacteria and other materials and the correct conditions that allow their application outside the laboratory. It was intended to increase knowledge about bacterial-materials interaction, determining detectability thresholds, identify and test new industrial applications or surface conditions and develop new ways to ease the inspection process in an industrial environment. The bacterium *Rhodococcus erythropolis* DCL14 was tested in wide range of materials, niobium in particular, CuAlMn shape memory alloys, surface coatings and materials with different crystalline phases. It was also developed and tested a customized prototype for the inspection phase. It was concluded that topography is a preponderant parameter in CB behavior and that the martensitic or austenitic phases of CuAlMn seem to influence the results.

KEY-WORDS

Non-Destructive Testing (END)

Bacterial Cells (CB)

Hydrophobicity

Biomedical

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	VII
RESUMO	IX
PALAVRAS CHAVE.....	IX
ABSTRACT.....	XI
KEY-WORDS.....	XI
ÍNDICE	XIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XVII
ÍNDICE DE TABELAS.....	XXI
NOMENCLATURA	XXIII
Variáveis	XXIII
Siglas.....	XXIV
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Estado da Arte e Motivação.....	1
1.2 Objetivos.....	2
1.3 Resultados e Conclusões.....	3
1.4 Estrutura da Dissertação	4
2. REVISÃO DO ESTADO DA ARTE.....	5
2.1 Introdução.....	5
2.2 END por Líquidos Penetrantes	6
2.3 END utilizando Células Bacterianas	7
2.3.1 Ensaio Realizados.....	9
2.4 Teorias sobre a Adesão Bacteriana em Superfícies	14
2.4.1 Teoria DLVO clássica.....	15
2.4.2 Teoria Termodinâmica	18
2.4.3 Teoria xDLVO	19
2.4.4 Considerações finais.....	19
2.5 Futuras Aplicações.....	21

2.5.1	Biomédica.....	22
2.5.2	Geometrias Complexas: Turbina a Gás.....	27
2.5.3	Energias Renováveis: Turbina Eólica	27
2.5.4	Energias Renováveis: Células Fotovoltaicas.....	29
2.6	Revestimentos Livres de Crómio ou Cádmio	31
3.	PROCEDIMENTO E VALIDAÇÃO EXPERIMENTAL.....	33
3.1	Introdução.....	33
3.2	Preparação dos Provetes	34
3.2.1	Materiais Utilizados	34
3.2.2	Preparação dos Provetes.....	36
3.3	Células Bacterianas Utilizadas	43
3.4	Ensaio Experimentais com CB.....	44
3.4.1	Alumínio AA 1100.....	46
3.4.2	AISI 316L.....	47
3.4.3	Nióbio.....	48
3.4.4	NiTi	51
3.4.5	CuAlMn (austenítico e martensítico)	54
3.4.6	Fio de CuAlMn.....	58
3.4.7	Moeda de 1€.....	60
3.4.8	Moeda de 0,10€.....	62
3.4.9	Moeda de 0,02€.....	63
3.4.10	Junta Bimetálica.....	65
3.4.11	Ferro Fundido.....	68
3.4.12	Pirite.....	70
3.4.13	Aço Duplex (UNS S32101)	71
3.4.14	Fe-Ni com estrutura Widmanstätten	73
3.4.15	Platinado	76
3.4.16	Provetes com revestimentos da indústria aeronáutica.....	78
3.4.17	PLA	83
3.4.18	CD e DVD.....	85
4.	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE EQUIPAMENTO CUSTOMIZADO	89
4.1	Introdução.....	89
4.2	Conceção do Equipamento Customizado	90
5.	CONCLUSÕES E PROPOSTAS DE DESENVOLVIMENTOS FUTUROS	95
5.1	Introdução.....	95
5.2	Conclusões.....	96

5.3 Propostas de Desenvolvimentos Futuros	99
BIBLIOGRAFIA.....	101

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 – Metodologia de aplicação da técnica [7].	8
Figura 2.2 – Variantes da etapa 5 usando: a) Radiação ultravioleta; b) Agente bactericida [7]. ..	9
Figura 2.3 – Matriz de defeitos: a) esquemática; b) no alumínio; c) no aço; d) no cobre [7].	9
Figura 2.4 – Variação do limite de detecção de defeitos, com variação do tempo de penetração [7].	10
Figura 2.5 – Esquema de representação da dupla camada elétrica (EDL), evidenciando a camada de Stern e a camada difusa.	16
Figura 2.6 – Variação da energia livre em função da separação entre coloides, de acordo com a teoria DLVO clássica. (adaptado de [49]).....	17
Figura 2.7 – Influência da adesão das bactérias <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>S. epidermidis</i> após 1h de incubação sobre várias superfícies de PMMA: superfície perfeitamente polida e superfícies lixadas com P1200, P400 e P120 (adaptada de [16]).	21
Figura 2.8 – Evolução da quantidade de bactérias <i>S. aureus</i> com as lavagens efetuadas em amostras com e sem defeitos [20].	22
Figura 2.9 – a) Amostra teste contaminada com fungos; b) Amostra com defeitos induzidos durante a cirurgia onde é visível a contaminação por fungos, mesmo após a desinfecção da superfície [20].	22
Figura 2.10 – Exemplos de defeitos encontrados nas aberturas dos implantes em estudo [20]. ..	23
Figura 2.11 – Exemplos de falha de a) implante femoral – placa à compressão; b) implante femoral – placa com parafusos (“nail-plate”); c) implante para reconstituição do maxilar; d) cabos de nitinol [22].	24
Figura 2.12 – Defeitos de fabrico na superfície do parafuso [22].	24
Figura 2.13 – a) Defeitos superficiais e corrosão na superfície de fratura de um cabo de nitinol; b) Pormenor da fissura de um cabo de nitinol [22].	25
Figura 2.14– Imagens SEM da adesão das MSC após 4h de cultura: a) visível preferência pelo padrão dentrítico da ZS por parte das MSC; b) MSC depositadas segundo o padrão dentrítico na fronteira entre ZTA/ZS ; c) preferência das MSC pelos poros do MB; d) MSC depositadas nas estrias da ZS rugoso; e) MSC depositadas aleatoriamente na ZS polido [23].	26
Figura 2.15 – Pormenor da micrografia do ferro fundido nodular [26].	28

Figura 2.16 – Medição (micro escala) altamente sensível da emissão de luz difusa usando o SNOM [47].....	29
Figura 2.17 – Micrografia de (a) cavidade superficial; (b) deslocação cristalográfica; (c) fissuras superficiais; (d) defeitos devido ao microplasma; (e) zonas fundidas [28].....	30
Figura 3.1 – Representação ilustrativa que relaciona o ângulo de contacto (θ) e o respetivo grau de hidrofobicidade dos materiais.....	35
Figura 3.2 – Provetes por ordem crescente de hidrofobicidade.	36
Figura 3.3 – Representação esquemática das matrizes de indentações no provete.	37
Figura 3.4 – Defeito padrão com a representação das dimensões de L e P.....	37
Figura 3.5 – Materiais selecionados segundo os fatores que influenciam o comportamento das bactérias (adaptado de [41]).	40
Figura 3.6 – Resultados dos ensaios após deposição de: a) CB negativas; b) CB positivas; c) CB neutras.	46
Figura 3.7 – Uma das três matrizes do provete após deposição de a) CB negativas; b) CB positivas.	47
Figura 3.8 – Matrizes do provete não polido de nióbio após deposição de a) CB negativas; b) CB positivas.....	48
Figura 3.9 – Resultados dos ensaios no provete com polimento (P2500), após deposição de: a) CB negativas; b) CB positivas.	49
Figura 3.10 – Matriz do provete de nióbio perfeitamente polido, onde é possível verificar a nitidez dos defeitos devido à reduzida rugosidade superficial.....	49
Figura 3.11 - Resultados nos ensaios com o novo provete perfeitamente polido com: a) CB negativas; b) CB neutras; c) CB positivas.....	50
Figura 3.12 – a) Esquema ilustrativo das filas de indentações no provete de NiTi, com as respetivas regiões nas fases austenítica (A) e martensítica (M). Salienta-se que as indentações não estão à escala nem em número correto (são meramente figurativas); b) Provete de NiTi sem CB.	51
Figura 3.13 – Defeitos das filas com carfas de indentações maiores (1 kg e 0,3 kg), após deposição de: a) CB negativas; b) CB positivas.	52
Figura 3.14 – Resultados dos novos ensaios no provete de NiTi com deposição de: a) CB negativas; b) CB neutras; c) CB positivas.....	53
Figura 3.15 – Provete sem bactérias com corte a 45°: a) CuAlMn M; b) CuAlMn P.	55
Figura 3.16 – Imagens da zona soldada do fio de CuAlMn, onde é evidente o tamanho de grão de menor dimensão, devido à ação do laser, em comparação com o tamanho dos grãos circundantes.	58
Figura 3.17 – Resultado dos ensaios após deposição de: a) CB negativas; b) CB neutras; c) CB positivas.....	59

Figura 3.18 – Matrizes do material do núcleo da moeda (zona riscada), após deposição de a) CB negativas; b) CB positivas.....	60
Figura 3.19 – Matrizes do material no núcleo da moeda (zona não riscada), após deposição de a) CB negativas; b) CB positivas.	61
Figura 3.20 – Matrizes da coroa da moeda (zona não riscada), após deposição de a) CB negativas; b) CB positivas.....	61
Figura 3.21 – Resultados dos ensaios realizados nas matrizes da moeda de 0,10€ com deposição de a) CB negativas; b) CB positivas.....	62
Figura 3.22 – Filas de indentações no aço (topo) e no revestimento de cobre (baixo), sem aplicação de CB.....	63
Figura 3.23 – Resultados dos ensaios na matriz de aço, após deposição de a) CB negativas; b) CB positivas.....	63
Figura 3.24 – Resultados dos ensaios realizados na matriz de cobre, após deposição de a) CB negativas; b) CB positivas.....	64
Figura 3.25 – Quadro de materiais com os seus respetivos potenciais eletroquímicos (vermelho – materiais utilizados no primeiro provete; azul – materiais utilizados no segundo provete).....	65
Figura 3.26 – Resultados dos ensaios realizados no primeiro provete da junta bimetálica (Al/Mg) após deposição de a) CB negativas; b) CB positivas.	66
Figura 3.27 – Resultados dos ensaios realizados na junta bimetálica Mg/Cu após deposição de: a) CB negativas; b) CB neutras; c) CB positivas.	67
Figura 3.28 – Ferro fundido cinzento, após contraste com solução Nital 4%.....	68
Figura 3.29 – Resultados dos ensaios: a) sem CB (luz fluorescente); b) CB negativas (luz fluorescente); c) CB neutras (luz fluorescente + visível); d) Biocorrosão na superfície do provete.	69
Figura 3.30 – Imagens pormenorizadas da superfície da pirite.....	70
Figura 3.31 – a) Material sem CB; b) CB negativas; c) CB neutras; d) CB positivas.	70
Figura 3.32 – a) Defeito tipo risco ainda sem CB; b) Pormenor da zona do defeito onde serão depositadas as CB; c) d) Pormenores do defeito riscado após contraste com solução Marble (1g CuSO ₄ + 5ml HCl + 5 ml H ₂ O).....	71
Figura 3.33 – Resultados dos ensaios após deposição de: a) CB negativas; b) CB neutras; c) CB positivas.....	72
Figura 3.34 – Imagem representativa da estrutura Widmanstätten, onde se distingue a kamacite (lamelas cinzento escuras) da taenite (lamelas brancas).	73
Figura 3.35 – Imagens da superfície do provete após contraste com ataque químico Nital 4%.	74
Figura 3.36 – Resultados dos ensaios com deposição de: a) CB negativas; b) CB neutras; c) CB positivas.....	75
Figura 3.37 – Imagem ilustrativa dos platinados (assinalados) e da peça que os suporta.....	76

Figura 3.38 – a) Matriz de defeitos sem CB; b) Pormenor da região exterior do provete onde prevalecem os defeitos devido à passagem de elevada corrente elétrica.	76
Figura 3.39 – Resultados dos ensaios após deposição de: a) CB negativas; b) CB neutras; c) CB positivas.....	77
Figura 3.40 – Resultados dos ensaios com o provete Branco com deposição de: a) CB negativas; b) CB neutras; c) CB positivas.	79
Figura 3.41 – Resultados dos ensaios com o provete Cinza com deposição de: a) CB negativas; b) CB neutras; c) CB positivas.	80
Figura 3.42 – Resultados dos ensaios com o provete Dourado com deposição de: a) CB negativas; b) CB neutras; c) CB positivas.	81
Figura 3.43 – Resultados dos ensaios com o provete Cinza Escuro com deposição de: a) CB negativas; b) CB neutras; c) CB positivas.....	82
Figura 3.44 – Superfície do PLA antes da deposição de CB: a) com luz visível; b) com luz fluorescente.	83
Figura 3.45 – Resultados dos ensaios após deposição de CB com potencial negativo: a) superfície sem quaisquer CB; b) pormenor de um defeito sem CB.	84
Figura 3.46 – Resultados do ensaio após deposição de CB positivas, onde são perceptíveis dois defeitos sem CB.	84
Figura 3.47 – a) Fotografia à superfície do material antes da remoção do excesso de suspensão bacteriana; b) Superfície do material após a etapa de remoção do excesso.	85
Figura 3.48 – Imagem esquemática, ilustrando as diferenças entre as indentações do Laser em diferentes dispositivos, com destaque para o CD e DVD, uma vez que foram os provetes ensaiados.	85
Figura 3.49 – Resultados dos ensaios com deposição de: a),b),c) CB negativas; d) CB positivas.	86
Figura 3.50 – Resultados da aplicação de CB negativas (sem remoção do excesso de suspensão) na superfície de alumínio de um DVD.....	87
Figura 4.1 – Imagem ilustrativa do microscópio Olympus CX40 utilizado nos ensaios com CB, no iBB (IST).....	90
Figura 4.2 – Mighty Scope 5M da Aven Tools sustentado pelo suporte xyz.....	91
Figura 4.3 – Comparação entre a gama de ampliações do microscópio Olympus CX40 (iBB) e do Mighty Scope, da Aven Tools (NTI).	91
Figura 4.4 – Montagem final do equipamento customizado.	92
Figura 4.5 – Representação esquemática da polarização natural da luz incidente numa superfície [45].	93
Figura 4.6 – Representação esquemática do processo de seleção das lentes polarizadas linearmente [46]	93

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 – Parâmetros experimentais com os melhores resultados dos ensaios com campos elétricos aplicados por Diogo Carvalho, onde foi assinalado o material com o menor limiar de detetabilidade (adaptado de [3]).	11
Tabela 2.2 – Resultados obtidos com um provete com diferentes rugosidades (ampliação de 150x) [3].	12
Tabela 2.3 – Melhores resultados experimentais de Patrick Inácio, onde foi assinalado o material com menor limite de detetabilidade (adaptado de [4]).	13
Tabela 2.4 – Resultados obtidos por Alexandre Costa, estando assinalado o material cujo limiar de detetabilidade foi menor (adaptado de [5]).	14
Tabela 2.5 – Variáveis que controlam a adesão das bactérias ao nível de morfologia superficial, propriedades físico-químicas, condições do ambiente e a presença de agentes patogénicos [48].	20
Tabela 3.1 – Alguns materiais a ensaiar e as suas propriedades.	34
Tabela 3.2 – Esquema representativo das indentações embutidas nos provetes.	36
Tabela 3.3 – Dimensões dos defeitos nos diferentes materiais.	38
Tabela 3.4 – Descrição das principais razões para a realização dos ensaios, particularmente para cada provete.	41
Tabela 3.5 – Propriedades da bactéria utilizada nos ensaios laboratoriais [4].	43
Tabela 3.6 – Outras características das bactérias <i>Rhodococcus erythropolis</i> DCL 14.	43
Tabela 3.7 – Planificação dos ensaios efetuados.	44
Tabela 3.8 – Resultados dos ensaios com CuAlMn (M e P), com corte a 0°.	54
Tabela 3.9 – Resultados dos ensaios com CuAlMn (M e P), com corte a 45°.	56
Tabela 3.10 – Resultados dos ensaios com CuAlMn (M e P), com corte a 90°.	57
Tabela 3.11 – Características dos revestimentos dos provetes fornecidos pela OGMA – Indústria Aeronáutica de Portugal, S.A.	78
Tabela 4.1 – Requisitos funcionais do equipamento dedicado à inspeção visual.	90
Tabela 5.1 – Resultados dos ensaios experimentais com CB.	96

NOMENCLATURA

Variáveis

A	Constante de Hamaker
A_{sup}	Área superficial do defeito
I	Força Iônica
d	Distância entre célula e substrato
L	Lado do defeito
P	Profundidade do defeito
r	Raio da célula (forma esférica)
V_A	Força de interação de van der Waals
V_R	Força de interação da EDL
V	Volume do defeito
γ	Tensão superficial
ξ	Potencial zeta
ΔG	Energia livre global

Siglas

AA	<i>Aluminium Alloy</i>
AISI	<i>American Iron and Steel Institute</i>
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
AZ	<i>Magnesium Alloy</i>
MB	Material Base
BSAA	<i>Boric Sulfuric Acid Anodizing</i>
CB	Células Bacterianas
CCD	<i>Charge-Couple Device</i> – Dispositivo de Carga Acoplada
CVD	<i>Chemical Vapor Deposition</i>
DEMI	Departamento de Engenharia Mecânica e Industrial
DLVO	Deryagin-Landau-Verwey-Overbeek
EDL	<i>Electric Double Layer</i>
ELV	<i>End of Life Vehicle</i> (2000)
END	Ensaio Não Destrutivo
FCT-UNL	Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa
GLARE™	<i>GLAss-REinforced Fibre Metal Laminate</i>
ZTA	Zona Termicamente Afetada
iBB	Instituto de Bioengenharia e Biociências
INCONEL™ 9095	Super Liga Níquel-Crómio
IST	Instituto Superior Técnico
IVD	<i>Ion Vapor Deposition</i>
LBIC	<i>Laser Beam Induced Current</i>
LED	Díodo de Emissão de Luz
LP	Líquidos Penetrantes
MSC	<i>Mesenchymal Stem Cell</i>
OSHA	<i>Occupational Safety and Health Administration</i>
PAA	<i>Phosphoric Acid Anodizing</i>
PLA	Ácido Poliláctico
PMT	<i>PhotoMultiplier Tube</i>
PSA	<i>Phosphoric Sulphuric acid Anodising</i>

PTFE	Politetrafluoretileno
PVD	<i>Physical Vapor Deposition</i>
REACH	<i>Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals (2006)</i>
RoHS	<i>Restriction of Hazardous Substances (2006)</i>
SEM	<i>Scanning Electron Microscope</i>
SANS	<i>Small Angle Neutron</i>
SNOM	<i>Scanning Near-Field Optical Microscope</i>
TBC	<i>Thermal Barrier Coating</i>
TSA	<i>Tartaric Sulphuric acid Anodising – Anodização Sulfúrico-Tartárica</i>
UV	Ultravioleta
xDVO	Extensão da teoria Deryagin-Landau-Verwey-Overbeek
WEEE	<i>Waste of Electronic and Electrical Equipment (2012)</i>
ZS	Zona Soldada

1. INTRODUÇÃO

1.1 Estado da Arte e Motivação

Com os desenvolvimentos na área da engenharia dos materiais e processos de fabrico, a miniaturização de produtos e componentes (escala micro e nano) introduziu defeitos com diferentes morfologias e dimensões, exigindo técnicas de Ensaio Não Destrutivo (END) novas e mais fiáveis, precisas, ecológicas e económicas, que colmassem as limitações das técnicas de END já existentes (raio-x, ultrassons, correntes induzidas, líquidos penetrantes ou partículas magnéticas).

Neste contexto, tem vindo a ser desenvolvida, no Núcleo de Tecnologia Industrial (NTI) do Departamento de Engenharia Mecânica e Industrial (DEMI) da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa (FCT-UNL), uma técnica pioneira que pretende introduzir fenómenos biológicos (células bacterianas) no ramo da deteção de defeitos (END), devido às características naturais destes microrganismos (e. g. tamanho reduzido, mobilidade e aderência ao material).

O projeto foi iniciado em 2010 pelo Doutor Telmo Santos, professor na FCT-UNL, e pela Doutora Carla de Carvalho, investigadora principal do Instituto de Bioengenharia e Biociências (iBB) do Instituto Superior Técnico (IST), contando com o apoio financeiro da Fundação para a Ciência e a Tecnologia. Neste seguimento, diversos alunos contribuíram para ser desenvolvida a técnica, sendo que o primeiro trabalho foi realizado por João Borges [1], em 2011, onde foi possível validar os pressupostos da técnica, concluindo-se ser promissora na deteção de micro defeitos, ainda que de impossível aplicação em materiais porosos.

No ano seguinte, Bruno Mateus [2] desenvolveu protótipos de equipamento para aplicação de campos elétricos e magnéticos, concluindo que melhoram a mobilidade das células bacterianas (CB). Ainda no mesmo ano, Diogo Carvalho [3] deu continuidade ao desenvolvimento da técnica ao realizar novos ensaios, concluindo o tempo ótimo de aplicação dos campos externos e a utilidade das CB para caracterização de superfícies com rugosidades.

Posteriormente, em 2014, Patrick Inácio [4] e Alexandre Costa [5] desenvolveram novos protótipos de equipamento de aplicação de campos elétricos e magnéticos e validaram-nos, experimentalmente, numa série de ensaios com diferentes materiais com forte interesse industrial, tais como ligas de titânio e magnésio, NiTi, GLARE™ e fibra de carbono.

Neste seguimento, foram lançados quatro artigos científicos [6–9] em revistas internacionais conceituadas, tais como a *NDT & E International* e a *Welding in the World*, onde foram apresentados os principais resultados dos trabalho anteriormente mencionados

Por fim, já em 2015, Pedro Pata [10] ampliou este leque de materiais ensaiados, onde se podem encontrar a superfície de um disco rígido, INCONEL™ 9095 (níquel-crómio), a liga de cobalto-crómio, prata 835 (83.5%) e ouro (24kt e 9kt), bem como uma diversos provetes de alumínio com diferentes acabamentos superficiais (anodização e pintura), comprovando a capacidade das CB na caracterização de superfícies e deteção de micro defeitos.

Contudo, a técnica necessita de mais investigação de forma a ser possível relacionarem-se os resultados já obtidos com os parâmetros dos ensaios, bem como compreender de que modo determinadas características do material (estrutura cristalográfica, química, topografia e tipo de defeitos) influenciam o comportamento das CB. Deste modo, pretendeu-se, com o presente trabalho, contribuir para estabelecer as relações ainda pouco consolidadas entre o comportamento das bactérias e a morfologia dos defeitos e as características da superfície do material e fez-se um levantamento de possíveis aplicações para esta recente e inovadora técnica de deteção de defeitos.

1.2 Objetivos

Considerando os trabalhos realizados até à data, os principais objetivos desta dissertação podem dividir-se em tecnológicos e científicos.

Os objetivos científicos definidos para esta dissertação foram:

- 1) Aprofundar o conhecimento científico desta nova técnica, nomeadamente ao definir os parâmetros que condicionam o comportamento das CB;
- 2) Procurar relacionar conceitos científicos já existentes da microbiologia com os fenómenos que ocorrem durante a aplicação desta técnica de END.

Os objetivos de carácter mais tecnológico foram:

- 1) Definir possíveis aplicações da técnica, quer na deteção de micro defeitos, quer na caracterização superficial de materiais;

- 2) Desenvolvimento e concepção de um equipamento customizado expedito, para a etapa da inspeção das CB.

Trabalho Realizado

De forma a cumprir com os objetivos previamente definidos, começou-se por realizar uma pesquisa bibliográfica na área dos END com deposição de CB. Uma vez que a literatura, para este tema concretamente, se encontra numa elaboração contínua, o cerne da pesquisa bibliográfica foi alargado na direção do levantamento de possíveis aplicações da técnica e, numa outra vertente, na compreensão do processo de adesão da bactéria à superfície.

Posteriormente procedeu-se à criteriosa seleção de materiais da engenharia não convencionais e ainda não ensaiados, procurando aumentar o leque de provetes ensaiados e avaliar o comportamento das CB, tendo em conta os parâmetros que influenciam o sucesso da técnica (estrutura cristalográfica, química, topografia do material e tipo de defeito).

Neste seguimento, deu-se início à preparação, caracterização e inspeção dos provetes e dos defeitos padrão e foram realizados os ensaios com deposição de bactérias *Rhodococcus erythropolis* DCL14, com diferentes potenciais zeta, nas instalações do iBB (IST).

Por fim, desenvolveu-se um equipamento customizado para a etapa de inspeção da peça ensaiada, pretendendo impulsionar a industrialização da técnica. Foi feita a montagem das componentes do equipamento e a sua adaptação aos requisitos funcionais definidos.

1.3 Resultados e Conclusões

No seguimento desta investigação, comprovou-se a capacidade das CB na revelação topográfica de materiais e obtiveram-se alguns resultados que apontam para a sua preferência pela fase martensítica dos materiais.

Por outro lado, verificou-se que, após os ensaios com o provete de ferro fundido cinzento, as CB pareceram dispor-se preferencialmente nas matrizes ferríticas, o que poderá evidenciar a influência do fator da química do material.

Adicionalmente, validou-se a aplicação da técnica para novos materiais como o nióbio, o cuproníquel utilizado no fabrico de moedas e em minerais, como a pirite. Porém, em provetes que combinavam materiais com potenciais eletroquímicos opostos (Cu/Mg) não se verificou qualquer

alteração no comportamento das CB, mas comprovou-se que este fator acelerou o processo de corrosão do magnésio e limitou a deposição de CB no cobre.

Relativamente ao processo de adesão bacteriana, aprofundaram-se os conhecimentos em relação à influência da hidrofobicidade na capacidade de adesão das CB aos materiais ensaiados, concluindo que este poderá ser um fator importante para prever o comportamento das mesmas.

Por fim, desenvolveu-se um equipamento customizado de inspeção, cuja primeira validação experimental, evidencia a sua potencialidade na observação dos defeitos, impulsionando a industrialização da técnica de END com CB.

1.4 Estrutura da Dissertação

A presente tese encontra-se organizada em cinco capítulos, ao longo dos quais se encontram repartidas as matérias tratadas.

No Capítulo 2 é apresentado o resultado da pesquisa bibliográfica realizada, onde é feito um enquadramento da técnica em estudo (END com CB) do ponto de vista do trabalho já realizado na área e são apresentadas possíveis aplicações da técnica. Deste modo, o capítulo é dividido em quatro partes distintas: em § 2.2 e § 2.3 são abordadas as técnicas de END por Líquidos Penetrantes (LP) e a técnica em estudo usando CB, além de ser feita uma apresentação dos trabalhos e ensaios já realizados no âmbito desta nova técnica; em § 2.4 é feita uma apresentação das teorias referentes ao processo de adesão da bactéria ao substrato, destacando as limitações de cada uma e relacionando-as com a adesão das CB no âmbito da técnica de END; seguidamente, em § 2.5, é feito um levantamento de futuras aplicações da técnica, destacando a área da biomédica. Por fim, numa última parte (§ 2.6), é abordado o problema dos revestimentos cromados e anodizados e são apresentadas algumas soluções alternativas praticadas atualmente.

No Capítulo 3, em § 3.2, é feita uma apresentação e caracterização dos materiais dos provetes utilizados nos ensaios seguindo-se de uma descrição da preparação dos mesmos. Em § 3.3 é feita uma descrição das CB utilizadas nos ensaios e das suas principais propriedades. Finalmente, ao longo de § 3.4 são apresentados e analisados os resultados dos ensaios experimentais usando CB.

O Capítulo 4 integra a descrição e caracterização do equipamento customizado para a etapa de inspeção das CB, fazendo um enquadramento e um paralelo com o equipamento de inspeção utilizado até agora.

Por fim, as conclusões referentes ao trabalho realizado e as propostas para desenvolvimentos futuros seguem no Capítulo 5.

2. REVISÃO DO ESTADO DA ARTE

2.1 Introdução

Neste capítulo é apresentado o resultado da pesquisa bibliográfica realizada, sendo feita uma abordagem à técnica de END por líquidos penetrantes (§ 2.2) e END usando células bacterianas (§ 2.3), onde também são abordados e apresentados os ensaios até agora realizados (§ 2.3.1). Posteriormente, apresentam-se teorias sobre a adesão das CB à superfície do material (§ 2.4), com o objetivo de ser estabelecido um paralelismo com os fenómenos de adesão durante a técnica de END em estudo. Por fim, é feito um levantamento de possíveis aplicações para a técnica (§ 2.5) e são apresentados revestimentos alternativos aos revestimentos à base de cromo e cádmio (§ 2.6).

2.2 END por Líquidos Penetrantes

A origem da técnica dos líquidos penetrantes (LP) remonta ao século XIX, na qual as peças a inspecionar eram mergulhadas em óleo mineral durante algum tempo e, após a secagem da superfície, a peça era coberta com talco. O aparecimento de manchas de óleo no talco revelavam os defeitos existentes na superfície da peça [11]. No entanto, ao longo dos anos, houve necessidade de modificar e melhorar a técnica a fim de aumentar a penetração dos LP (por capilaridade), para serem detetados defeitos de menor dimensão, e de facilitar a deteção dos defeitos através da adição de corantes. Todas estas adaptações e melhorias tornaram a técnica por LP, hoje em dia, uma das mais usadas para deteção de defeitos superficiais numa variada gama de materiais, exceto em materiais porosos ou com elevada rugosidade.

Este tipo de END conta com um elevado número de aplicações devido à sua versatilidade e adaptabilidade a peças de diferentes dimensões e geometrias, sensibilidade para detetar descontinuidades superficiais e reduzidos custos e tempos de inspeção [11].

As principais propriedades dos penetrantes são:

- Capilaridade/molhabilidade;
- Coloração, permitindo visualizar o defeito;
- Viscosidade mínima de 5 centistokes, para que o penetrante consiga entrar nos defeitos;
- Baixa volatilidade e toxicidade, de modo a não evaporar nem ter efeitos secundários sobre o operador;
- Ponto de inflamação mínimo de 55 °C, por questões de segurança;
- Estabilidade térmica para não haver perda de brilho e cor;
- Inércia química para que o penetrante não reaja quimicamente com o material a inspecionar;
- Facilidade de remoção do excesso, mas garantindo que o penetrante permanece no defeito.

O procedimento a seguir para a realização de um ensaio por LP é constituído pelas seguintes etapas [4,10,11]:

- 1) **Preparação da superfície** – é fundamental uma limpeza prévia do objeto a inspecionar, de forma a ser removida a sujidade e a gordura presentes na superfície, evitando adulteração dos resultados do ensaio;
- 2) **Aplicação do penetrante** – a uma temperatura entre 15-50 °C, seleciona-se o método de aplicação mais eficaz (por imersão, aspersão com embalagens

pressurizadas, por pintura ou derrame), que dependerá da dimensão e forma da peça a inspecionar;

- 3) **Remoção do excesso de penetrante** – após o tempo de deposição, que poderá ir dos 5 aos 30 minutos, dá-se a remoção do excesso de penetrante da superfície. A técnica utilizada para a remoção (jato de água, solventes ou emulsificadores) dependerá do tipo de penetrante depositado, sendo necessário especial cuidado durante toda a etapa para que o penetrante não seja removido dos defeitos;
- 4) **Aplicação do revelador** – o revelador é aplicado ao longo de toda a superfície, formando uma fina e uniforme camada que absorve o penetrante dos defeitos e revela a posição dos mesmos após o tempo de revelação (varia entre 7 minutos e 2 horas para as descontinuidades mais pequenas);
- 5) **Inspeção e interpretação dos resultados** – após a deteção dos defeitos, é feita uma caracterização dos mesmos, de forma a averiguar se são (ou não) prejudiciais ao funcionamento da peça;
- 6) **Limpeza final** – após a realização do ensaio, a superfície deve ser devidamente limpa, de forma a não permanecerem vestígios do penetrante que podem comprometer uma futura aplicação (tinta, soldadura, etc.).

As aplicações desta técnica de END são bastante amplas tornando esta uma das técnicas mais utilizadas a nível industrial. Apesar das suas inúmeras vantagens, nomeadamente a deteção de descontinuidades de dimensões muito pequenas (e. g. limiar de detetabilidade para o cobre de 67 μm [4]), a esta técnica também estão associadas inúmeras desvantagens, tais como a não aplicabilidade a materiais porosos e a difícil deteção de defeitos cuja relação entre volume e área superficial (V/A_{sup}) é elevado [9]. Por isso, defeitos com elevada área disponível e reduzida profundidade são bastante limitativos para a técnica, uma vez que o penetrante pode ser removido durante a terceira etapa da metodologia da técnica. [9]. Além disso, muitos dos materiais que constituem estes líquidos são nocivos para o meio ambiente, tentando-se colmatar este problema através da criação de novos sintéticos mais “*eco-friendly*” ou a adaptar novas técnicas de inspeção

2.3 END utilizando Células Bacterianas

Com o objetivo de explorar as propriedades naturais das bactérias, tais como a sua reduzida dimensão (~1 μm), grande capacidade de penetração em fissuras, mobilidade, aderência, fluorescência natural e a possibilidade de aplicação de campos magnéticos e elétricos [7], esta inovadora e pioneira técnica de END recorrendo a células bacterianas, iniciada no Núcleo de Tecnologia Industrial do DEMI da FCT-UNL, pretende complementar a técnica de LP, uma vez

demonstrada a capacidade de detetar defeitos de menor dimensão em materiais ferrosos e não ferrosos, mas não porosos [1,3–5,10].

De acordo com as investigações realizadas no Núcleo de Tecnologia Industrial do DEMI (FCT-UNL), a metodologia de aplicação desta nova técnica é semelhante à técnica dos LP, apresentando as seguintes etapas [7]:

- 1) Identificação da área a inspecionar;
- 2) Limpeza da superfície;
- 3) Aplicação de uma solução com CB;
- 4) Penetração e aderência destes microrganismos durante cerca de 4 minutos (possibilidade de aplicação de campos externos para aumentar a sua mobilidade e aderência aos defeitos);
- 5) Remoção do excesso de bactérias;
- 6) Revelação;
- 7) Inspeção e interpretação de resultados;
- 8) Limpeza e esterilização da peça inspecionada.

Estas mesmas etapas são ilustradas Figura 2.1:

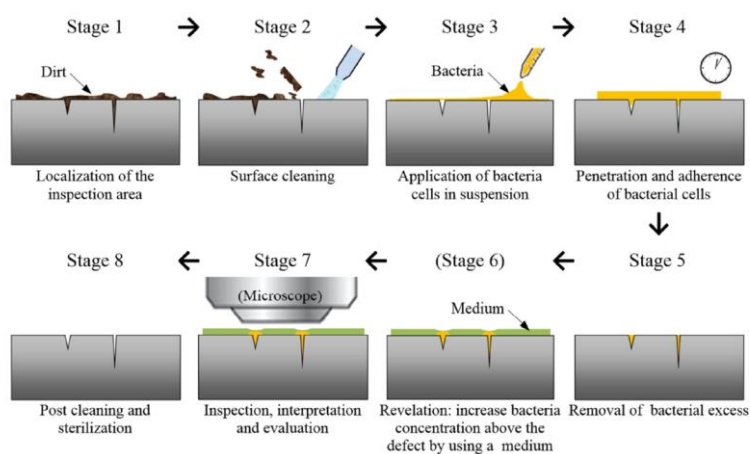


Figura 2.1 – Metodologia de aplicação da técnica [7].

A etapa mais importante para o êxito da técnica é a da penetração das CB no defeito (quarta etapa, *stage 4*), existindo diversas variantes desta etapa que influenciam os resultados obtidos. Numa variante mais simples, a mobilidade e penetração das células bacterianas deve-se unicamente à molhabilidade, capilaridade e viscosidade do meio. Em outras variantes, a mobilidade e penetração das mesmas é reforçada pela ação de campos elétricos ou magnéticos tal como foi estudado por Bruno Mateus e Patrick Inácio [2,4], de acordo com as propriedades das CB utilizadas.

A etapa de remoção do excesso de CB na suspensão (quinta etapa, *stage 5*) também é garantida através de diferentes meios (Figura 2.2) desde a ação de radiação ultravioleta bactericida incidente nas CB (comprimento de onda de ~ 250 nm), cujo ângulo de incidência (θ) sobre a superfície pode variar entre 0° e 90° de forma seletiva até à deposição, ou pode ser garantida através da aplicação de um agente bactericida. Além destas variantes, também é possível uma remoção mecânica do excesso (por exemplo, com um pano).

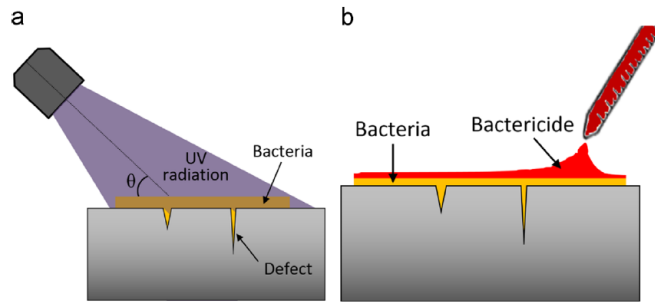


Figura 2.2 – Variantes da etapa 5 usando: a) Radiação ultravioleta; b) Agente bactericida [7].

Relativamente à etapa da inspeção, interpretação e avaliação (sétima etapa, *stage 7*), a análise da amostra pode ser feita a olho nu ou com recurso a um microscópio, além da possibilidade de serem utilizadas CB fluorescentes para auxiliar a visualização e deteção dos defeitos.

2.3.1 Ensaios Realizados

Os primeiros ensaios foram realizados em aço inoxidável (AISI 304L), liga de alumínio (AA 1100) e em cobre, materiais comumente usados na engenharia e na micro fabricação [1,7]. Na Figura 2.3 são ilustrados os defeitos nos três materiais, bem como o esquema de uma matriz de defeitos.

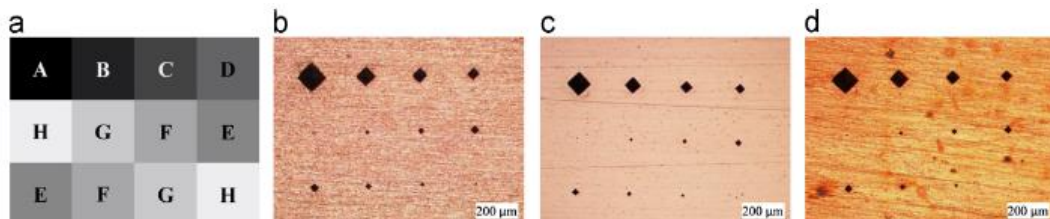


Figura 2.3 – Matriz de defeitos: a) esquemática; b) no alumínio; c) no aço; d) no cobre [7].

Os resultados destes primeiros ensaios são apresentados na Figura 2.4, verificando-se que, com o aumento do tempo de penetração das bactérias, os defeitos detetados nos materiais são cada vez menores, excetuando no cobre devido ao seu efeito antibacteriano. Esta característica é evidenciada para tempos de penetração superiores a três minutos, sendo que ao minuto cinco verifica-se pouca quantidade de CB na superfície.

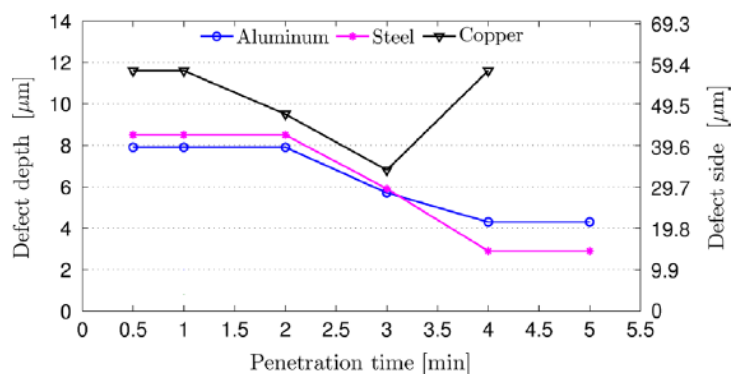


Figura 2.4 – Variação do limite de detecção de defeitos, com variação do tempo de penetração [7].

João Borges [1] foi pioneiro no estudo da influência da aplicação de campos elétricos e magnéticos durante a etapa de penetração das CB, com o objetivo de verificar se conduziam a melhores resultados, uma vez que já havia sido publicado um estudo, da autoria de Siores *et al.* [12], onde se analisou a relação entre as bactérias magnetotáticas com o campo magnético e defeitos riscados na superfície, especialmente pela sua capacidade de se orientarem conforme o campo magnético da Terra (de Sul para Norte). Apesar dos estudos levados a cabo por João Borges não terem sido conclusivos, foram um impulso para o estudo da influência dos campos externos na etapa da penetração das CB nos defeitos.

Posteriormente, Bruno Mateus [2] realmente concluiu que a aplicação de campos externos, com variação da sua direção e intensidade, favorecia a mobilidade e penetração das CB. Mais concretamente, a aplicação de um campo magnético ou elétrico na direção horizontal favorece a mobilidade das CB, ao passo que na direção vertical promove a penetração das mesmas. Estes resultados foram demonstrados num artigo da autoria do Doutor Telmo Santos [6], em 2016, que orientou toda a investigação dos alunos no âmbito deste projeto. Neste artigo as bactérias, sem aplicação de campos externos, apresentavam-se estáticas e, face à aplicação dos mesmos, a sua mobilidade e penetração nos defeitos era favorecida.

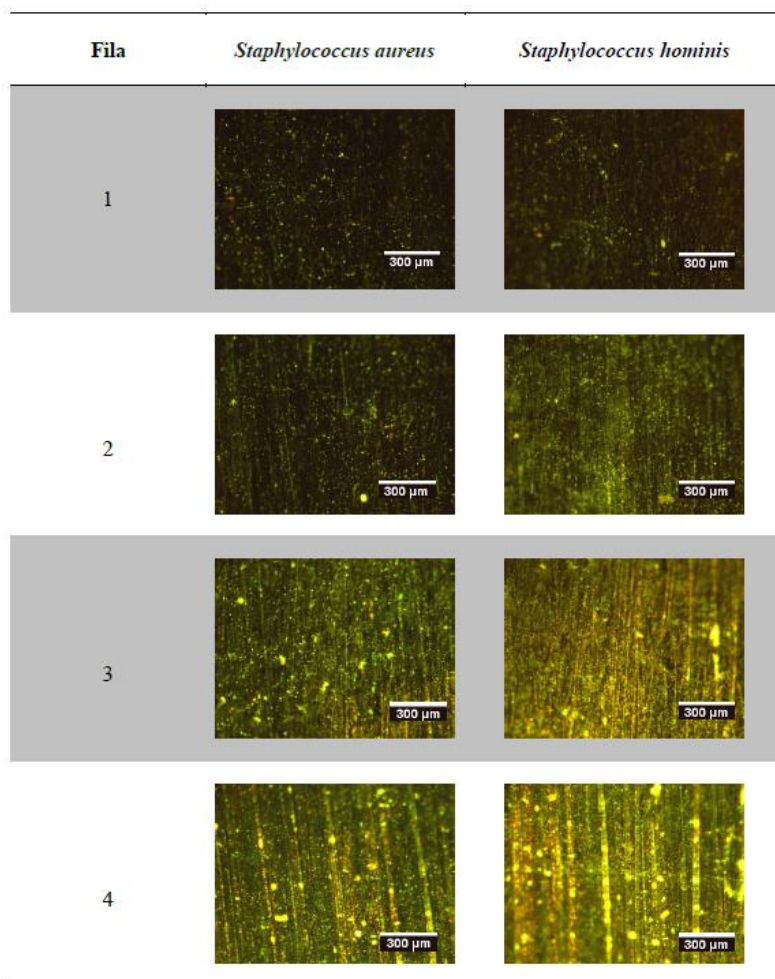
No mesmo ano de 2012, Diogo Carvalho [3] realizou ensaios com campos externos, obtendo maiores amplitudes de movimentos das CB através da aplicação de um campo elétrico, sendo que o material que conduziu a melhores resultados (com aplicação de campo elétrico,

magnético e sem aplicação de campo) foi o aço inoxidável 304 L, com um limiar de detectabilidade de apenas 9,6 μm (Tabela 2.1). Além disso, comprovou-se a aplicabilidade das CB na caracterização de superfícies com diferentes rugosidades (Tabela 2.2, p. 12). Em 2015, estas conclusões seriam enfatizadas e demonstradas por Telmo Santos, *et al.* [8].

Tabela 2.1 – Parâmetros experimentais com os melhores resultados dos ensaios com campos elétricos aplicados por Diogo Carvalho, onde foi assinalado o material com o menor limiar de detectabilidade (adaptado de [3]).

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.	1min. 0°	12,5
	<i>S. hominis</i>	1	40	4 min.	1min. 0°	
	<i>S. aureus</i>	2	40	4 min.	1min. 0°	
	<i>S. hominis</i>	2	40	4 min.	1min. 0°	
Aço inox 304 L	<i>S. aureus</i>	1	40	4 min.	1min. 0°	9,6
	<i>S. hominis</i>	1	40	4 min.	1min. 0°	
	<i>S. aureus</i>	2	40	4 min.	1min. 0°	
	<i>S. hominis</i>	2	40	4 min.	1min. 0°	
PMMA	<i>S. aureus</i>	1	40	4 min.	1min. 0°	-
	<i>S. hominis</i>	1	40	4 min.	1min. 0°	
	<i>S. aureus</i>	2	40	4 min.	1min. 0°	
	<i>S. hominis</i>	2	40	4 min.	1min. 0°	
Cobre	<i>S. aureus</i>	1	40	30 seg	1min. 0°	96,7
	<i>S. hominis</i>	1	40	30 seg	1min. 0°	
	<i>S. aureus</i>	2	40	30 seg	1min. 0°	
	<i>S. hominis</i>	2	40	30 seg	1min. 0°	

Tabela 2.2 – Resultados obtidos com um provete com diferentes rugosidades (ampliação de 150x) [3].



Dois anos depois, em 2014, Patrick Inácio [4] realizou ensaios com uma maior gama de materiais, onde se destacam o GLARE™ (compósito de alumínio e fibra de vidro), fibra de carbono, grafite IC5, magnésio (liga AZ31), liga NiTi e titânio (liga Ti-6Al-4V). Foram realizados ensaios com e sem aplicação de campos externos, sendo que o aço inoxidável 304 L continuou a ser o material com menor limiar de detetabilidade, desta vez juntamente com o titânio, tal como se pode observar na Tabela 2.3, na página seguinte (p. 13)

É importante referir que os ensaios realizados com o GLARE™ tiveram o objetivo de examinar e avaliar o comportamento das bactérias perante dois materiais diferentes. Os defeitos na camada de alumínio não foram detetados com muito sucesso, uma vez que o material possuía uma rugosidade superficial significativa e verificou-se uma mudança da fluorescência da fibra de vidro para um comprimento de onda próximo do corante das bactérias, impossibilitando a deteção dos defeitos neste material.

Tabela 2.3 – Melhores resultados experimentais de Patrick Inácio, onde foi assinalado o material com menor limite de detetabilidade (adaptado de [4]).

Material	Bactéria	Equipamento	Limiar de detectabilidade	
			Lado [μm]	Profundidade [μm]
Aço Inox 304	R. erythropolis -	Eq. \vec{B} triaxial com íman permanente	5,71	1,2
Alumínio	R. erythropolis -	Eq. \vec{E} horizontal e vertical	15,74	3,2
Cobre	R. erythropolis -	Eq. \vec{E} horizontal e vertical	9,7	2,0
Magnésio	R. erythropolis +	Eq. \vec{B} triaxial com íman permanente	27,0	5,5
Chumbo	R. erythropolis +	Eq. \vec{E} horizontal e vertical	54,6	11,0
Titânio	R. erythropolis -	Eq. \vec{B} triaxial com íman permanente	9,1	1,8

Posteriormente, Alexandre Costa [5] também realizou ensaios com variados materiais (níquel-titânio, carboneto de tungsténio, ouro, lentes oftálmicas), cujos resultados são sintetizados na Tabela 2.4, p. 14. Os resultados obtidos realmente provaram que é possível detetar defeitos numa variada gama de materiais, excetuando o carboneto de tungsténio, uma vez que contém cobalto na sua composição (antibacteriano) e as lentes oftálmicas. Também foi possível verificar que, com esta técnica de END, houve menos incidência de “falsos positivos” em comparação com a técnica de LP.

Por fim, Pedro Pata [10] realizou ensaios para deteção de defeitos com CB em outros materiais, de forma a ser ampliado o leque de limites de detetabilidade já conhecidos. Foram ensaiados materiais com tratamentos superficiais (alumínio anodizado e pintado, materiais revestidos a cobre e a ouro) e materiais com diferentes elementos químicos na sua constituição, tais como as ligas de chumbo/estanho e o ouro de 9 kt (liga 37.5% ouro e 62.5% cobre), de forma a comparar e analisar o comportamento das CB nesses materiais e nos materiais puros. Os menores limites de detetabilidade foram conseguidos para algumas ligas, como por exemplo as ligas cobalto-crómio e ouro 9 kt e a superliga INCONEL™ 9095 e para o alumínio anodizado.

Tabela 2.4 – Resultados obtidos por Alexandre Costa, estando assinalado o material cujo limiar de detabilidade foi menor (adaptado de [5]).

Material	Tipo de defeito	Ensaio	Bactéria	Limiar de detectabilidade L [μm] / P [μm]	Defeito
AA 1100	Micro indentações	A, B, C, D	<i>Rhodococcus erythropolis</i> -	11,1/2,2	H
AISI 316L	Micro indentações	C	<i>Rhodococcus erythropolis</i> -	15,6/3,2	F
	Nano indentações	A	<i>Rhodococcus erythropolis</i> -	5,3/0,4	L1
Titânio (grade 5)	Tipo risco	A	<i>Rhodococcus erythropolis</i> -	*	-
	Soldadura laser	A	<i>Rhodococcus erythropolis</i> +	*	-
Níquel-titânio	Tipo risco	C	<i>Rhodococcus erythropolis</i> -	*	-
	Soldadura laser	A	<i>Rhodococcus erythropolis</i> +	*	-
Carboneto de tungsténio	Micro indentações	A, C	<i>Rhodococcus erythropolis</i> -	-	-
Ouro	Outras morfologias de defeitos	A	<i>Rhodococcus erythropolis</i> +	*	-
AISI 316L brasado	Micro indentações	B	<i>Rhodococcus erythropolis</i> -	11,9/2,4	G
Lentes oftálmicas	Micro indentações/ Tipo risco	A, B	<i>Rhodococcus erythropolis</i> -	-	-
Padrões de sensibilidade	Fissuras	A	<i>Rhodococcus erythropolis</i> +	1/20	-

* A morfologia do defeito não permite a definição das dimensões L e P.

Legenda: A – sem aplicação de campo eléctrico ou magnético; B – PF_Btriaxial (ímãs permanentes); C – PF_Btriaxial_permanente; D – PF_eléctrico.

2.4 Teorias sobre a Adesão Bacteriana em Superfícies

A interação de bactérias com superfícies e a formação de comunidades bacterianas designadas por biofilmes podem ser prejudiciais em ambientes industriais, por limitarem a transferência de massa e energia, favorecendo a corrosão e a infeção de animais e plantas. No entanto, sistemas de tratamento de água e de bioremediação de tóxicos dependem deles. Apesar de não se conhecerem os tipos de interações estabelecidas durante o processo de adesão, este ainda não está totalmente compreendido. Deste modo, são apresentadas algumas teorias que preveem a adesão das bactérias a diferentes superfícies, bem como algumas das suas limitações.

A formação de biofilme numa superfície sólida por microrganismos pode dividir-se em quatro etapas principais: transporte até à superfície, adesão inicial, fixação à superfície e colonização [13].

A etapa do transporte da célula até uma superfície dá-se por difusão devido a movimentos Brownianos em fluidos em repouso, ou por convecção num fluido em movimento. Além disso, a aproximação pode ser facilitada em microrganismos que possuam apêndices extracelulares que aumentam a sua motilidade (flagelos, pilis) [23,24]. As bactérias de *Rhodococcus erythropolis* DCL14 utilizadas nos ensaios da técnica em estudo não apresentam este tipo de estruturas.

A etapa de adesão de bactérias a superfícies ocorre na sua proximidade (~50 nm), de forma a poderem interagir por forças de curto e longo alcance. A adesão a superfícies horizontais favorece o crescimento das bactérias [16], uma vez que a matéria orgânica em suspensão aquosa é gradualmente depositada na superfície, enriquecendo a sua concentração em nutrientes [14]. Esta adesão pode ser reversível ou irreversível. Apenas uma fração da população inicial que entra em contacto com a superfície irá aderir, dependendo de vários fatores tais como: tipo de superfície e de célula, temperatura e pressão locais, energia disponível e forças locais. Se as forças de repulsão forem superiores às de atração (e. g. forças de van der Waals, forças eletrostáticas e hidrofóbicas), as células abandonarão a superfície. Neste tipo de adesão inicial reversível, os microrganismos podem continuar a exibir movimentos Brownianos, por vezes culminando na sua desagregação devido a forças de corte ou pelo seu próprio movimento ativo. Relativamente à adesão irreversível, este já é um processo dependente do tempo (duração na ordem das horas), onde o microrganismo é ligado permanentemente à superfície, deixando de exibir movimentos Brownianos devido à produção de biopolímeros que ajudam no processo de fixação à superfície [14–16].

De modo a ser melhor explicado o processo de adesão bacteriana, nomeadamente em relação às forças intervenientes, têm sido usados três modelos teóricos para descrever este processo: teoria DLVO clássica, teoria Termodinâmica e uma adaptação da DLVO clássica (xDLVO).

2.4.1 Teoria DLVO clássica

A teoria DLVO clássica apresenta uma descrição quantitativa da estabilidade de uma suspensão coloidal lisofóbica. De acordo com a mesma, as partículas coloidais estão sujeitas a dois tipos de interações: interações atrativas de van der Waals e interações repulsivas da dupla camada elétrica (EDL) [15–17].

Deste modo, a energia potencial total de interação entre dois corpos (V_{total}) é resultante do balanço entre estas forças atrativas de van der Waals (V_A) e as forças da dupla camada elétrica (V_R), que geralmente são repulsivas, uma vez que, quando em solução, a maioria das superfícies adquire carga superficial negativa [15,16]:

$$V_{total} = V_A + V_R \quad (2.1)$$

Sendo que V_A , geralmente de atração, para uma superfície esférica é dada por:

$$V_A = -\frac{A \times r}{6 \times d} \quad (2.2)$$

onde A designa a constante de Hamaker, d é a distância que separa a célula e o substrato e, por fim, r é referente ao raio da célula (assumindo uma forma esférica para uma célula).

Faz-se, normalmente, a diferenciação dos tipos de forças que constituem as forças de van der Waals: forças de Keesom, forças de Debye e forças de London, sendo, na maioria dos casos, apenas referenciadas as últimas. Essas forças de London (dispersivas) são forças intermoleculares fracas que variam linearmente com a massa molar e na razão inversa com a distância à superfície [18].

A dupla camada elétrica, ou EDL, é uma região de grande densidade iónica formada em torno de cada partícula coloidal, quando esta imerge num líquido (Figura 2.5). A EDL é bastante afetada pela presença de iões e é particularmente importante em meios com baixo teor em sais/força iónica (I) [15,17]. Para meios com elevada força iónica, vigoram as forças de van der Waals (atrativas), independentemente da carga da superfície do coloide, e para meios com baixo teor em iões vigoram as forças repulsivas. A EDL é, então, composta por duas regiões com densidades iónicas diferentes que se formam em torno do coloide [15,16]:

- Camada de Stern – camada imóvel com grande densidade de iões adsorvidos à superfície da partícula coloidal. Esta pode estar carregada positivamente (superfície do coloide com carga negativa, atraindo iões de carga contrária) ou carregada negativamente (superfície do coloide com carga positiva, atraindo iões negativos);
- Camada difusa – camada formada por iões em menor concentração, mas ainda atraídas pelas forças de Coulomb.

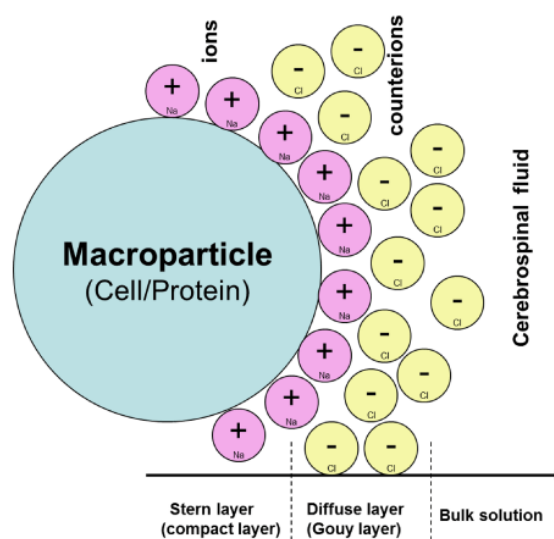


Figura 2.5 – Esquema de representação da dupla camada elétrica (EDL), evidenciando a camada de Stern e a camada difusa.

O plano que separa a EDL do meio envolvente designa-se plano de deslizamento, cujo potencial é designado por potencial zeta (ξ) e tem elevada importância para a não agregação das moléculas, uma vez que, segundo teoria DLVO, quanto maior o potencial zeta, maiores são as repulsões entre partículas coloidais.

Quando os coloides estão próximos do contacto com a superfície (~ 2 nm), o perfil da energia potencial de interação torna-se bastante atrativo (as forças de van der Waals superam as forças de repulsão) e é designado por “mínimo primário”, desencadeando o processo de adesão irreversível. Para distâncias maiores, o perfil de energia potencial passa por um pico máximo, decrescendo novamente até outro nível mínimo, menos acentuado, que é definido como “mínimo secundário”, onde se dá a adesão reversível (Figura 2.6) [15,17].

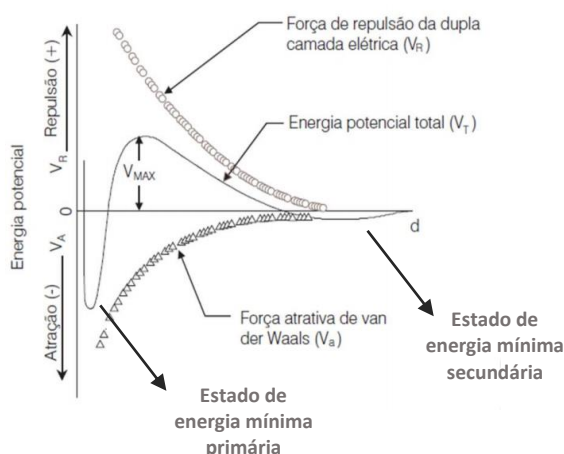


Figura 2.6 – Variação da energia livre em função da separação entre coloides, de acordo com a teoria DLVO clássica. (adaptado de [49])

A teoria DLVO clássica presume que as superfícies são perfeitamente lisas, obtendo-se energias de interação incorretas durante a adesão de coloides (no caso da técnica de END em estudo estes coloides tratam-se de CB) a superfícies que não o sejam, tais como superfícies com diferentes rugosidades [15,16,19], tal como as que foram ensaiadas no âmbito da técnica de END com CB. Além disso, as forças de interação contabilizadas por esta teoria (van der Waals e EDL), não permitem prever a adesão a curta distância nem definir as forças de curto alcance envolvidas nessa etapa da adesão, tais como as forças de interação hidrofóbicas, consideradas as mais importantes no processo de adesão bacteriana [15].

2.4.2 Teoria Termodinâmica

A teoria Termodinâmica [15,16] é a segunda abordagem físico-química usada para descrever a ligação das bactérias ao substrato, que contabiliza os vários tipos de interações atrativas e repulsivas (van der Waals e EDL), expressando-as do ponto de vista da equação termodinâmica de energia livre.

A adesão em meio aquoso de um microrganismo (bactéria) e uma superfície sólida só se estabelece se o filme de líquido entre as duas superfícies for removido, havendo o contacto efetivo das mesmas. Neste seguimento, a interface bactéria/líquido (BL) e a interface superfície de adesão/líquido (SL) terão que dar lugar à interface bactéria/superfície de adesão (BS) [15]. As forças hidrofóbicas entre células e superfície são, em geral, suficientes para repelir as moléculas de água entre elas, por forma a haver um contacto direto entre elas.

De acordo com a teoria Termodinâmica, a adesão só ocorre se se verificar uma diminuição da energia livre global (ΔG^{adh}), uma vez que o processo de adesão é favorecido quando esta energia por unidade de área (da superfície) é negativa [15,16].

A energia livre (ΔG^{adh}) é, então, definida pela equação modificada de Dupré (2.3):

$$\Delta G^{adh} = \gamma_{BS} - \gamma_{BL} - \gamma_{SL} \quad (2.3)$$

sendo que γ_{BS} , γ_{BL} e γ_{SL} correspondem às tensões interfaciais bactéria/superfície de adesão, bactéria/líquido e superfície de adesão/líquido, respetivamente.

Esta teoria permite quantificar a energia envolvida na adesão e prever quantitativamente a possibilidade de ser estabelecida a interface bactéria/superfície de adesão. No entanto, não são contabilizadas as interações electrostáticas (importantes interações em sistemas aquosos), resultando na adesão apenas quando é possível a formação da interface bactéria/superfície de adesão, não sendo contabilizados os aspetos biológicos da adesão [15]. Por outro lado, a obtenção dos valores da energia livre das superfícies das bactérias não é uma tarefa simples, dada a elevada complexidade química destas estruturas. Outra limitação da teoria é o facto de esta apenas poder ser aplicada a sistemas fechados [16], onde não há trocas de energia com o exterior, o que, na realidade, não se verifica, já que as bactérias são organismos vivos que convertem nutrientes em energia. Não menos importante, a teoria também tem vindo a ser criticada nomeadamente por ignorar a dependência de ΔG^{adh} da distância entre a bactéria e a superfície de adesão.

2.4.3 Teoria xDLVO

Uma vez que ambas as teorias anteriores se mostraram insuficientes para descrever a adesão bacteriana na íntegra, foi sugerida uma terceira teoria que resulta da combinação dos aspetos termodinâmicos com a teoria DLVO clássica (*extended DLVO theory* ou xDLVO).

Esta teoria defende que, quando duas partículas imersas numa solução aquosa se aproximam, são estabelecidas forças de interação eletrodinâmicas ou apolares ou de Lifshitz-van der Waals (interações LW), interações polares ou ácido-base de Lewis (interações AB), interações electrostáticas resultante da sobreposição da EDL (interações DL) e as interações eletrostáticas devido aos movimentos Brownianos (interações BR) [15,16]. Portanto, a energia livre total destas interações é dada por:

$$\Delta G^{adh} = \Delta G^{LW} + \Delta G^{AB} + \Delta G^{DL} + \Delta G^{BR} \quad (2.4)$$

As forças de interação de Lifshitz-van der Waals estabelecem-se entre as moléculas apolares da superfície das partículas, contrariamente das forças de interação ácido-base de Lewis que têm um carácter polar.

Esta é, então, a teoria mais completa e que melhor descreve o processo de adesão bacteriana desde a etapa de aproximação da bactéria até à etapa de proliferação e formação de biofilme, apesar destas últimas etapas não se verificarem para efeitos de ensaio com a técnica de END em estudo.

2.4.4 Considerações finais

As teorias apresentadas anteriormente não têm em conta as características microbiológicas dos microrganismos que poderão influenciar a adesão, evidenciando a complexidade do processo. Porém, no âmbito da técnica END com CB, esses fenómenos não são prioritários, dada a ausência de formação de biofilme durante os ensaios.

No entanto, há um conjunto alargado de fatores que influenciam e afetam o processo de adesão (Tabela 2.5, p. 20), destacando-se [16,19]:

- Concentração de eletrólitos (KCl, NaCl) – alteram as características dos materiais;
- Composição química do material – influencia a adesão e proliferação das bactérias;
- Hidrofobicidade das superfícies, especialmente do substrato – bactérias hidrofóbicas (a grande parte) têm preferência por superfícies hidrofóbias;
- Carga superficial do material;

- Força iônica (*I*) e pH – têm influência na hidrofobicidade superficial da bactéria (quanto menor o pH e a força iônica do meio envolvente, maior a hidrofobicidade da bactéria), alterando algumas das suas características e do próprio substrato ainda durante a primeira etapa da adesão;
- Topografia/rugosidade da superfície – promovem a adesão e a formação de biofilme, dado o aumento da área útil disponível para a ligação (Figura 2.7, p. 21).

Embora a adesão das bactérias, no decorrer da técnica de END em estudo, corresponda a uma primeira adesão (primeira etapa), onde não há formação de biofilme, os conceitos referidos pelas teorias apresentadas constituem uma base importante para a interpretação dos resultados experimentais (capítulo 3).

Tabela 2.5 – Variáveis que controlam a adesão das bactérias ao nível de morfologia superficial, propriedades físico-químicas, condições do ambiente e a presença de agentes patogênicos [48].

Variables influencing bacterial adhesion and colonisation on biomaterial surfaces	
Surface morphometry	Macroporosity Microporosity Micro-roughness Nano-roughness
Physico-chemical properties	Surface energy Hydrophilicity/superhydrophilicity Hydrophobicity/superhydrophobicity Hydrophobic functional groups Polar functional groups Charged functional groups Functional groups with specific activities
Environmental conditions	Degree of hydration Electrolytes pH Temperature Host proteins/host adhesins Shear rate/fluid viscosity Fluid flow rate
Pathogen	Gram-positive/Gram-negative Genus/Species Bacterial shape Surface energy Strain type and specific set of expressed adhesins

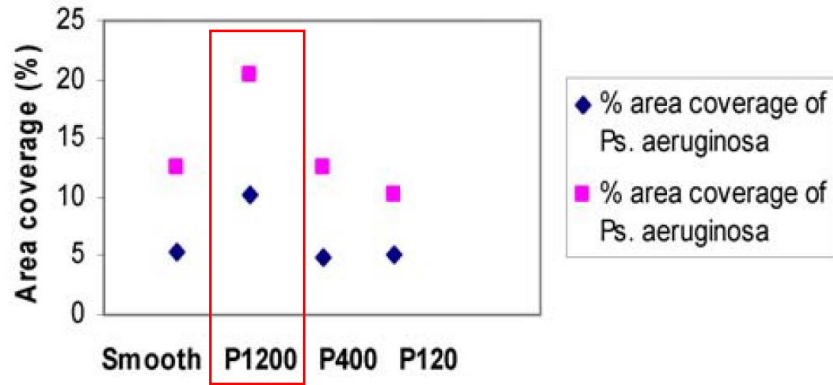


Figura 2.7 – Influência da adesão das bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *S. epidermidis* após 1h de incubação sobre várias superfícies de PMMA: superfície perfeitamente polida e superfícies lixadas com P1200, P400 e P120 (adaptada de [16]).

2.5 Futuras Aplicações

Uma vez confirmada a possibilidade de aplicação desta técnica em diferentes materiais não porosos nem com elevada rugosidade [7], torna-se pertinente fazer um levantamento, numa primeira fase, de possíveis aplicações, derivado do estudo de casos reais em que se verifique a influência de defeitos de reduzida dimensão no normal funcionamento dos equipamentos. Com esta informação, espera-se ser possível impulsionar a técnica para que seja aplicável em ramos da engenharia, cujas exigências são mais rigorosas e crescentes (biomédica, microfabricação).

Alexandre Costa [5] na sua dissertação, tentou iniciar uma pequena abordagem sobre o assunto, tendo obtido amostras de uma prótese de fémur (liga de cobalto-crómio 9100) e de uma peça da indústria aeronáutica (super liga INOCEL™ 9095). No entanto, só Pedro Pata conseguiu ensaiar estes materiais, cujos limiares de detetabilidade foram bastante reduzidos (INCONEL™ 9095: L = 2,96 μm / P = 0,59 μm ; cobalto-crómio: L = 9,71 μm / P = 1,96 μm) [10].

Neste seguimento, são apresentados alguns casos de estudo que poderão corresponder a futuras aplicações, uma vez que se comprovou a influência de micro defeitos no funcionamento dos materiais.

2.5.1 Biomédica

Num estudo levado a cabo por Mario Spector *et al.* [20], foi provado que muitas das infeções bacterianas e fúngicas que surgem após a colocação de implantes se devem a defeitos metalúrgicos e a defeitos produzidos durante a introdução das próteses. Foram examinadas diversas próteses (em aço inoxidável) retiradas de pacientes, devido a infeção, evidenciando algumas rebarbas, dobras e listras. Verificou-se que a presença destes defeitos nas próteses limita a atuação dos antibióticos e favorece o crescimento das bactérias (Figura 2.9). Na Figura 2.8, é apresentado o resultado dos ensaios realizados com duas amostras de próteses, com e sem defeitos, evidenciando a permanência das bactérias (*S. aureus*) na amostra com defeito, mesmo após um duradouro contacto (7 horas) com o antibiótico (Cefazolina) e as sucessivas lavagens da superfície.

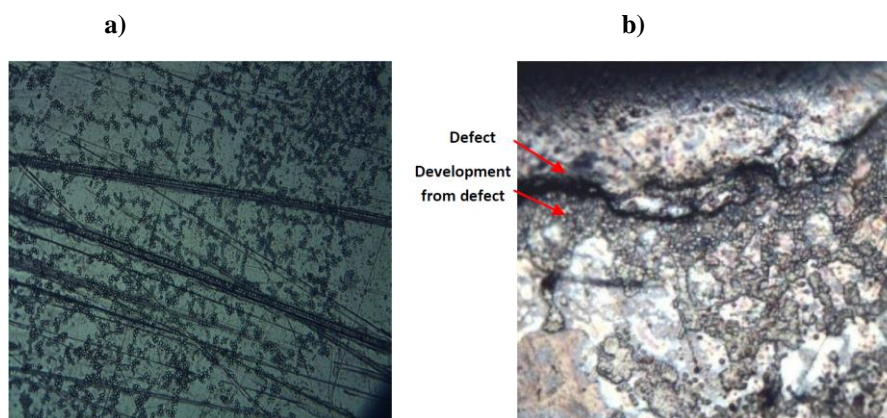


Figura 2.9 – a) Amostra teste contaminada com fungos; b) Amostra com defeitos induzidos durante a cirurgia onde é visível a contaminação por fungos, mesmo após a desinfeção da superfície [20].

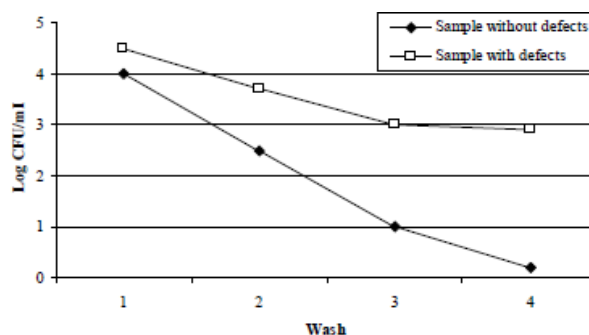


Figura 2.8 – Evolução da quantidade de bactérias *S. aureus* com as lavagens efetuadas em amostras com e sem defeitos [20].

Também S.S.M. Tavares *et al.* [21] analisaram sete exemplares de próteses ortopédicas em aço austenítico que falharam prematuramente. Verificou-se que alguns implantes não obedeciam às especificações ISO 5832, nomeadamente no teor máximo de carbono permitido (0,03%).

Segundo este estudo, a falha dos implantes deveu-se à corrosão verificada nas aberturas que proporcionou o aparecimento de fendas e descontinuidades no material, culminando na sua fratura, como se pode verificar na Figura 2.10.

Os autores concluíram que o principal fator comprometedor para a resistência dos implantes ortopédicos foi a falha por fadiga, maioritariamente devido ao mau acabamento superficial, durante a sua maquinagem, e à própria biocorrosão verificada nas aberturas do implante.

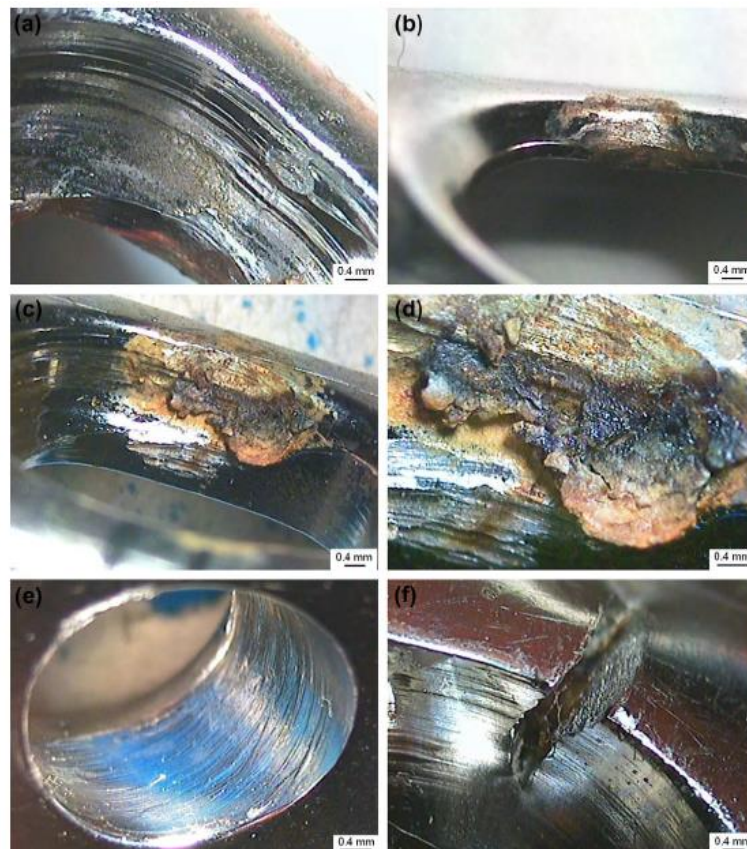


Figura 2.10 – Exemplos de defeitos encontrados nas aberturas dos implantes em estudo [20].

Com a mesma finalidade, C.R.F. Azevedo e E. Hippert Jr [22] investigaram a falha de implantes femurais (placas à compressão e *nail-plates*) em aço inoxidável, um implante para reconstrução do maxilar em titânio puro e alguns cabos em Nitinol (liga com memória de forma em níquel-titânio forjado). A Figura 2.11 ilustra os implantes e cabos de Nitinol em estudo.

Foi possível concluir que estes implantes apresentavam diversos defeitos de fabricação, como arestas de corte, fissuras e marcas da maquinagem (Figura 2.12) associado ao fraco projeto dos componentes.

No caso o implante maxilo-facial, a fratura resultou de defeitos verificados maioritariamente a nível intergranular, levando à aceleração da corrosão do material. A tão reduzida escala, as CB não desempenham um papel preponderante na deteção de defeitos.

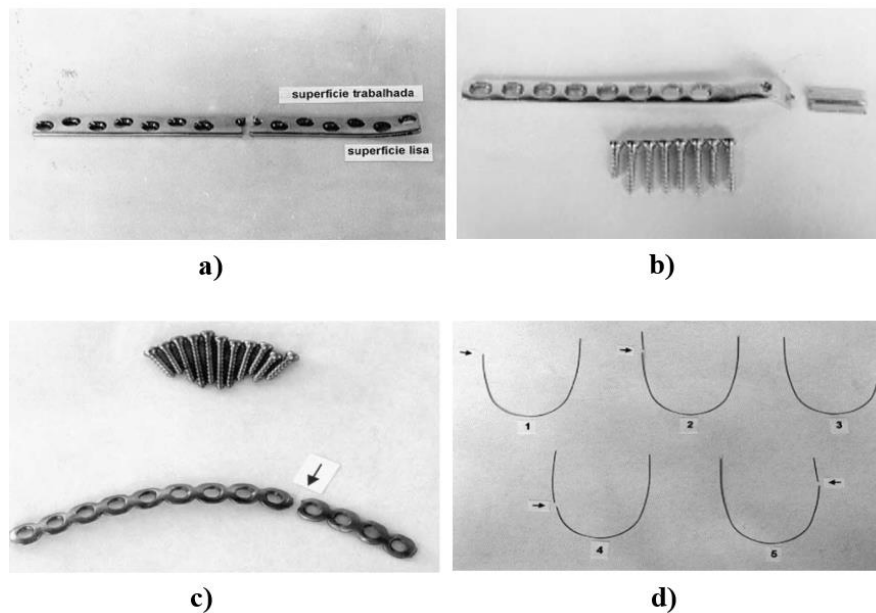


Figura 2.11 – Exemplos de falha de a) implante femural – placa à compressão; b) implante femural – placa com parafusos (“nail-plate”); c) implante para reconstrução do maxilar; d) cabos de nitinol [22].

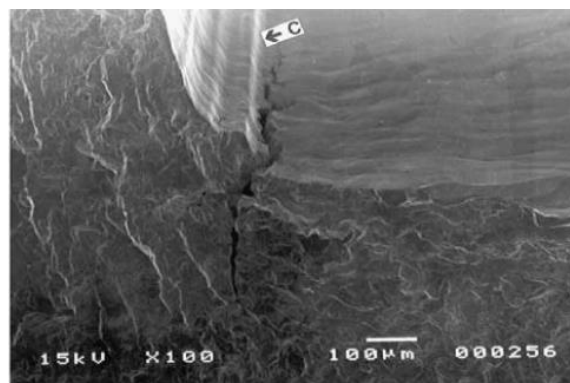


Figura 2.12 – Defeitos de fabricação na superfície do parafuso [22].

Finalmente, os cabos em nitinol apresentaram defeitos superficiais resultantes da fase de maquinagem nas regiões de fratura e corrosão (Figura 2.13) maioritariamente ricas em níquel. A presença destes defeitos superficiais reduz drasticamente a resistência do nitinol à corrosão, uma vez que a camada de TiO_2 (dióxido de titânio ou titânio IV) é removida. Além disso, a composição química dos cabos de nitinol não cumpria as especificações *standard* da ASTM para ligas níquel-titânio com memória de forma para fins médicos.

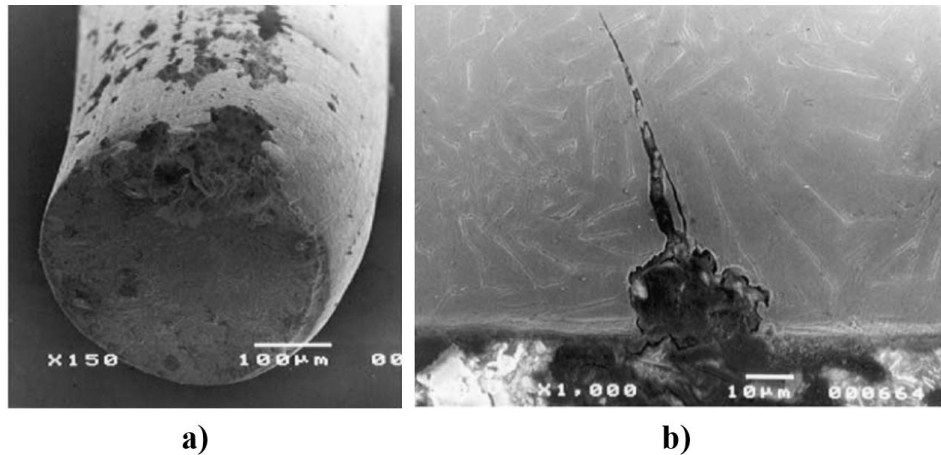


Figura 2.13 – a) Defeitos superficiais e corrosão na superfície de fratura de um cabo de nitinol; b) Pormenor da fissura de um cabo de nitinol [22].

C.W. Chan, *et al.* [23], em 2012, também obtiveram conclusões interessantes e relevantes que contribuem para impulsionar a prática da técnica de END em estudo nesta área. Estes autores analisaram o comportamento de células mesenquimatosas (MSC – *Mesenchymal Stem Cells*), que são bastante promissoras na engenharia de tecidos e medicina regenerativa.

Foi preparado um provete de NiTi soldado a laser, onde se destacam a zona originalmente soldada, sem modificações da superfície (ZS), onde se pôde observar o padrão dendrítico que resultou da rápida solidificação dos grãos, zona termicamente afetada (ZTA) e material base (MB). De forma a caracterizar o efeito da topografia da superfície no comportamento das células, alguns provetes da ZS foram lixados com uma lixa de granulometria 180 (ZS rugoso), de forma a remover o padrão dendrítico, mantendo a rugosidade superficial semelhante ao provete original (ZS) e, por fim, alguns provetes foram polidos com lixas até à de granulometria de 2400 (ZS polido).

Após a deposição das MSC nos diferentes provetes, concluíram que estas aderiram preferencialmente a descontinuidades superficiais do material, tais como o padrão dendrítico da ZS (Figura 2.14a), poros do MB (Figura 2.14c) e estrias da ZS rugoso (Figura 2.14d).

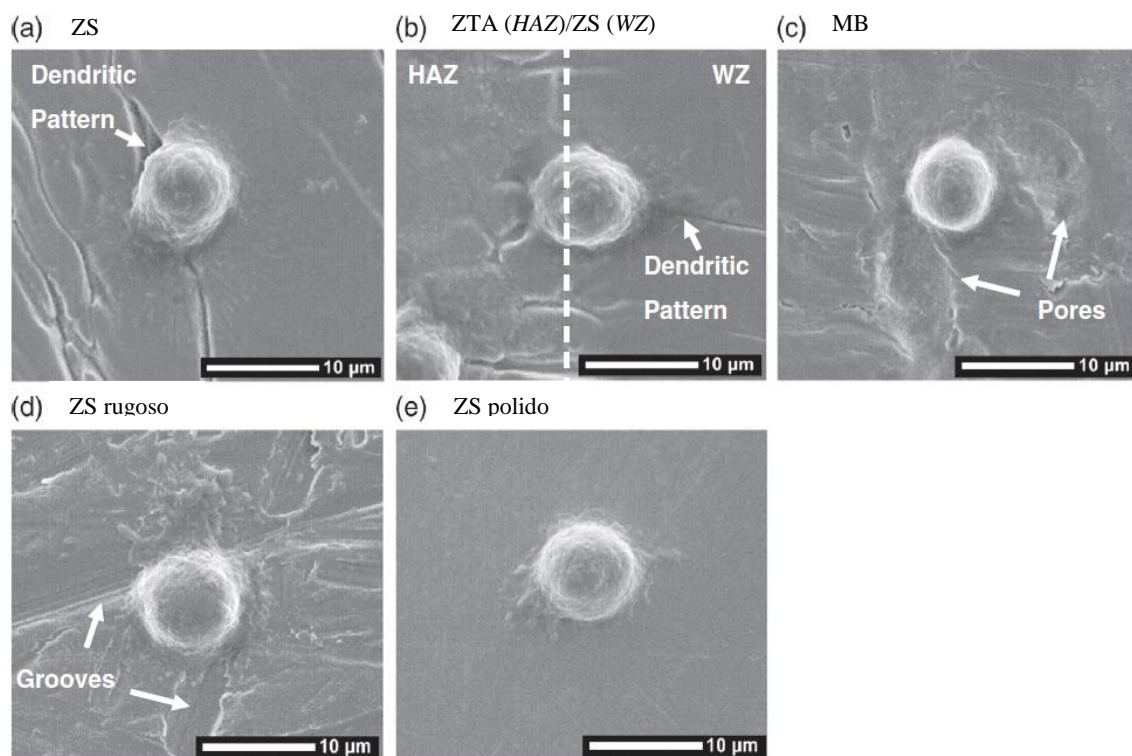


Figura 2.14– Imagens SEM da adesão das MSC após 4h de cultura: a) visível preferência pelo padrão dendrítico da ZS por parte das MSC; b) MSC depositadas segundo o padrão dendrítico na fronteira entre ZTA/ZS ; c) preferência das MSC pelos poros do MB; d) MSC depositadas nas estrias da ZS rugoso; e) MSC depositadas aleatoriamente na ZS polido [23].

Ao fim de 12h de cultura, todas as MSC emitiram prolongações citoplasmáticas que se estenderam ao longo das superfícies, ainda que com diferentes morfologias, diferenças essas que foram induzidas pela topografia do material. Para MB, ZS rugoso e ZS polido as MSC apresentaram uma forma tipicamente esférica, o que indica que a rugosidade superficial poderá não ter sido suficiente para alterar a morfologia das mesmas. Pelo contrário, na ZS as MSC apresentaram forma elíptica e orientada ao longo do padrão dendrítico. Esta influência da topografia na morfologia das células voltou a ser observado na interface entre ZTA e ZS, sendo que as células precisamente na interface apresentaram uma forma semi-esférica, enquanto as que estavam presentes na ZS apresentavam-se mais distorcidas e alinhadas com o padrão do material.

Também Valentina Caridi [24], em 2014, após uma cuidada análise da literatura científica da área da ortodontia, concluiu que a quantidade de bactérias que aderiram às superfícies dos componentes da ortodontia era influenciada pelas diferentes características das superfícies de cada material (entre as quais, a rugosidade).

Uma vez provada a capacidade das CB em detetar defeitos de pequena dimensão [6–8] e, uma vez que materiais como aço inoxidável e o titânio verificaram os melhores resultados ($L = 5,71 \mu\text{m} / P = 1,2$ e $L = 9,1 \mu\text{m} / P = 1,8 \mu\text{m}$, respetivamente) [4], uma das aplicações da técnica poderia passar pela biomédica, nomeadamente em próteses destes mesmos materiais.

2.5.2 Geometrias Complexas: Turbina a Gás

M. Rogante, G.F. Ceschini *et al.* [25] investigaram a estrutura do rotor de um compressor axial de uma turbina a gás através da técnica de SANS (*Small Angle Neutron Scattering*), de forma a encontrar nano defeitos na sua superfície e em profundidade. O rotor era constituído por uma liga de aço NiCrMoV (referenciada como ASTM A 471, tipo 2), submetido a diversos ensaios a fim de se encontrarem micro inclusões (precipitados) que crescem naturalmente devido às deslocamentos do material, em volume. Porém, devido ao formato característico e ao seu tamanho, usando o SANS, só foi possível examinar as camadas mais espessas do rotor (2,2 cm).

Concluiu-se que as micro inclusões mais prováveis no material do rotor eram os carbonetos Cr₂₃C₆, cujas variações em tamanho e concentração poderiam estar relacionadas com a resistência do material do rotor à deformação. Todavia, a concentração de nano defeitos no material do rotor em estudo foi baixa, comparativamente com o material depois de tratamento térmico (indução da formação de precipitados).

No entanto, outra possível aplicação desta técnica de END seria a deteção de micro defeitos em peças sujeitas a elevados regimes de funcionamento e com diferentes geometrias, como o rotor do compressor de uma turbina a gás. Além disso, uma vez que normalmente as pás destas turbinas são revestidas por TBC e inspecionadas por LP, sabe-se que o uso dessa técnica causa vários problemas. Dada a rugosidade destes revestimentos, após a realização dos ensaios com LP, este fica impregnado nos poros do revestimento, o que constituiu uma clara desvantagem à sua aplicação. Deste modo, a técnica de END com CB pode apresentar uma solução nessa vertente, uma vez que as CB, após a sua morte pela alteração brusca do meio envolvente, perdem a fluorescência.

2.5.3 Energias Renováveis: Turbina Eólica

Relacionado com dispositivos de aproveitamento de energias renováveis, nomeadamente a energia eólica, M. Shirani e G. Härkegär [26] estudaram a distribuição da fadiga e o efeito do tamanho dos grãos no ferro fundido dos componentes de uma turbina eólica, sabendo que a propagação da fadiga se inicia em descontinuidades (micro fendas) já existentes antes da peça ser solicitada aos diversos esforços.

O material usado nos componentes da turbina eólica foi o ferro fundido nodular EN-GJS-400-18-LT 2 (Figura 2.15, p. 28). A resistência à fadiga do ferro fundido base (dúctil) varia com o tamanho dos seus nódulos, ou seja, blocos de fundição mais grossos conduzem a menores taxas de arrefecimento (processo lento) e à redução do tamanho dos minerais presentes, resultando numa diminuição da resistência à fadiga.

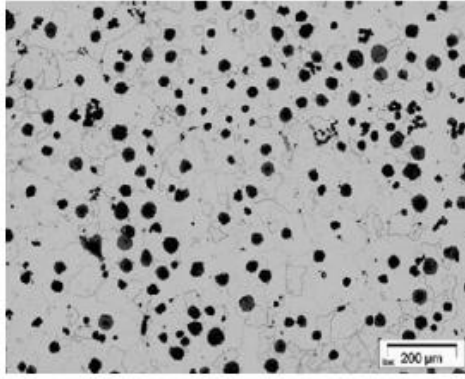


Figura 2.15 – Pormenor da micrografia do ferro fundido nodular [26].

Hesam Mirzaei Rafsanjani e John Dalsgaard Sørensen [27] também examinaram o efeito da distribuição dos defeitos para a vida à fadiga de uma turbina eólica, tendo chegado a importantes conclusões relativamente à propagação de defeitos, mais concretamente numa pá de uma turbina eólica:

- Falhas por fadiga são normalmente resultado de defeitos de fabrico ou devido a variações aleatórias de rigidez/força;
- Se há um aglomerado de defeitos no interior da peça e nenhum defeito à superfície, dependendo do estado de tensão a que estiver sujeita, a peça poderá começar a quebrar pelo interior;
- Se houver um aglomerado de defeitos superficiais (no bordo), independentemente de existirem ou não defeitos interiores, a falha por fadiga iniciar-se-á sempre pela superfície, já que o processo é acelerado pelas condições ambiente e de tensão.

Assim, a deteção de defeitos superficiais em componentes de turbinas eólicas também seria uma possível e vantajosa aplicação para a técnica em estudo, já que se tratam de estruturas cada vez mais implementadas e de elevada importância, por questões ambientais, cujos defeitos superficiais existentes têm, muitas vezes, dimensões demasiado reduzidas para serem detetados pelas técnicas convencionais de END, mas que se podem propagar e gerar graves problemas no funcionamento destas estruturas.

2.5.4 Energias Renováveis: Células Fotovoltaicas

Numa investigação realizada por Pavel Skarvada, Pavel Tománek *et al.* [28], relacionou-se a presença de defeitos no silício monocristalino com o rendimento e performance da célula fotovoltaica sob determinadas condições – próximo do ponto de quebra da região de polarização inversa.

Os métodos mais comuns para a caracterização das superfícies de silício são os elétricos, com a limitação de não conseguirem definir a localização dos defeitos que possam existir. Deste modo, os autores adaptaram o uso do SNOM (*Scanning Near-Field Optical Microscope*), já empregue para obter medições do LBIC (*Laser Beam Induced Current*) com melhor resolução, para detetar simultaneamente sinais elétricos, refletividade da superfície e fazer o levantamento da topografia da amostra, aplicando um método eficaz na localização dos defeitos.

Esta modificação ao método consiste em aplicar uma determinada tensão invertida de polarização a uma célula de silício monocristalino (10x10 cm), para que haja emissão de luz, em todas as direções, através da superfície com heterogeneidades (Figura 2.16). Assim, se a ponta da sonda estiver colocada entre a emissão de luz e o PMT (*Photomultiplier Tube*), é possível criar uma imagem desta superfície heterogénea do silício através da análise da variação de intensidade da luz difundida através da ponta da sonda.

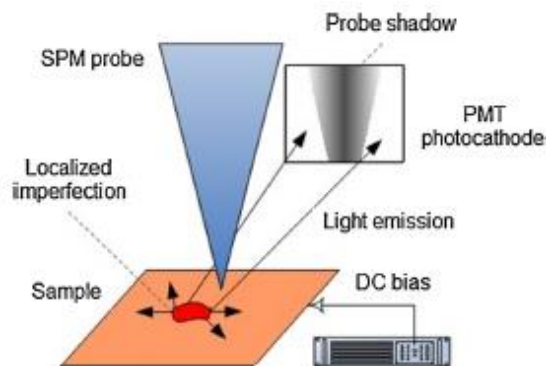


Figura 2.16 – Medição (micro escala) altamente sensível da emissão de luz difusa usando o SNOM [47].

A Figura 2.17 (p. 30) ilustra os diversos defeitos e heterogeneidades à escala micrométrica detetados, tais como pequenas cavidades superficiais, deslocações cristalográficas, defeitos devido ao microplasma formado, desgaste mecânico da superfície (fissuras) e zonas superficiais parcialmente derretidas devido a variações da luz emitida pela superfície do silício, face a variações da tensão e corrente inversas e à variação natural da temperatura da amostra em estudo [28].

Dada a reduzida dimensão dos defeitos encontrados nas superfícies destas células fotovoltaicas, é credível a aplicabilidade da técnica de END com CB para a deteção de defeitos tais como as cavidades e fissuras superficiais (Figura 2.17 a,c). Uma vez que as dimensões destes defeitos são próximas da ordem de grandeza das CB, crê-se serem possíveis de detetar com a técnica em estudo.

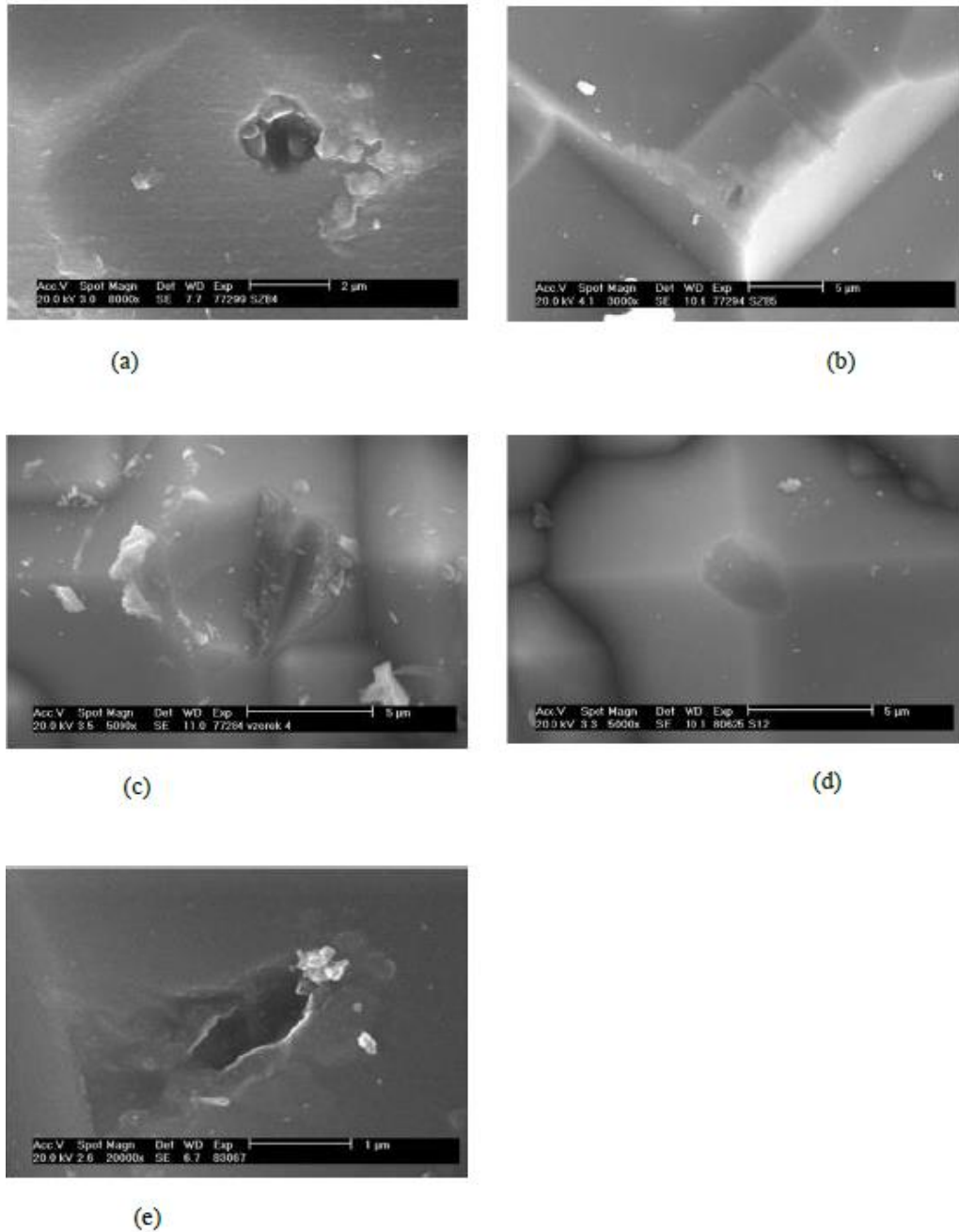


Figura 2.17 – Micrografia de (a) cavidade superficial; (b) deslocação cristalográfica; (c) fissuras superficiais; (d) defeitos devido ao microplasma; (e) zonas fundidas [28].

2.6 Revestimentos Livres de Crômio ou Cádmio

Atualmente, dada a implementação de normas e legislação ambientais cada vez mais restritivas (regulamentos ELV e REACH e diretivas RoHS e WEEE na Europa; nos EUA estão a ser aplicadas normas mais restritivas pela OSHA) [29,30], acompanhadas pela crescente competitividade do mercado, as empresas necessitam ser cada vez mais eficientes do ponto de vista produtivo e ambiental, resultando numa aliança entre a produção industrial, os gastos de consumos e a poluição gerada.

Os conhecidos revestimentos cromados de superfícies, muito utilizados para aumentar a resistência à corrosão, a aderência de posteriores pinturas e minimizar a resistência elétrica, tem sido alvo de críticas dada a toxicidade e possíveis propriedades cancerígenas dos compostos do crômio, destacando-se o crômio hexavalente (Cr^{6+}) e o ácido crômico (CrO_3), presentes em vapores libertados durante o processo e em águas contaminadas resultantes do mesmo [31–33]. Também o processo de anodização tem sido bastante criticado, especialmente devido à poluição subjacente ao mesmo (lamas de hidróxido de alumínio) [32].

Apesar de ser um problema preocupante atualmente, a utilização de técnicas com compostos voláteis e outros nocivos à saúde (crômio e seus compostos) remonta há muitos mais anos atrás e, desde então, tem sido um problema a colmatar, ainda que difícil, dado o baixo custo destes revestimentos em comparativamente com as técnicas alternativas emergentes.

Os esforços têm sido feitos há algumas décadas, sendo que a *Boeing Company*, desenvolveu técnicas na área dos tratamentos superficiais eletrolíticos (anodização) isentas de crômio nos anos 90, tais como PAA e BSAA, utilizando, respetivamente, o ácido fosfórico e ácido bórico-sulfúrico [34–36]. A mesma empresa desenvolveu outra técnica, igualmente isenta de crômio, designada por *Boegel* [36] que consiste num processo Sol-gel (ou pectização), onde se destacam duas etapas básicas: a hidrólise e a condensação. A aplicação chave desta técnica é a do pré-tratamento de materiais, substituindo a antiga variante que consistia num revestimento por conversão do crômio. Mais recentemente, a *Boeing* encontra-se a desenvolver uma técnica que, além de ser isenta de crômio, pretende inovar também no final processo de secagem do revestimento. Aponta-se que a nova técnica, baseada na conversão do óxido de cério (CeO_2), permitirá uma secagem do revestimento em meros segundos, devido à exposição à luz UV [37].

Também nesta área, a *Airbus* desenvolveu duas técnicas de anodização alternativas – TSA e PSA – com objetivos de proteger da corrosão e melhorar a ligação estrutural, respetivamente [30].

No entanto, existem ainda outras alternativas aos revestimentos de crômio hexavalente. A alternativa mais comum e antiga consiste no recurso ao crômio trivalente (Cr^{3+}) [38]. Este composto do crômio proporciona velocidades de deposição maiores, tornando todo o processo

mais económico. Todavia, dadas as diretivas e regulamentos cada vez mais rigorosos com o teor permitido de crómio, as empresas foram levadas a procurar outras soluções.

Na área dos revestimentos aplicados por *spray*, a alternativa ao crómio duro que rege é a dos revestimentos por *thermal spray*, particularmente a técnica que utiliza oxigénio a alta velocidade (HVOF), uma vez que tem elevada produtividade, devido à sua grande velocidade de deposição de materiais, é menos nociva para o ambiente e é capaz de produzir uma grande variedade de revestimentos [29,38], sendo que os materiais mais utilizados são o $\text{Cr}_3\text{C}_2\text{-NiCr}^1$ e o WC-Co e WC-CoCr [33]. Também vigoram uma adaptação desta técnica anterior, com recurso a ar ao invés do oxigénio (HVOF) e a técnica por *plasma spray* como alternativas aos revestimentos cromados [29].

Além deste tipo de revestimentos, há ainda alternativas desenvolvidas através de uma tecnologia que recorre ao vácuo para aplicar o revestimento, destacando-se as técnicas PVD e CVD. No entanto, para a maioria das aplicações onde é aplicado o crómio duro, esta tecnologia de deposição não é a melhor alternativa, uma vez que lhe está associado elevado custo e elevadas temperaturas de operação e camadas revestidas demasiado finas [29,38]. Os revestimentos mais comuns ao abrigo da técnica PVD são TiN e CrN e, na indústria aeronáutica, uma variante desta técnica é largamente utilizada: IVD com alumínio [33].

Por fim, também banidos pela legislação ambiental bastante limitativa dada a sua toxicidade, encontram-se os revestimentos de cádmio. As principais aplicações destes revestimentos passam pela indústria automóvel, aeronáutica e marinha, devido à sua lubrificidade e capacidade de proteger da corrosão [39]. Neste seguimento, já foram desenvolvidas algumas alternativas favoráveis à redução da quantidade de cádmio nos revestimentos, sem comprometer a sua boa funcionalidade, entre os quais se encontram a eletrodeposição de Zn e de alumínio, revestimento de alumínio por IVD, *spray* de alumínio por arco elétrico, chama ou a frio (elevada velocidade). Ainda nesta área encontram-se os revestimentos metalo-cerâmicos e a deposição eletrolítica do níquel com o polímero PTFE [40].

Neste seguimento, a OGMA – Indústria Aeronáutica de Portugal também optou por revestimentos alternativos (especificados no capítulo do procedimento experimental em § 3.4.16) aplicados por técnicas mencionadas acima – *flame spray* e *plasma spray*.

¹ Salienta-se que o crómio (Cr) presente nestes materiais não se trata de crómio hexavalente.

3. PROCEDIMENTO E VALIDAÇÃO EXPERIMENTAL

3.1 Introdução

O presente capítulo pretende descrever a produção dos defeitos dos provetes utilizados, bem como apresentar a análise dos resultados dos ensaios. Relativamente à preparação dos provetes (§ 3.2), é ser feita uma abordagem aos materiais constituintes dos mesmos, de forma a serem conhecidas as suas propriedades e a sua importância para os ensaios com CB (§ 3.2.1). Também é descrito todo o procedimento de preparação de superfície e conceção dos defeitos (§ 3.2.2). Além disso, é feita uma apresentação das bactérias utilizadas nos ensaios experimentais (§ 3.3), que decorreram no iBB no IST, bem como das suas características e meios de crescimento. Do ponto de vista experimental, é especificado o procedimento subjacente (§ 3.4), bem como ilustrados e analisados os resultados dos ensaios a cada provete de forma mais particular (§ 3.4.1 – § 3.4.18).

3.2 Preparação dos Provetes

3.2.1 Materiais Utilizados

Com o objetivo de expandir a gama de materiais testados com a técnica de END com CB, foram produzidos diversos provetes de alguns materiais menos comuns na engenharia. Pretende-se analisar o comportamento das CB, aquando da variação da química, fase cristalográfica ou topografia da superfície do material ou após a alteração da geometria dos defeitos. Deste modo, os materiais foram previamente seleccionados pelo seu interesse em aplicações industriais e pela combinação de parâmetros que poderão influenciar o comportamento das CB, tal como referido anteriormente, seguindo listados na Tabela 3.1, acompanhados por algumas das suas propriedades.

Tabela 3.1 – Alguns materiais a ensaiar e as suas propriedades.

PROPRIEDADES						
MATERIAL	FÍSICAS	MECÂNICAS			QUÍMICAS	
	Densidade [kg/m ³]	Tensão Cedência [MPa]	Tensão Rotura [MPa]	Dureza Vickers	Hidrofobicidade (ângulo de contacto θ)	
AA 1100	2700	75	110	68,9	33,8°	
AISI 316 L	8000	560	290	152	–	
Nióbio	8570	240	330	115	35,8°	
Pirite (FeS ₂)	4950-5100	–	–	817-929	48,5°	
Liga Fe-Ni (estrutura Widmanstätten)	8000	~240	~445	~155	52,3°	
NiTi	Austenite Martensite	100-800	800-1500	~160	35,9°	
		~6400	50-300	700-2000		~300
CuAlMn (martensítico)	#	#	#	< 200	67,8°	
CuAlMn (austenítico)	#	#	#	~270		
Moeda 1€	Núcleo ²	8900	103	359	147	–
	Coroa ³	8690	~150	495	~80	

² Núcleo é constituído por Níquel + Cupriníquel (75Cu25Ni) + Níquel.

³ Coroa é composta por Latão + Níquel (78Cu20Zn2Ni)

Moeda 0,10€ (ouro nórdico)		6934,3	170	400	80	–
Moeda 0,02€ (aço cobreado)		6636,16	–	–	–	–
Aço Duplex		7800	200	235	255	62,4°
Ferro Fundido		7250	–	–	–	21,1°
Platinado		*	*	*	*	53,6°
Junta Bimetálica	Cu	8930	33,3	210	50	53,7°
	Mg	1770	220	290	63	49,4°
PLA		1300	44,7	50,1	–	–

* Material desconhecida e, conseqüentemente características igualmente desconhecidas.

Novo material com poucas características definidas.

A hidrofobicidade é uma das interações mais importantes durante a adesão das CB aos provetes ensaiados. Esta característica é representada por um ângulo de contacto (θ) entre a gota de um líquido e a superfície do material. Na Figura 3.1 é possível verificar que, quanto menor o ângulo, mais hidrofílico é o material e para ângulos de contacto maiores, mais hidrofóbico é o material.

O teste de hidrofobicidade consistiu então na medição dos ângulos de contacto de uma gota de água deixada cair na superfície de diversos materiais a ensaiar. A gota de água caiu à mesma altura para todos os provetes, sendo a gravidade a única força interveniente.

Os valores obtidos para os ângulos de contacto (θ) surgem na tabela acima (Tabela 3.1), junto a outras propriedades dos materiais. Além disso, na Figura 3.2 (p. 36) estes materiais sujeitos ao ensaio da hidrofobicidade estão ordenados por ordem crescente de hidrofobicidade, sendo que o vidro (hidrofílico) e o Teflon (hidrofóbico) surgem como materiais comparativos.

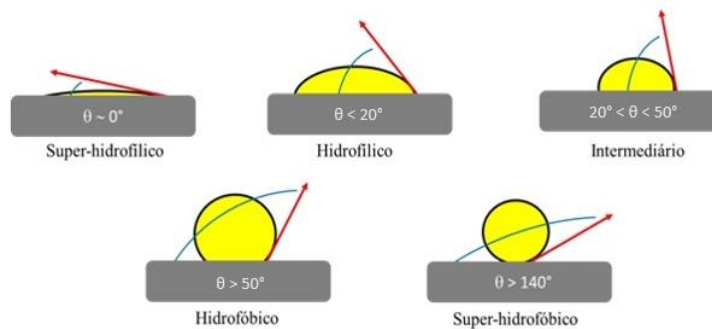


Figura 3.1 – Representação ilustrativa que relaciona o ângulo de contacto (θ) e o respetivo grau de hidrofobicidade dos materiais.

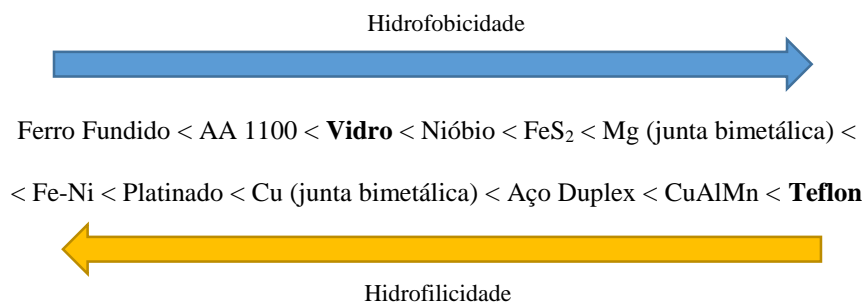


Figura 3.2 – Provetes por ordem crescente de hidrofobicidade.

O ferro fundido, é então, o material mais hidrofílico (dos provetes que se calcularam o respetivo grau de hidrofobicidade) e o CuAlMn o mais hidrofóbico.

3.2.2 Preparação dos Provetes

A produção dos provetes (regularmente de forma quadrangular com 10 mm de lado) e das suas indentações segue a mesma metodologia adotada nos trabalhos anteriores [1,3–5,10], onde são submetidos a um polimento com seis lixas de granulometria sucessivamente menor (P240, P320, P400, P600, P1200 e P2500), de forma a deixar a superfície o mais plana e espelhada possível. No final, estes provetes foram polidos com MicroPolish Alumina 1.0 µm 40-10081 de modo a obter um polimento final isento de riscos.

Posteriormente, foram produzidos micro defeitos – matrizes de indentações – com auxílio de um microdurómetro Mitutoyo HM-112, sendo que as cargas do indentador variam entre 0,010 kg e 1 kg. A Tabela 3.2 descreve a escala das indentações utilizada.

Tabela 3.2 – Esquema representativo das indentações embutidas nos provetes.

Carga [kg]	1	0,5	0,3	0,2	0,1	0,05	0,025	0,01
Defeito	A	B	C	D	E	F	G	H

Na maioria dos provetes, foram criadas duas matrizes conforme segue representado na Figura 3.3, com exceção de um provete de CuAlMn (fase martensítica) e de um de Nióbio nos quais se alterou ligeiramente a ordem das colunas, bem como a ordem das indentações com maior carga. As indentações encontram-se distanciadas entre si de 300 µm, garantindo que as não há intersecção entre nenhuma. Além de matrizes, também existem alguns provetes com filas de indentações de diferentes cargas, conforme será descrito no § 3.4 onde também será feita a análise de resultados dos ensaios a cada provete.

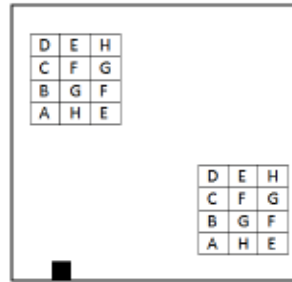


Figura 3.3 – Representação esquemática das matrizes de indentações no provete.

O tipo de defeito produzido pelo indentador Vickers tem a forma de uma pirâmide de base quadrangular, sendo que a sua caracterização é feita através da medição das suas diagonais. No entanto, optou-se pela caracterização dos defeitos através da relação entre a dimensão do lado da pirâmide (L) e da sua profundidade (P). Uma vez que é conhecido o ângulo entre faces opostas da pirâmide (136°) e estabelecendo que as dimensões L e P são dadas em micrómetros (μm), a relação é dada pela equação (3.1):

$$L = P \times 2 \times \tan\left(\frac{136}{2}\right) \Leftrightarrow L = P \times 4,95 \quad (3.1)$$

A Figura 3.4 pretende ilustrar a forma do defeito padrão com as respetivas indicações de L , P e do ângulo de 136° entre faces opostas da pirâmide.

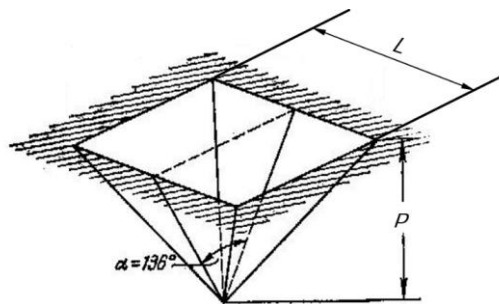


Figura 3.4 – Defeito padrão com a representação das dimensões de L e P .

A Tabela 3.3 ilustra as dimensões dos defeitos produzidos pelo micro indentador em cada um dos materiais ensaiados.

Tabela 3.3 – Dimensões dos defeitos nos diferentes materiais.

MATERIAL		DIMENSÃO MÉDIA DOS DEFEITOS							
		A	B	C	D	E	F	G	H
AA 1100	L [μm]	94,71	67,41	51,87	42,50	29,86	21,46	15,74	8,42
	P [μm]	19,1	13,6	10,5	8,6	6,0	4,3	3,2	1,7
Aço 316L	L [μm]	71,8	51,2	39,5	30,9	21,8	15,6	11,1	4,8
	P [μm]	14,5	10,4	8,0	6,24	4,4	3,2	2,3	1,0
Nióbio (não polido)	L [μm]	130,7	88,90	67,04	52,64	33,53	21,80	12,9	5,82
	P [μm]	26,40	17,96	13,54	10,63	6,77	4,40	2,61	1,18
Nióbio (polimento até lixa P2500)	L [μm]	136,33	89,87	70,65	56,40	36,23	20,77	15,32	6,84
	P [μm]	27,54	18,56	14,27	11,39	7,32	4,20	3,09	1,38
Nióbio (polimento completo com OPS)	L [μm]	127,76	89,59	66,62	53,31	35,79	23,19	14,38	6,65
	P [μm]	25,81	18,10	13,46	10,77	7,23	4,68	2,91	1,34
NiTi	L [μm]	90,51	-	66,40	-	48,43	-	-	-
	P [μm]	18,28	-	13,41	-	9,78	-	-	-
CuAlMn 0° (Martensítico)	L [μm]	99,86	71,63	51,90	44,02	29,76	21,37	15,03	9,16
	P [μm]	20,17	14,47	10,48	8,89	6,01	4,32	3,04	1,85
CuAlMn 0° (Austenítico)	L [μm]	95,16	67,41	51,45	41,64	30,18	22,31	15,6	10,17
	P [μm]	19,22	13,62	10,39	8,41	6,09	4,51	3,15	2,05
CuAlMn 45° (Martensítico)	L [μm]	-	58,99	-	38,72	26,51	19,36	14,05	7,18
	P [μm]	-	11,92	-	7,82	5,36	3,91	2,84	1,45
CuAlMn 45° (Austenítico)	L [μm]	96,32	66,89	53,07	43,87	31,99	24,39	18,02	10,15
	P [μm]	19,46	13,51	10,72	8,86	6,46	4,93	3,64	2,05
CuAlMn 90° (Martensítico)	L [μm]	91,8	67,74	54,81	43,34	30,44	22,28	16,14	8,83
	P [μm]	18,55	13,68	11,07	8,76	6,15	4,5	3,26	1,78
CuAlMn 90° (Austenítico)	L [μm]	99,2	68,84	53,32	43,8	31,61	22,95	17,06	10,48
	P [μm]	20,04	13,91	10,77	8,85	6,38	4,64	3,45	2,12

Moeda 1€ (coroa)	L [μm]	127,55	91,97	70,80	56,75	40,02	29,65	22,02	11,4	
	P [μm]	25,77	18,58	14,30	11,46	8,08	5,99	4,45	2,30	
Moeda 1€ (núcleo)	L [μm]	118,37	83	64,86	52,68	37,18	27,32	19,66	11,17	
	P [μm]	23,91	16,77	13,10	10,64	7,51	5,52	3,97	2,26	
Moeda 0,10€	L [μm]	123,92	82,97	66,63	52,47	35,74	26,92	19,93	10,22	
	P [μm]	25,03	16,76	13,46	10,60	7,23	5,44	4,03	2,06	
Moeda 0,02€ (aço)	L [μm]	128,20	90,40	67,74	56,20	39,52	28,11	20,47	11,03	
	P [μm]	25,90	18,26	13,68	11,35	7,98	5,68	4,13	2,23	
Moeda 0,02€ (Cobre)	L [μm]	129,35	92,06	71,97	60,54	42,51	31,98	25,58	13,26	
	P [μm]	26,13	18,60	14,54	12,23	8,59	6,46	5,17	2,68	
Junta Bimetálica	Al	L [μm]	133,49	87,12	66,68	52,89	35,64	24,78	17,63	6,82
		P [μm]	26,97	17,60	13,47	10,68	7,20	5	3,56	1,38
	Mg	L [μm]	176,71	120,54	88,61	71,96	43,36	31	22,22	8,55
		P [μm]	35,70	24,35	17,90	14,54	8,76	6,26	4,49	1,73
Junta Bimetálica	Cu	L [μm]	134,70	94,42	77,02	64,44	48,56	36,86	30,87	20,45
		P [μm]	27,21	19,88	15,56	13,02	9,81	7,45	6,24	4,13
	Mg	L [μm]	177,92	127,42	96,35	75,05	58,51	40	32,92	17,27
		P [μm]	35,94	25,74	19,46	15,16	11,82	8,08	6,65	3,49
Ferro Fundido	L [μm]	99,18	63,83	51,70	37,57	29,15	21,07	15,71	9,07	
	P [μm]	20,04	12,89	10,44	7,59	5,89	4,26	3,17	1,83	
Fe-Ni (meteorito)	L [μm]	105,41	74,44	57,01	46,58	33,33	24,09	17,78	11,64	
	P [μm]	21,29	15,04	11,52	9,41	6,73	4,87	3,59	2,35	
Platinado	L [μm]	65,63	45,74	35,06	28,83	21,35	16	12,14	6,58	
	P [μm]	13,26	9,24	7,08	5,82	4,31	3,23	2,45	1,33	

Salienta-se que, uma vez que a maioria dos provetes possui mais do que uma matriz, nesses casos os valores de L e P foram calculados utilizando os valores médios das diagonais D_1 das indentações. O PLA não integra a tabela uma vez que, dada a sua natureza polimérica, os defeitos da matriz não se conseguiram visualizar nem medir.

Muitos dos materiais ensaiados foram selecionados com o propósito de averiguar quais os fatores que maioritariamente afetam os mecanismos de interação entre bactérias e defeito e como. Deste modo, a Figura 3.5 apresenta um esquema ilustrativo onde se destacam os materiais selecionados para cada fator: química do material ou da sua superfície, geometria dos defeitos existentes, topografia da superfície do material e fases cristalográficas existentes.

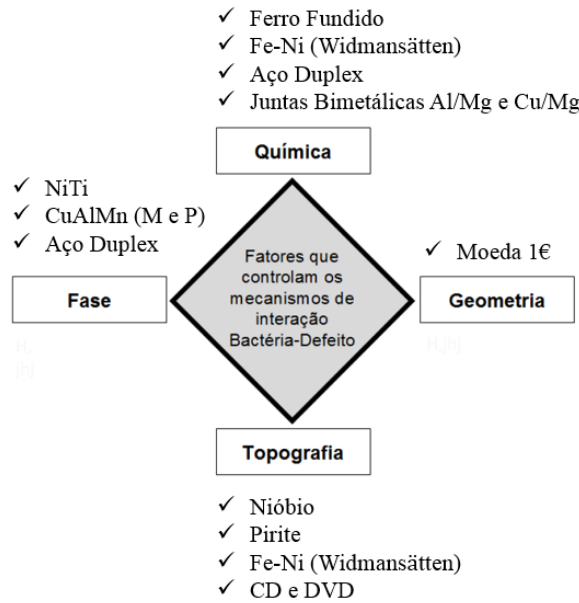

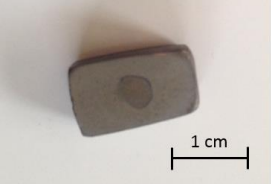
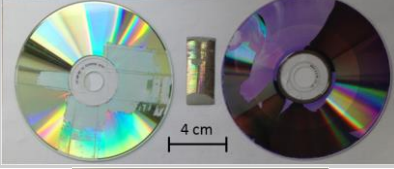
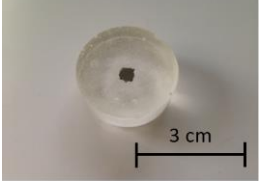
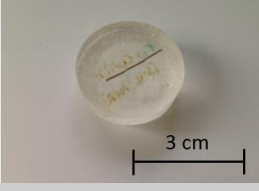
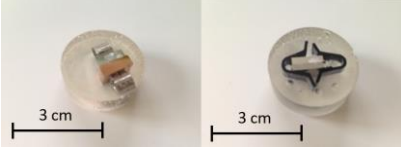
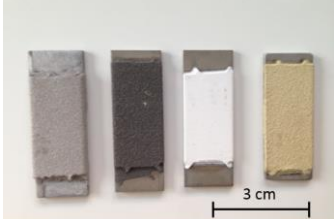


Figura 3.5 – Materiais selecionados segundo os fatores que influenciam o comportamento das bactérias (adaptado de [41]).

Também na Tabela 3.4 (p. 41) são apresentados os materiais ensaiados, sendo especificadas as razões da sua escolha, tendo em conta os fatores que influenciam o comportamento das CB, de forma mais detalhada.

Tabela 3.4 – Descrição das principais razões para a realização dos ensaios, particularmente para cada provete.

Material	Fotografia	Motivo do Ensaio
Nióbio		<p>Avaliar o seu efeito bactericida (fator: química) e a influência da rugosidade superficial no comportamento das CB (Fator: topografia).</p>
Pirite (FeS ₂)		<p>Testar o comportamento das CB perante um material com a mesma química, mas superfície diferente, dependendo do ângulo do plano de corte (fator: topografia).</p>
Fe-Ni		<p>Avaliar a capacidade das bactérias se distribuírem numa superfície com heterogeneidade química, verificando a sua preferência e a sua capacidade em fazer um “mapeamento superficial” do material (fator: química e topografia).</p>
NiTi		<p>Avaliar o comportamento das CB perante um material com a mesma química e fases cristalográficas distintas (fator: cristalografia).</p>
CuAlMn (M e P)		<p>Avaliar o efeito da estrutura cristalina e das fases presentes, mantendo constantes a química, topografia e geometria de defeitos (fator: cristalografia das fases presentes).</p>
Moedas (1€, 0,10€ e 0,02€)		<p>Alargar conhecimento, uma vez que se tratam de materiais ainda não ensaiados. A moeda de 1€ também pretende averiguar o comportamento das CB perante defeitos com geometrias diferentes (fator: morfologia do defeito).</p>
Aço Duplex		<p>Averiguar o comportamento das CB perante um material com heterogeneidade química e fases cristalográficas diferentes (fatores: química e cristalografia de fases presentes).</p>

<p>Ferro Fundido</p>		<p>Material com heterogeneidade química, apresentando veios de grafite circundados de ferrite em matriz perlítica (fator: química).</p>
<p>CD e DVD</p>		<p>Averiguar a capacidade das CB em fazer um mapeamento da superfície de um CD e um DVD que possuem micro e nano indentações laser, após serem gravados (fator: topografia).</p>
<p>Platinado</p>		<p>Alargar conhecimento, uma vez que é um material que nunca foi ensaiado.</p>
<p>Fio CuAlMn</p>		<p>Averiguar o comportamento das CB perante um material com tamanhos de grão diferentes devido à soldadura a Laser.</p>
<p>Juntas Bimetálicas</p>		<p>O interesse neste ensaio passa por averiguar o comportamento das CB na interseção de dois materiais com potenciais eletroquímicos opostos, onde se irá gerar uma transferência de iões (fator: química).</p>
<p>PLA</p>	<p>10x10 mm</p>	<p>Testar o comportamento das CB num material polimérico biodegradável.</p>
<p>Revestimentos da indústria aeronáutica</p>		<p>Alargar conhecimento, uma vez que é um material emergente no ramo dos revestimentos aeronáuticos averiguar comportamento das CB perante uma superfície mais porosa.</p>

3.3 Células Bacterianas Utilizadas

Desempenhando um papel preponderante para o sucesso da técnica, a escolha das CB a utilizar durante os ensaios é uma etapa de elevada importância. Uma vez que a bactéria *Rhodococcus erythropolis* DCL14, com potencial elétrico positivo e negativo, foi a que conduziu a melhores resultados, na generalidade dos ensaios anteriores [1,3,5], detetando os defeitos padrão de menor dimensão, optou-se pela utilização desta bactéria com morfologia *coccus*, cujas principais propriedades seguem na Tabela 3.5.

Tabela 3.5 – Propriedades da bactéria utilizada nos ensaios laboratoriais [4].

Designação	Propriedades	Diâmetro [μm]	Temperatura de sobrevivência [$^{\circ}\text{C}$]	Fonte de Carbono
<i>Rhodococcus erythropolis</i> DCL14	Capacidade de alterar carga elétrica superficial	0,92	24-35	Etanol (negativas) Tridecano (neutras) Hexadecano (positivas)

Dada a influência da fonte de carbono na tensão superficial das bactérias e na hidrofobicidade das mesmas, é importante evidenciar que, com o aumento do comprimento das suas fontes de carbono (etanol < tridecano C13 < hexadecano C16), o potencial zeta das CB torna-se gradualmente menos negativo e a hidrofobicidade também aumenta no mesmo sentido (Tabela 3.6) [42].

Tabela 3.6 – Outras características das bactérias *Rhodococcus erythropolis* DCL 14

Fonte de Carbono	Potencial zeta	Hidrofobicidade (CSH)
Etanol	-25,6 mV	CSH $\text{CB}_{\text{etanol}} < \text{CSH}_{\text{CB}_{\text{tridecano}}} < \text{CSH}_{\text{CB}_{\text{hexadecano}}}$
Tridecano	-0,15 mV	
Hexadecano	+4,65 mV	

3.4 Ensaios Experimentais com CB

Foram realizados diversos ensaios experimentais com os materiais anteriormente descritos, de forma a averiguar a viabilidade da técnica a um leque de materiais mais abrangentes, onde se destacam o Nióbio, o platinado, liga de memória de forma CuAlMn em diferentes fases (austenítica e martensítica), aço duplex e revestimentos alternativos ao revestimento cromado e à anodização. Estes ensaios foram realizados nas instalações do Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia (iBB), no Instituto Superior Técnico (IST), sendo que a planificação dos mesmos é apresentada na Tabela 3.7.

Tabela 3.7 – Planificação dos ensaios efetuados.

MATERIAL	TIPO DE DEFEITO	BACTÉRIA <i>(Rhodococcus erythropolis DLC14)</i>
AA 1100	1	- 0 +
AISI 316L	1	- +
Nióbio	1	- 0 +
NiTi	1	- 0 +
CuAlMn (M)	1	- +
CuAlMn (P)	1	- +
Fio CuAlMn	-	- 0 +
Moeda 1€	1, 3	- +
Moeda 0,10€	1	- +
Moeda 0,02€	1	- +
Junta Bimetálica Mg/Al	1	- +
Junta Bimetálica Mg/Cu	1	- 0 +
Ferro Fundido	1	- 0 +

Pirite	2	- 0 +
Aço Duplex	3	- 0 +
Fe-Ni com estrutura Widmanstätten	1	- 0 +
Platinado	1	- 0 +
Revestimentos da Indústria Aeronáutica	-	- 0 +
PLA	1	- +
CD e DVD	2	- +

Legenda: 1 – Micro indentações típicas

2 – Defeitos reais

3 – Defeitos do tipo riscado

3.4.1 Alumínio AA 1100

Esta liga de Alumínio já fora testada diversas vezes com a técnica de END com CB em trabalhos anteriores quer apenas com deposição da suspensão bacteriana [1,5,10], quer com aplicação de campos externos [1–5]. Trata-se de um material bastante ensaiado, uma vez que foi utilizado em ensaios preliminares para serem verificadas as condições de ensaio.

Os resultados dos ensaios apenas com deposição das CB (sem aplicação de campos externos) são apresentados na Figura 3.6.

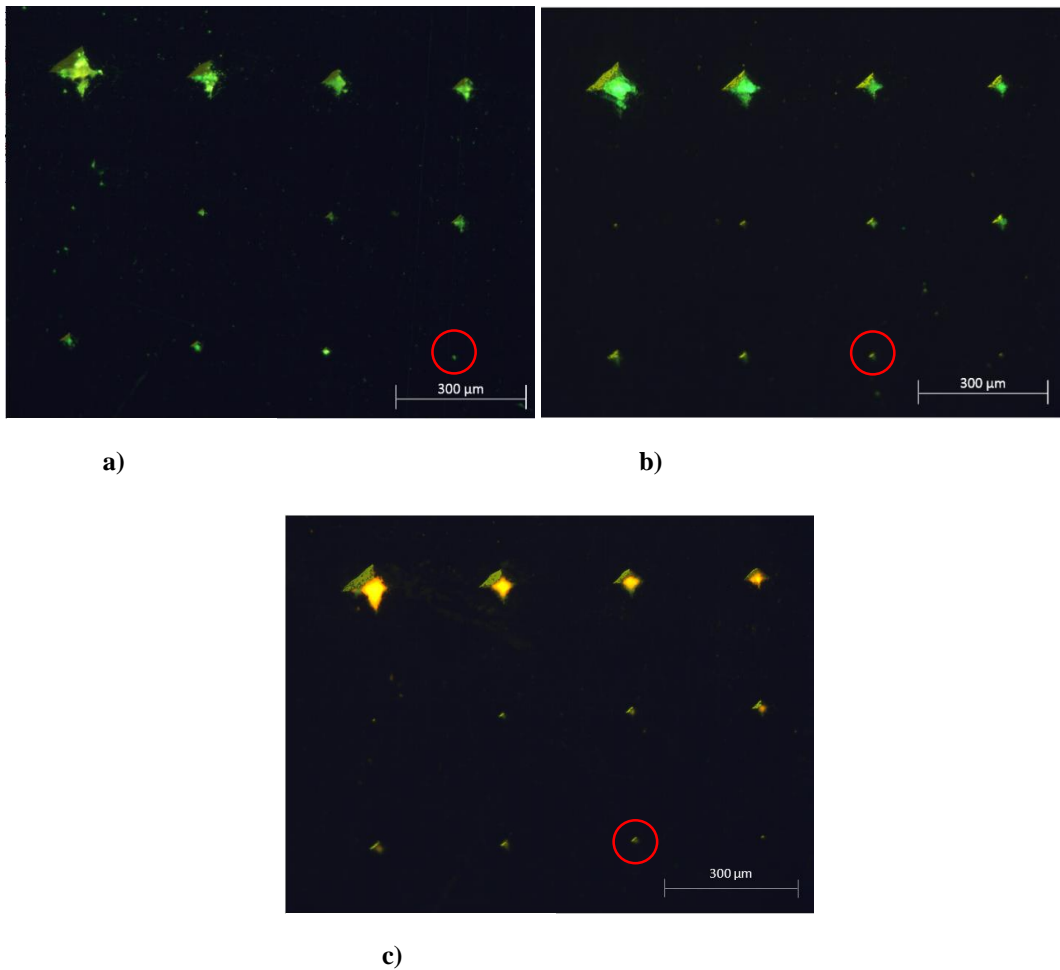


Figura 3.6 – Resultados dos ensaios após deposição de: a) CB negativas; b) CB positivas; c) CB neutras.

Pelas imagens obtidas, é perceptível que as CB com potencial negativo permitiram detetar até ao menor defeito ($L = 8,42 \mu\text{m}/P = 1,7 \mu\text{m}$), contrariamente às CB com potencial positivo e neutro que só detetaram até ao defeito G ($L = 15,74 \mu\text{m}/P = 3,2 \mu\text{m}$). Apesar disso, as CB com potencial positivo estavam em maior quantidade nos defeitos do que as restantes e as bactérias neutras presentes nos defeitos estavam mortas (cor avermelhada). Na realidade, a diferença entre os ensaios não foi significativa, o que contrasta com os resultados de Pedro Pata [10], onde as CB positivas foram largamente melhores do que as CB negativas, já que estas últimas não detetaram qualquer defeito.

Os resultados obtidos revelaram-se melhores para as CB com potencial negativo, cuja tensão superficial é a mais negativa ($-25,6 \text{ mV}$) e a hidrofobicidade é a menor, em comparação com as restantes CB utilizadas nos ensaios.

3.4.2 AISI 316L

Este também é um dos materiais já ensaiados anteriormente [5], que serviu, igualmente, para o controlo das condições de ensaio. Os resultados dos ensaios desta liga de aço inoxidável com deposição de CB, com potenciais negativo e positivo, são apresentados na Figura 3.7:

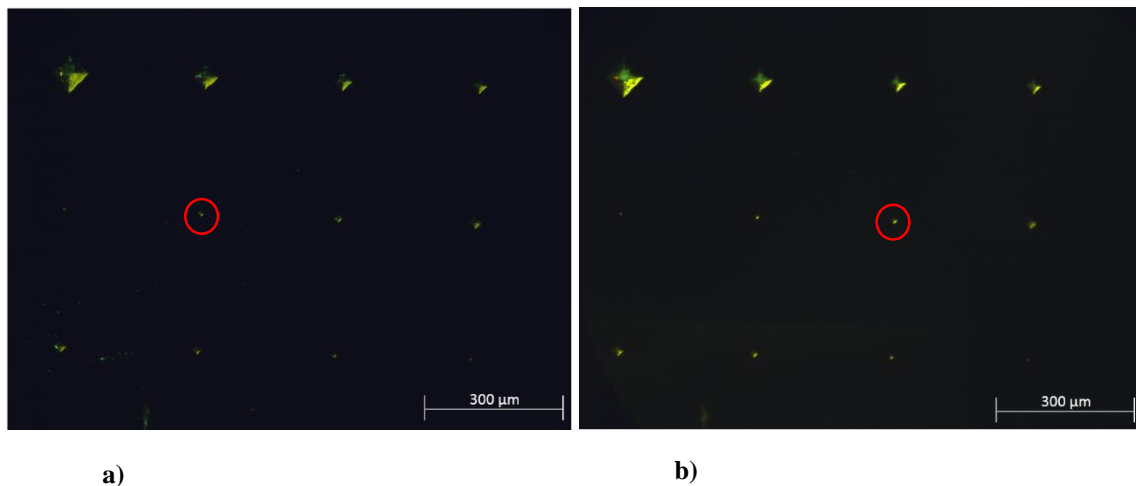


Figura 3.7 – Uma das três matrizes do provete após deposição de a) CB negativas; b) CB positivas.

Para este material, as CB com potencial negativo permitiram obter resultados melhores, uma vez que foram identificados todos os defeitos até ao G ($L = 11,1 \mu\text{m}/P = 2,3 \mu\text{m}$), enquanto as CB com potencial positivo apenas permitiram detetar até ao defeito

F ($L = 15,6 \mu\text{m}/P = 3,2 \mu\text{m}$). Apesar disso, em ambos os casos a quantidade de CB presente nos defeitos foi muito reduzida, dificultando a análise de resultados.

De certa forma, estes resultados vão ao encontro dos de Alexandre Costa [5], que constatou que as CB com potencial negativo pouco aderiram à superfície do material apenas com a sua deposição sendo necessária a aplicação de campos externos, nomeadamente o campo magnético, para aumentar a sua adesão aos defeitos, não sendo alterada, porém, a sua quantidade nos defeitos.

3.4.3 Nióbio

Este material é utilizado na engenharia como elemento adicional de ligas metálicas (especialmente ligas de aço), dada a sua propensão para a formação de carbonetos/carbonitretos que precipitam em torno dos grãos do material, impedindo o seu crescimento e, conseqüentemente, melhorando a sua resistência mecânica.

Foram preparados um provete polido (lixa P2500) e outro não polido para averiguar o comportamento das CB perante superfícies do mesmo material com diferente rugosidade. A Figura 3.8 ilustra os resultados dos ensaios realizados no provete não polido.

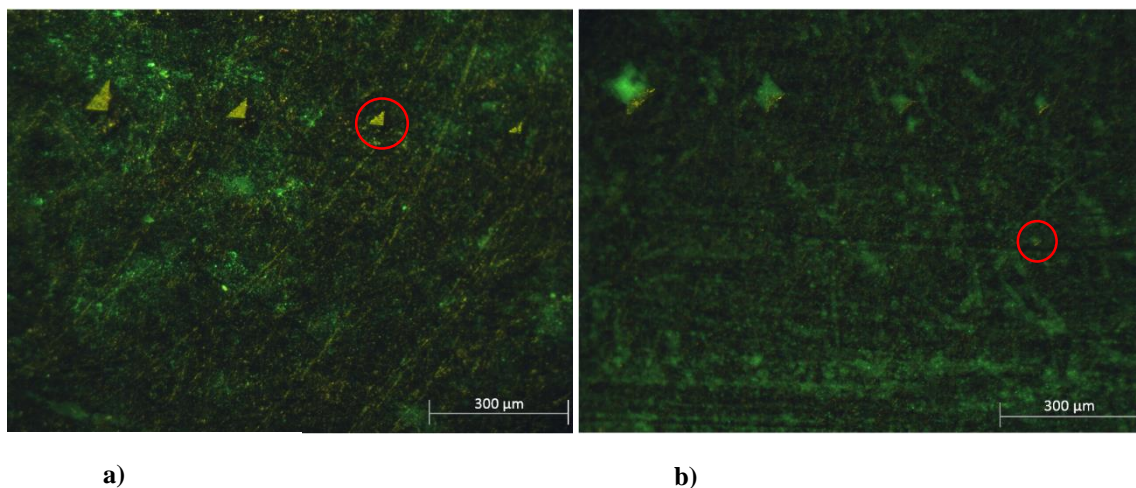


Figura 3.8 – Matrizes do provete não polido de nióbio após deposição de a) CB negativas; b) CB positivas.

Como a rugosidade do próprio material é elevada e só as maiores indentações são perceptíveis, ambas as CB tiveram preferência em se depositarem na superfície, fazendo uma caracterização topográfica do material. No entanto, foram as CB com potencial positivo que conduziram ao melhor resultado detetando até ao defeito E ($L = 33,53 \mu\text{m}/P = 6,77 \mu\text{m}$), ao contrário das CB negativas que detetaram apenas até ao defeito C ($L = 67,04 \mu\text{m}/P = 13,54 \mu\text{m}$),

ainda que em muito pouca quantidade (a maioria das células encontrava-se espalhada ao longo da superfície do material, evidenciando a sua topografia).

Relativamente ao provete com polimento superficial (P2500), a Figura 3.9 ilustra os resultados dos ensaios com deposição de CB negativas e positivas.

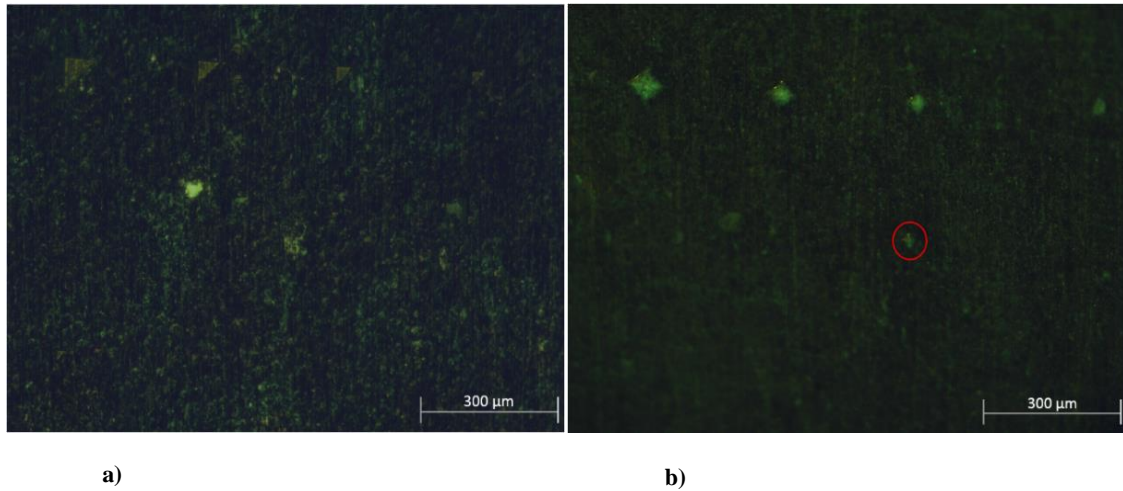


Figura 3.9 – Resultados dos ensaios no provete com polimento (P2500), após deposição de: a) CB negativas; b) CB positivas.

À semelhança do provete anterior que apresentava maior rugosidade superficial, as CB negativas continuaram a ter preferência pela superfície do material, não detetando quaisquer defeitos. Já as CB positivas conseguiram detetar até ao defeito F ($L = 20,77 \mu\text{m}/P = 4,20 \mu\text{m}$), além de também revelarem a topografia do material.

Com o objetivo de ensaiar o material sem qualquer influência da rugosidade superficial, produziu-se um terceiro provete polido com P2500+OPS, cuja fotografia de uma das matrizes é apresentada na Figura 3.10.

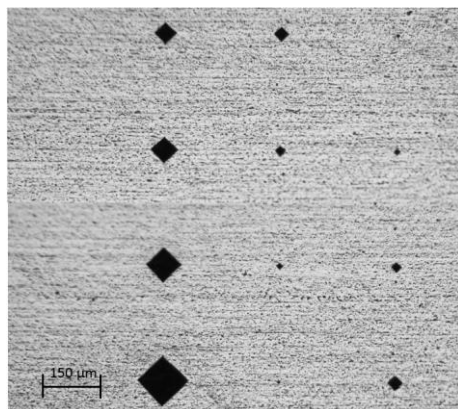


Figura 3.10 – Matriz do provete de nióbio perfeitamente polido, onde é possível verificar a nitidez dos defeitos devido à reduzida rugosidade superficial.

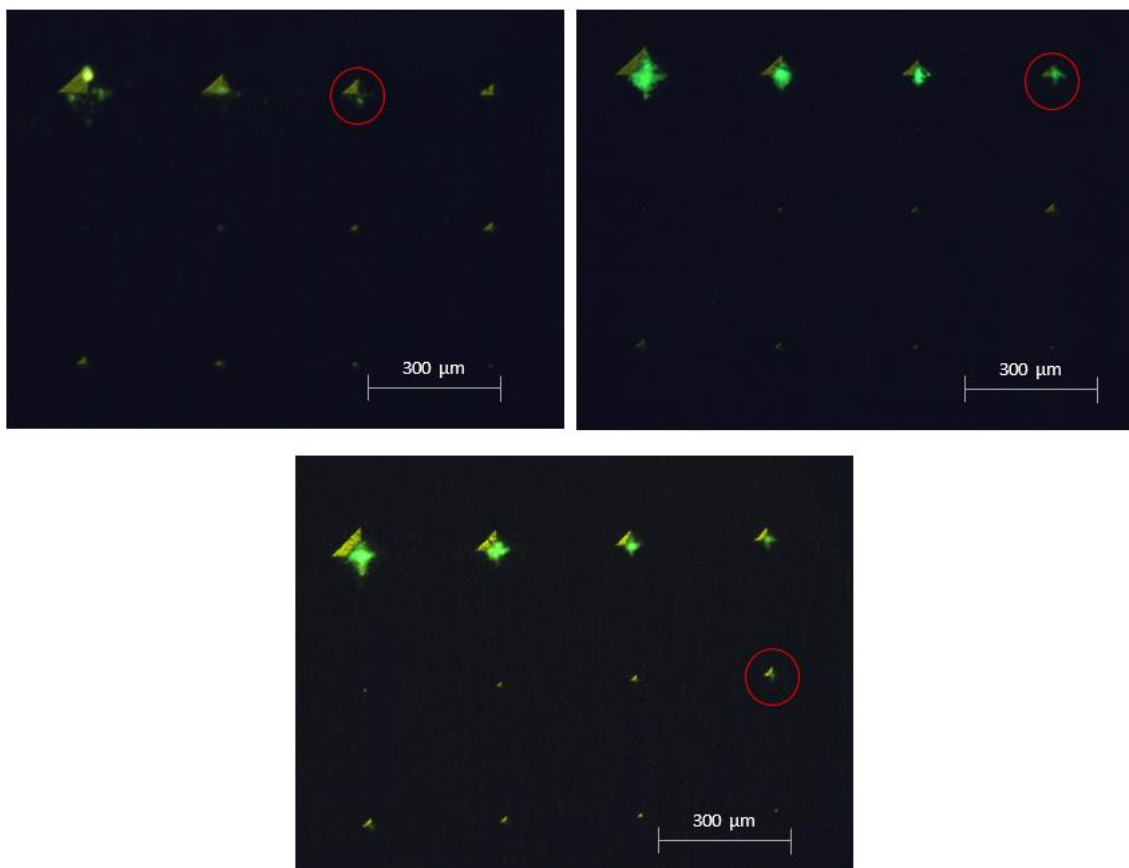


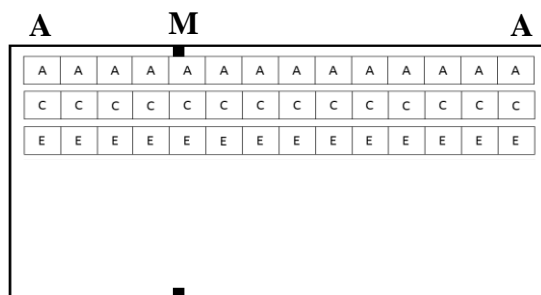
Figura 3.11 - Resultados nos ensaios com o novo provete perfeitamente polido com: a) CB negativas; b) CB neutras; c) CB positivas.

A Figura 3.11 ilustra os resultados dos novos ensaios com o Nióbio polido (lixas até à P2500 e polimento com OPS), confirmando os piores resultados das CB com potencial negativo que só detetaram até ao defeito C ($L = 66,62 \mu\text{m}/P = 13,46 \mu\text{m}$). As CB com potencial positivo demonstraram resultados semelhantes aos anteriores, detetando até ao defeito E ($L = 35,79 \mu\text{m}/P = 7,23 \mu\text{m}$), desta vez com uma quantidade considerável de CB presentes nos defeitos. Relativamente aos resultados com CB neutras, apesar de apenas terem detetado os maiores defeitos – D ($L = 53,31 \mu\text{m}/P = 10,77 \mu\text{m}$) – ocuparam-nos em grande quantidade.

De um modo geral, os melhores resultados para o Nióbio foram verificados para este último provete, uma vez que todas as CB identificaram defeitos. Confirma-se, então, que a rugosidade superficial promoveu uma maior adesão de CB no provete, apesar de não terem penetrado nos defeitos e sim nas irregularidades do próprio material. As CB com carga positiva foram as que conduziram a melhores resultados (defeito F no provete polido apenas com as lixas), o que é compreendido pela sua maior hidrofobicidade e consequente capacidade de penetrar nos defeitos, quando comparadas com as CB com outras cargas superficiais.

3.4.4 NiTi

A liga de memória de forma NiTi (Níquel-Titânio), muito utilizada em áreas como a biomédica e a microfabricação, foi testada com o objetivo concreto de averiguar o comportamento das CB perante um material com duas fases cristalográficas distintas – austenite e martensite. Foram realizadas indentações ao longo de todo o provete (40 indentações espaçadas 500 µm) com diferentes cargas, como se pode observar na imagem Figura 3.12. Desta forma, são abrangidas as diferentes zonas do provete nas fases martensítica e austenítica. Esta diferença de fases cristalográficas foi conseguida através da deformação do material à temperatura ambiente (dobragem ao longo da zona assinalada M), apesar de não ser possível identificar concretamente o início e fim de cada uma destas fases.



a)



b)

Figura 3.12 – a) Esquema ilustrativo das filas de indentações no provete de NiTi, com as respetivas regiões nas fases austenítica (A) e martensítica (M). Salienta-se que as indentações não estão à escala nem em número correto (são meramente figurativas); b) Provete de NiTi sem CB.

Os resultados dos ensaios com CB são ilustrados na Figura 3.13 (p. 52), sendo que as imagens das indentações do provete foram limitadas a apenas uma com indentações de 1 kg e 0,3 kg.

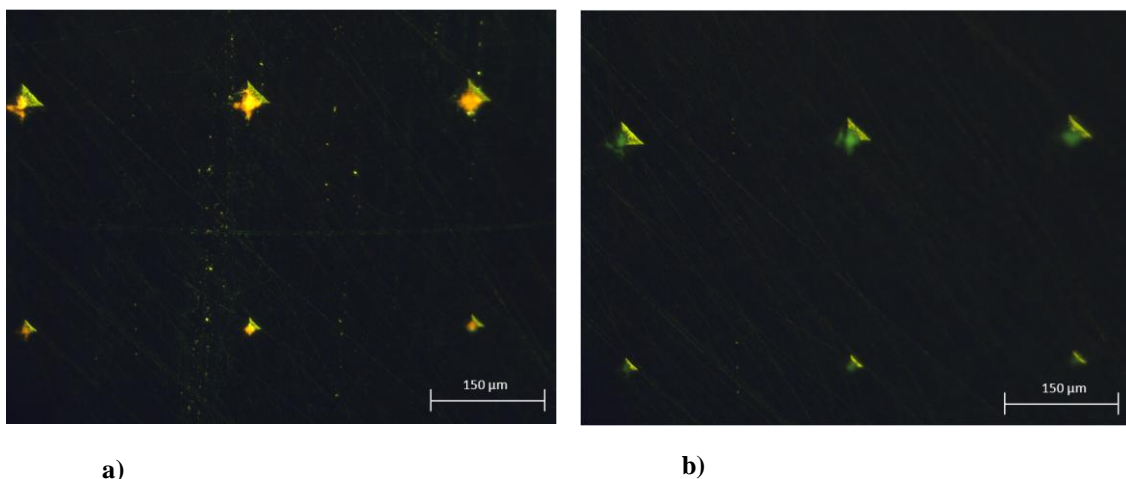


Figura 3.13 – Defeitos das filas com carfas de indentações maiores (1 kg e 0,3 kg), após deposição de: a) CB negativas; b) CB positivas.

As figuras mostram os resultados dos ensaios com CB negativas e positivas nos mesmos três defeitos. Verificou-se que as CB com potencial negativo tinham morrido, ao contrário do que se constatou para as CB com potencial positivo. Tal facto pode ter ocorrido no seguimento do longo período, após a etapa de remoção do excesso, em que as CB com potencial negativo permaneceram nos defeitos a aguardar a inspeção no microscópio. No entanto, em ambos os casos, foi possível identificar as CB em todos os defeitos padrão até à carga C ($L = 66,40 \mu\text{m}/P = 13,41 \mu\text{m}$), ainda que não se tenha verificado uma variação significativa da quantidade de bactérias presentes nos defeitos com a mudança de fase do material (austenítica – martensítica – austenítica).

Apesar de não se ter verificado nenhuma influência das fases cristalográficas do material, procederam-se a outros ensaios com o provete de NiTi, com filas de indentações já existentes no provete e semelhantes às anteriores – todas as cargas (0,01 kg – 1 kg) espaçadas por $300 \mu\text{m}$ – tal como é mostrado na Figura 3.14, p. 53.

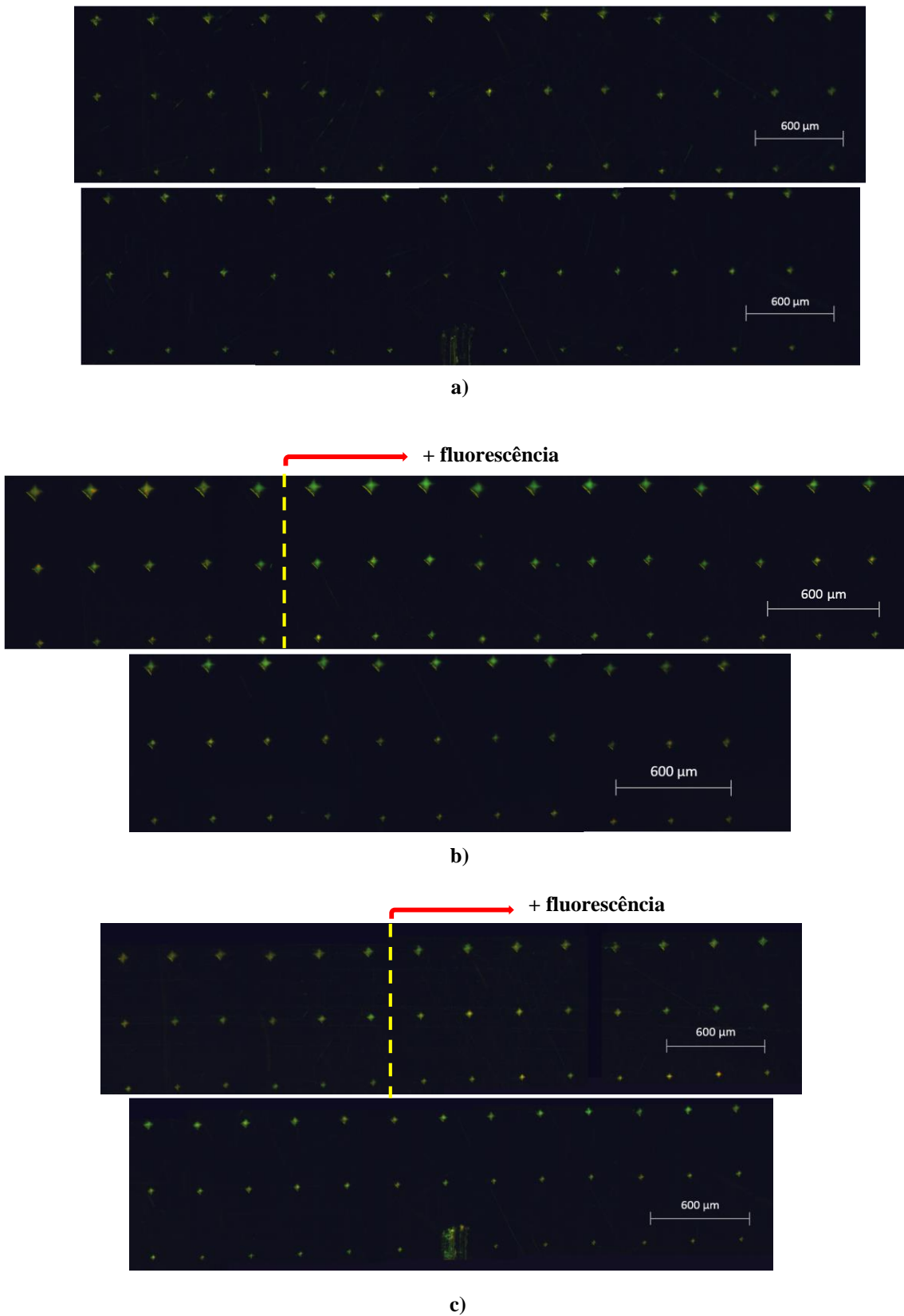


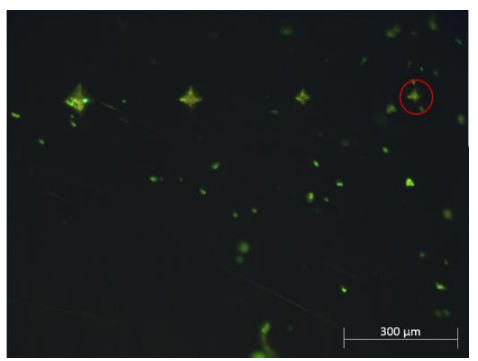
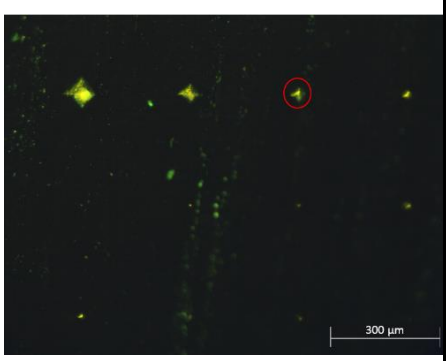
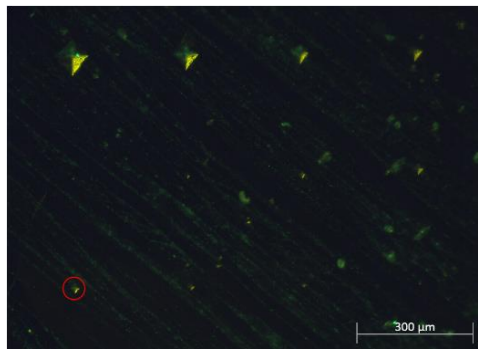
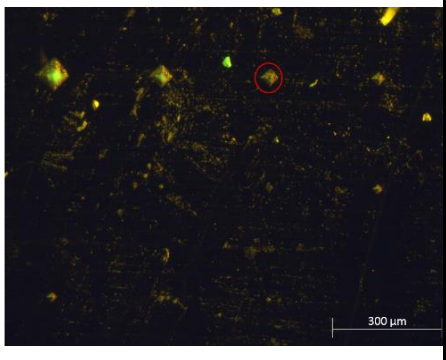
Figura 3.14 – Resultados dos novos ensaios no provete de NiTi com deposição de:
a) CB negativas; b) CB neutras; c) CB positivas.

Após novos ensaios, obtiveram-se resultados semelhantes aos anteriores, ainda que, nestas indentações, as CB positivas tenham aparentado um ligeiro aumento da sua concentração nos defeitos ao longo do provete, bem como a sua fluorescência. Isto pode significar uma sensibilidade e preferência das CB positivas (maior capacidade de penetração na superfície aliada à maior hidrofobicidade e carga superficial de +4,65 mV) pela fase martensítica do material.

3.4.5 CuAlMn (austenítico e martensítico)

Além do NiTi, há ligas de memória de forma à base de cobre, tal como o CuAlMn. Esta liga, com composição 72%Cu, 17%Al e 11%Mn, foi cortada em diferentes ângulos em relação à orientação do grão, de forma a averiguar se há efeito dos limites de grão e da orientação da estrutura cristalina, em relação à superfície, bem como o efeito da fase cristalográfica do material. Foram ensaiados provetes com corte a 0°, 45° e 90°, em reação à orientação do grão, na fase martensítica (M) e na fase austenítica (P), seguindo-se os resultados nas tabelas seguintes.

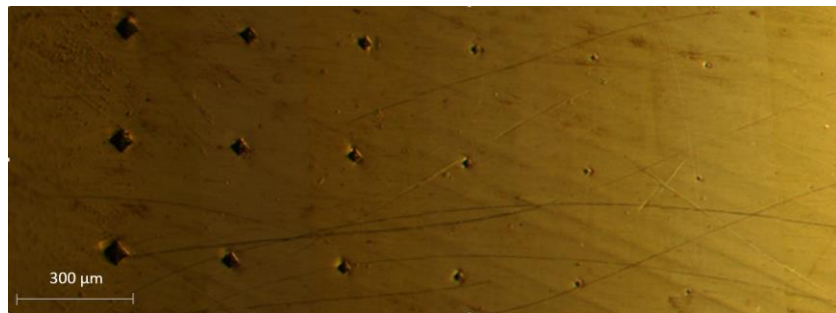
Tabela 3.8 – Resultados dos ensaios com CuAlMn (M e P), com corte a 0°.

		CORTE 0°	
		MARTENSÍTICO (M)	AUSTENÍTICO (P)
CB POTENCIAL NEGATIVO			
CB POTENCIAL POSITIVO			

Através das imagens é perceptível que, as CB, com ambos os potenciais elétricos, ocuparam preferencialmente a superfície do material, em detrimento das indentações.

Para o provete M, as CB com potencial negativo detetaram até ao defeito D ($L = 44,02 \mu\text{m}/P = 8,89 \mu\text{m}$), enquanto que para as CB positivas foram detetados os maiores defeitos (de A a C) e o defeito H ($L = 9,16 \mu\text{m}/P = 1,85 \mu\text{m}$). Quanto ao provete P, para ambas as CB o menor defeito detetado foi o C ($L = 51,45 \mu\text{m}/P = 10,39 \mu\text{m}$), sendo evidente uma perda de fluorescência de ambas as CB neste provete. Para ambos os provetes, as CB positivas também se apresentaram na sua superfície, fazendo um levantamento da sua topografia mais eficaz do que as CB negativas.

A liga CuAlMn com o corte a 45° apresenta defeitos organizados em filas de cargas que seguem uma ordem decrescente, tal como se pode verificar na Figura 3.15. O provete M (Figura 3.15a) apresenta três filas de cargas desde a carga de 0,5 kg até à menor carga de 0,01 kg (sete indentações espaçadas $300 \mu\text{m}$). Já o provete P (Figura 3.15b) inicia as suas quatro filas com a carga de 1 kg (oito indentações espaçadas $300 \mu\text{m}$).



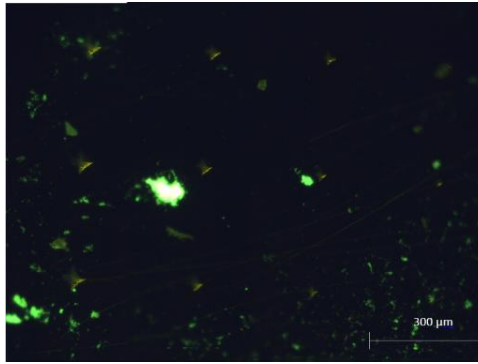
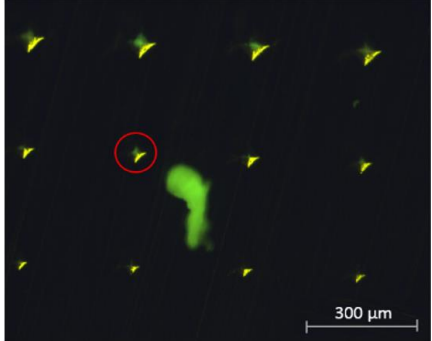
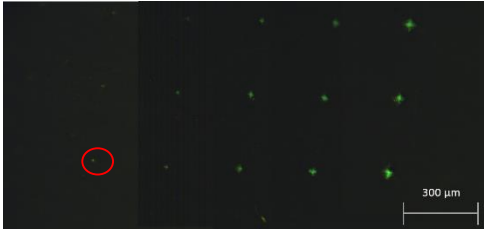

a)



b)

Figura 3.15 – Provete sem bactérias com corte a 45° : a) CuAlMn M; b) CuAlMn P.

Tabela 3.9 – Resultados dos ensaios com CuAlMn (M e P), com corte a 45°.

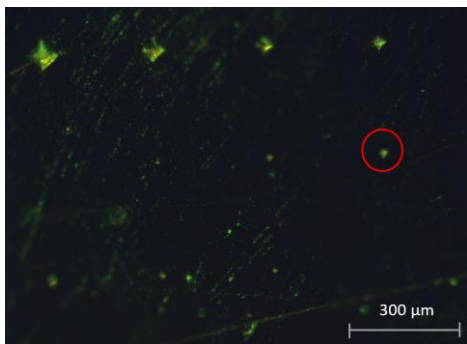
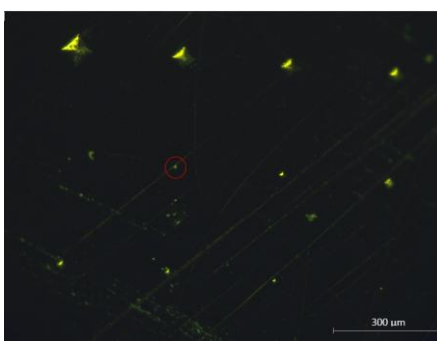
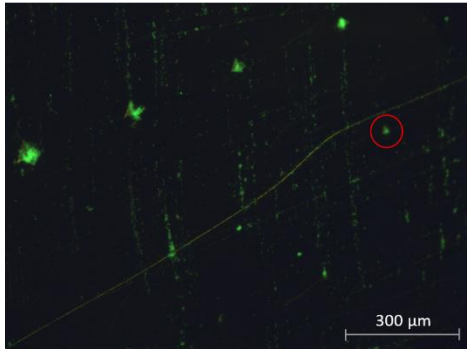
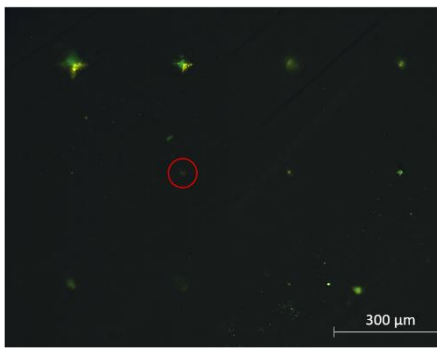
		CORTE 45°	
		MARTENSÍTICO (M)	AUSTENÍTICO (P)
CB POTENCIAL NEGATIVO			
CB POTENCIAL POSITIVO			

Através da Tabela 3.9 (acima) é possível verificar que as CB com potencial negativo não detetaram quaisquer defeitos no provete M, sendo apenas revelados defeitos superficiais do material. Para o mesmo provete, com CB positivas identificaram até ao defeito F ($L = 19,36 \mu\text{m}/P = 3,91 \mu\text{m}$).

Para o provete P, com a aplicação de CB negativas, foi identificado até ao defeito B ($L = 66,89 \mu\text{m}/P = 13,51 \mu\text{m}$) ainda que com pouca nitidez (pouca concentração de CB nos defeitos). Com a aplicação de CB positivas, o menor defeito detetado foi o E ($L = 31,99 \mu\text{m}/P = 6,46 \mu\text{m}$).

Para os provetes com corte a 45°, os melhores resultados foram conseguidos com a aplicação de CB positivas para o provete M (defeito F). No entanto, de modo geral, os resultados foram mais apelativos para o provete P.

Tabela 3.10 – Resultados dos ensaios com CuAlMn (M e P), com corte a 90°.

		CORTE 90°	
		MARTENSÍTICO (M)	AUSTENÍTICO (P)
CB POTENCIAL NEGATIVO			
CB POTENCIAL POSITIVO			

No final do ensaio com os provetes com corte a 90°, é visível uma maior concentração de CB (positivas e negativas) nas indentações e na própria superfície do material na fase martensítica, sendo que o menor defeito detetado por ambas as CB neste provete foi o E ($L = 30,44 \mu\text{m}/P = 6,15 \mu\text{m}$).

Para o provete P, a quantidade de CB presentes nos defeitos e na própria superfície é inferior à quantidade das mesmas no provete anterior. O menor defeito detetado foi o G ($L = 17,06 \mu\text{m}/P = 3,45 \mu\text{m}$) em ambos os casos.

É perceptível que as CB com potencial positivo conduziram a melhores resultados, nomeadamente no provete austenítico.

3.4.6 Fio de CuAlMn

Além dos provetes anteriores, também foi ensaiado um fio soldado a laser do mesmo material, cujo interesse reside na região soldada, onde o tamanho de grão foi modificado (Figura 3.16). Pretende-se, com este ensaio, perceber o comportamento das bactérias perante diferentes tamanhos de grão no mesmo material.

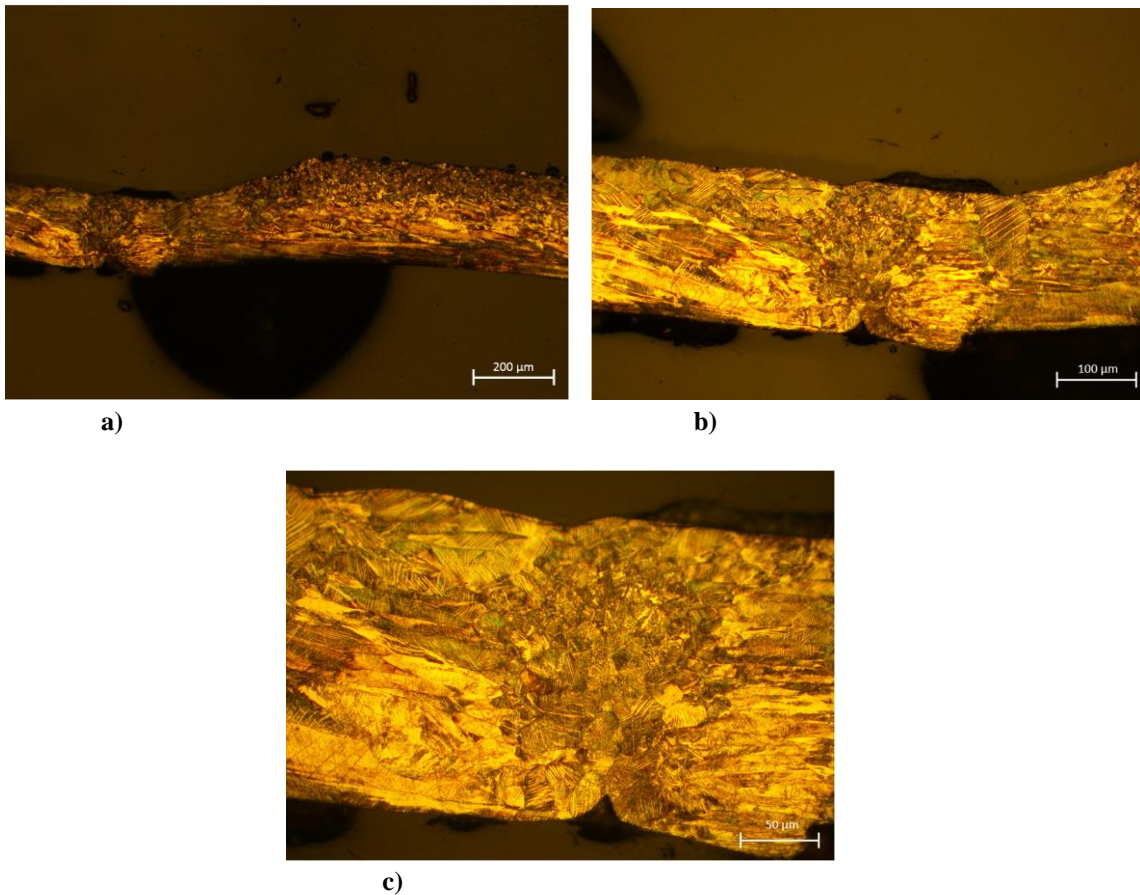


Figura 3.16 – Imagens da zona soldada do fio de CuAlMn, onde é evidente o tamanho de grão de menor dimensão, devido à ação do laser, em comparação com o tamanho dos grãos circundantes. (ataque químico: 1g FeCl₃ + 2,5 ml HCL + 10 ml H₂O).

A figura seguinte (Figura 3.17, p. 59) ilustra os resultados dos ensaios com CB com potenciais negativo, neutro e positivo.

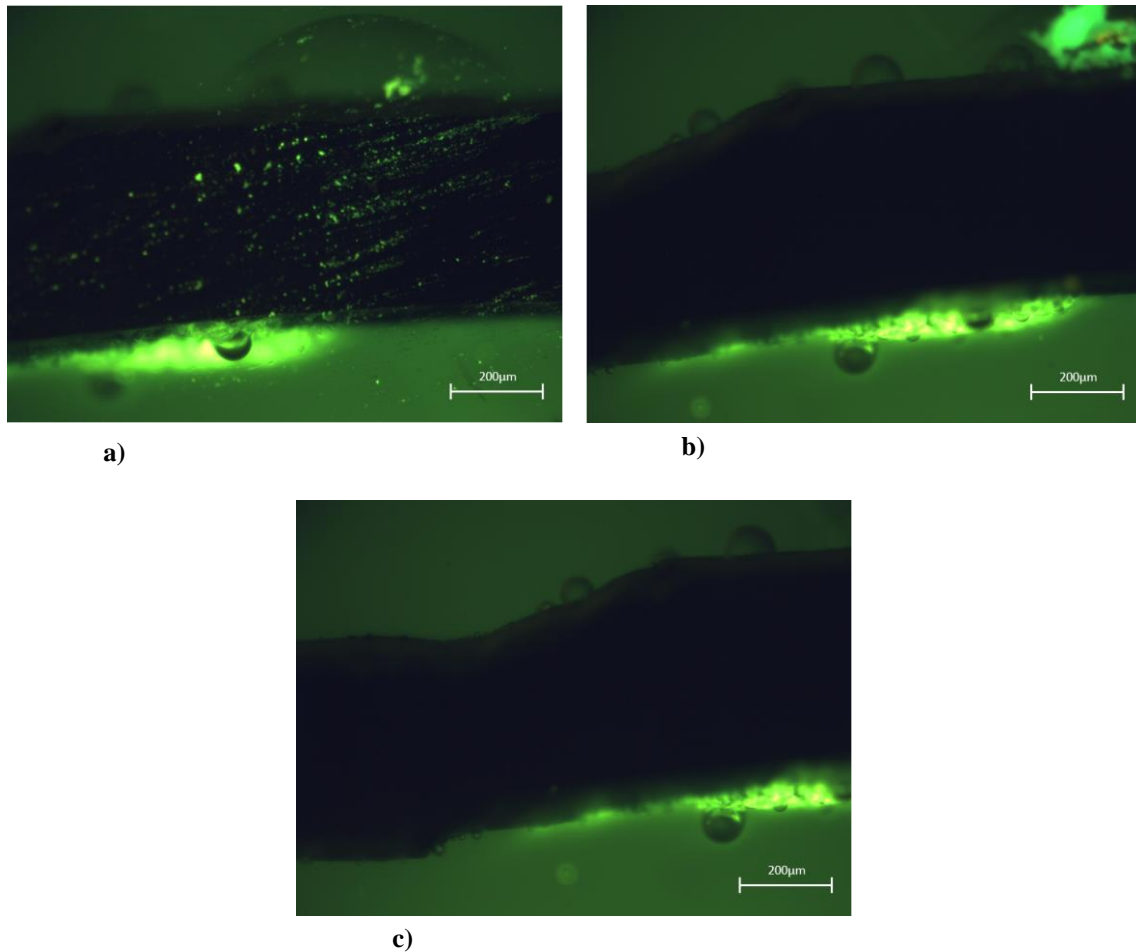


Figura 3.17 – Resultado dos ensaios após deposição de: a) CB negativas; b) CB neutras; c) CB positivas.

Analisadas as imagens, os melhores resultados foram obtidos com CB negativas, cujo potencial de superfície é negativo (-25,6 mV) e reduzida hidrofobicidade, ainda que não tenham detectado os diferentes tamanhos de grão ou tido preferência entre eles. Crê-se que as CB se tenham depositado em pequenos e ligeiros riscos criados durante o polimento.

No entanto, era de esperar que os melhores resultados fossem dados pelas CB positivas, uma vez que se sabe que CB hidrofóbicas têm mais facilidade em aderir a superfícies igualmente hidrofóbicas [16] e a hidrofobicidade das bactérias é mais elevada, tal como a própria superfície do fio é das mais hidrofóbicas que foram ensaiadas ($\theta = 67,8^\circ$). Estas diferenças dos resultados podem estar relacionadas com a carga superficial dos provetes que não foi tida em consideração ao longo dos ensaios.

3.4.7 Moeda de 1€

A moeda de 1€ é constituída por dois materiais distintos:

- Núcleo: Cuproníquel + níquel + cuproníquel;
- Coroa: Latão + níquel.

Com o objetivo de ensaiar a interface entre os dois materiais, criaram-se matrizes de defeitos em ambos de forma a apurar o comportamento das CB perante estes dois materiais. O provete contém três matrizes (duas no núcleo da moeda e uma na zona da coroa), encontrando-se divididos em duas zonas perfeitamente opostas.

A Figura 3.18 ilustra os resultados dos ensaios na zona riscada do provete.

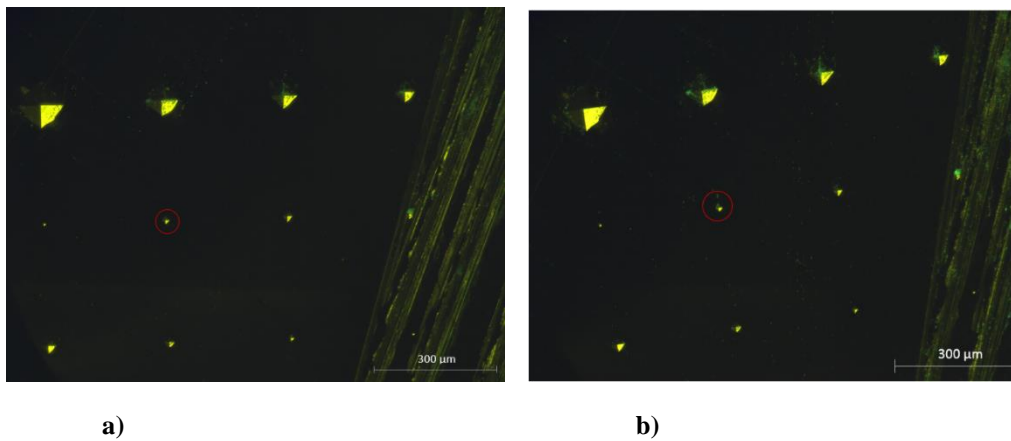


Figura 3.18 – Matrizes do material do núcleo da moeda (zona riscada), após deposição de a) CB negativas; b) CB positivas.

No núcleo da região riscada da moeda de 1€, quer as CB com potencial negativo quer positivo, foram detetados defeitos padrão até ao G ($L = 19,66 \mu\text{m}/P = 3,97 \mu\text{m}$). Apesar disso, a quantidade de bactérias nos defeitos foi reduzida, uma vez que estas se depositaram mais nos riscos da superfície, dado o aumento da área sua área de contacto.

Aas Figura 3.19 e Figura 3.20 (p. 61), são apresentados os ensaios realizados nas matrizes da região não riscada do provete.

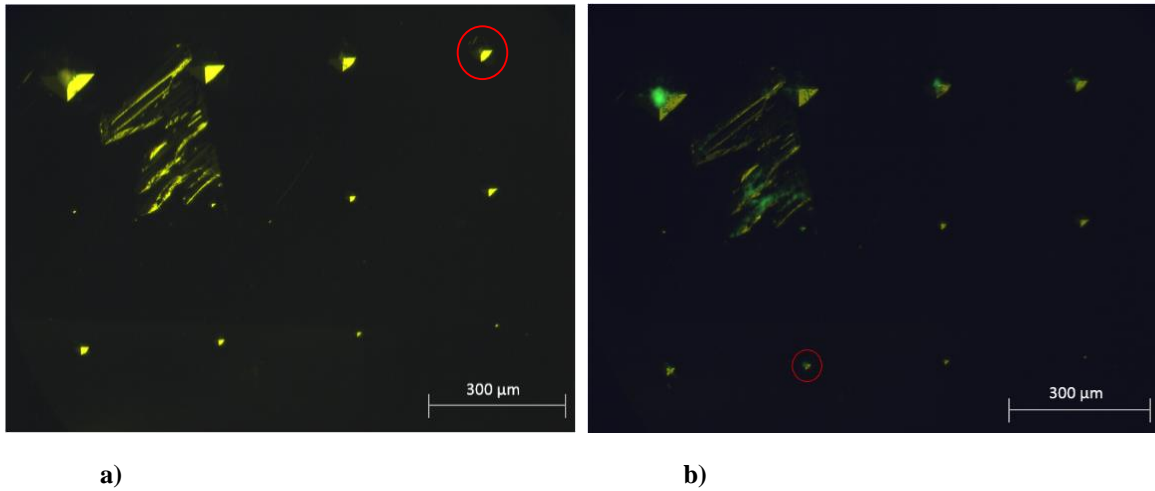


Figura 3.19 – Matrizes do material no núcleo da moeda (zona não riscada), após deposição de a) CB negativas; b) CB positivas.

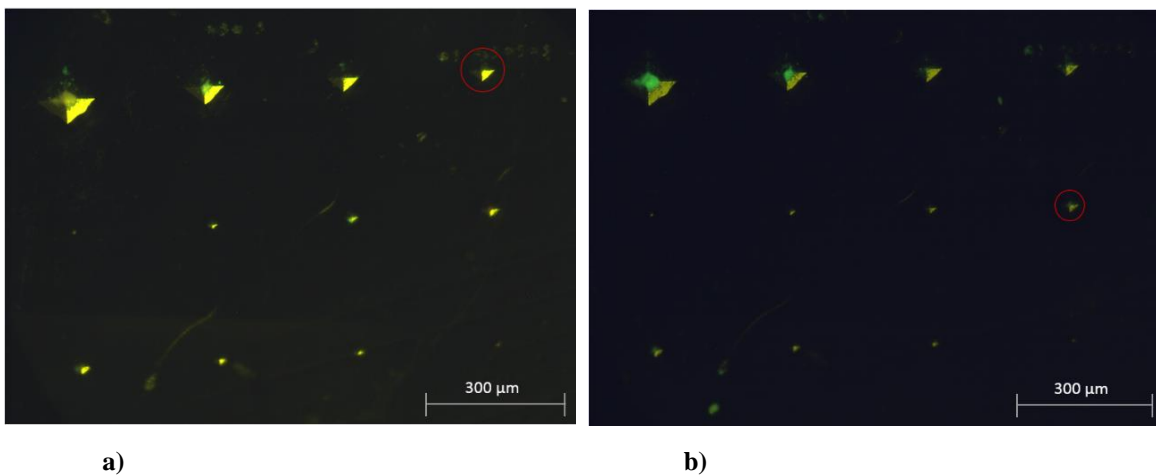


Figura 3.20 – Matrizes da coroa da moeda (zona não riscada), após deposição de a) CB negativas; b) CB positivas

Os resultados dos ensaios de deposição de CB, sem aplicação de campos externos, que são ilustrados pelas Figura 3.19 e Figura 3.20, evidenciam melhores resultados com CB com potencial positivo face às com potencial negativo.

Para as matrizes na região do núcleo da moeda sem riscos, as CB com potencial negativo (Figura 3.19a) detetaram apenas até ao defeito D ($L = 52,68 \mu\text{m}/P = 10,64 \mu\text{m}$), tendo perdido a sua fluorescência, ao contrário das CB positivas (Figura 3.19b) que detetaram até ao defeito F ($L = 27,32 \mu\text{m}/P = 5,52 \mu\text{m}$), bem como defeitos superficiais.

Na zona não riscada da moeda, na região da coroa, os resultados vão ao encontro dos descritos anteriormente. A matriz com as CB negativas (Figura 3.20a) apresenta os piores resultados, detetando com sucesso apenas até ao defeito D ($L = 56,75 \mu\text{m}/P = 11,46 \mu\text{m}$). As CB com potencial positivo (Figura 3.20b) detetarem até ao defeito E ($L = 40,02 \mu\text{m}/P = 8,08 \mu\text{m}$). Porém, os resultados para o material da coroa foram menos bons do que os resultados para o material do núcleo, sendo que esses resultados foram conseguidos pelas CB positivas. No entanto, para esta análise de resultados não se estabeleceu a relação da hidrofobicidade e carga elétrica das CB com as características da superfície, uma vez que estas últimas não eram conhecidas.

3.4.8 Moeda de 0,10€

Ao contrário da moeda de 1€, a de 10 cêntimos é constituída por um só material denominado ouro nórdico (89%Cu 5%Al, 5%Zn, 1%Sn), que não apresenta propriedades magnéticas. Os resultados dos ensaios nas matrizes desta moeda são apresentados na Figura 3.21.

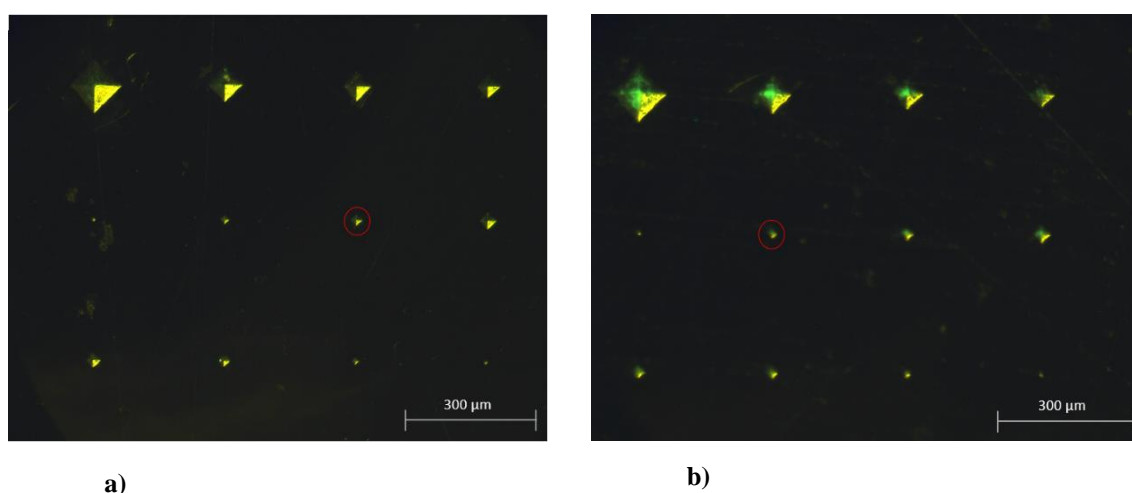


Figura 3.21 – Resultados dos ensaios realizados nas matrizes da moeda de 0,10€ com deposição de a) CB negativas; b) CB positivas.

Os melhores resultados dos ensaios para este material foram com as CB com potencial positivo, que estavam presentes em maior quantidade nos defeitos e identificaram até ao defeito G ($L = 19,93 \mu\text{m}/P = 4,03 \mu\text{m}$). Já as CB com potencial negativo estavam em pouca quantidade nos defeitos padrão, sendo apenas perceptível a sua presença até ao defeito F ($L = 26,92 \mu\text{m}/P = 5,44 \mu\text{m}$), com pouca quantidade de bactérias presentes.

3.4.9 Moeda de 0,02€

O material constituinte desta moeda é o aço cobreado, constituindo, de certa forma, uma interface entre dois materiais distintos, à semelhança da moeda de 1€. Os defeitos padrão (oito espaçadas 300 μm , no total) foram organizados em filas de cargas decrescente e seguem ilustrados na Figura 3.22.

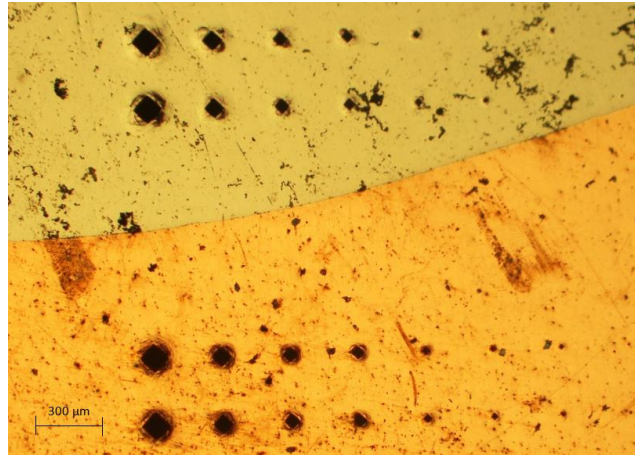
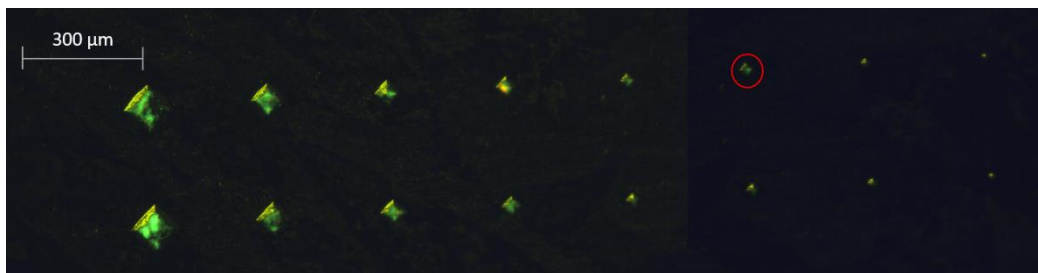


Figura 3.22 – Filas de indentações no aço (topo) e no revestimento de cobre (baixo), sem aplicação de CB.

A Figura 3.23 apresenta as imagens dos resultados dos ensaios nas filas de cargas no aço com CB com ambos os potenciais.



a)



b)

Figura 3.23 – Resultados dos ensaios na matriz de aço, após deposição de a) CB negativas; b) CB positivas.

É visível que muitas das CB com potencial negativo morreram nas indentações do aço (cor avermelhada), ainda que tenha continuado a ser possível apontar o defeito E ($L = 39,52 \mu\text{m}/P = 7,98 \mu\text{m}$) como o menor defeito detetado. Relativamente às CB com potencial positivo, o menor defeito detetado foi o F ($L = 28,11 \mu\text{m}/P = 5,68 \mu\text{m}$), sendo que não se verificaram quaisquer células mortas.

A Figura 3.24 apresenta os respetivos resultados dos ensaios nas indentações do cobre.

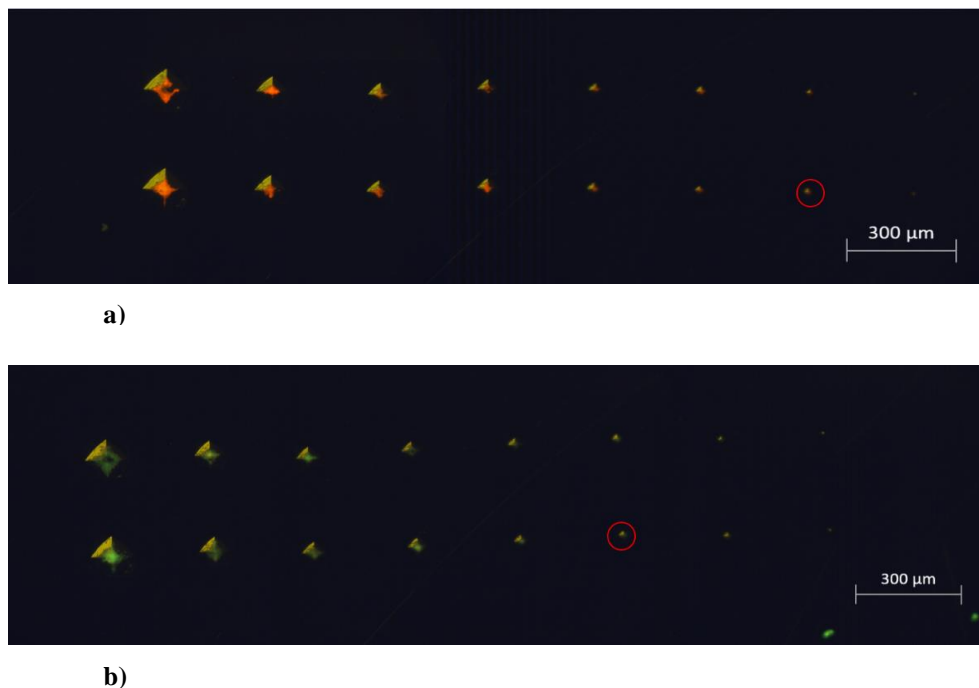


Figura 3.24 – Resultados dos ensaios realizados na matriz de cobre, após deposição de a) CB negativas; b) CB positivas.

À semelhança do que se verificou para o aço, as CB com potencial negativo morreram (na totalidade) nas indentações de cobre. Este resultado é justificável, pelo facto do cobre ser um material antibacteriano. O menor defeito detetado por estas bactérias foi o G ($L = 25,58 \mu\text{m}/P = 5,17 \mu\text{m}$), correspondendo ao melhor resultado nos ensaios realizados no provete de 0,02€.

Relativamente às CB com potencial positivo, o menor defeito detetado foi o F ($L = 31,98 \mu\text{m}/P = 6,46 \mu\text{m}$), à semelhança do ensaio na matriz de aço.

Conclui-se, então, que, para a matriz de aço, os melhores resultados foram obtidos com as CB positivas, ao contrário dos resultados da matriz de cobre que se mostraram ser com as CB negativas. Estes resultados poderão estar relacionados com o facto de ser desconhecida a carga elétrica da superfície do provete.

3.4.10 Junta Bimetálica

Os ensaios com este tipo de material decorreram com o objetivo de indagar sobre o comportamento das bactérias perante uma união física entre dois materiais com potenciais eletroquímicos opostos, tal como sugerido pela Figura 3.25 recriando, ainda que de forma simplificada, o efeito de uma pilha galvânica.

	METAL	*POT. ELETRODO	
MENOS NOBRES	Magnésio	-2,340	ANÓDICOS
	Alumínio	-1,670	
	Zinco	-0,782	
	Cromo	-0,710	
	Ferro	-0,440	
	Cádmio	-0,402	
	Níquel	-0,250	
	Estanho	-0,136	
	Chumbo	-0,126	
	MAIS NOBRES	Cobre	
Prata		+0,800	
Ouro		+1,680	

Figura 3.25 – Quadro de materiais com os seus respetivos potenciais eletroquímicos (vermelho – materiais utilizados no primeiro provete; azul – materiais utilizados no segundo provete).

O primeiro provete produzido resultou da junção de magnésio com alumínio, o que, do ponto de vista químico, não atingiu o objetivo pretendido, uma vez que os seus potenciais eletroquímicos são semelhantes. Apesar disso, foram realizadas filas de indentações com cargas decrescentes (oito no total) ao longo dos dois materiais e ensaiou-se o provete, sendo que as matrizes das indentações no topo da imagem correspondem ao alumínio, enquanto as restantes são no magnésio. Os resultados dos ensaios com CB com os respetivos potenciais elétricos são apresentados na Figura 3.26, p. 66.

Além deste provete, também foi produzido outro, desta vez com potenciais eletroquímicos efetivamente opostos – magnésio e cobre – cujos resultados são apresentados na Figura 3.27, p. 67.

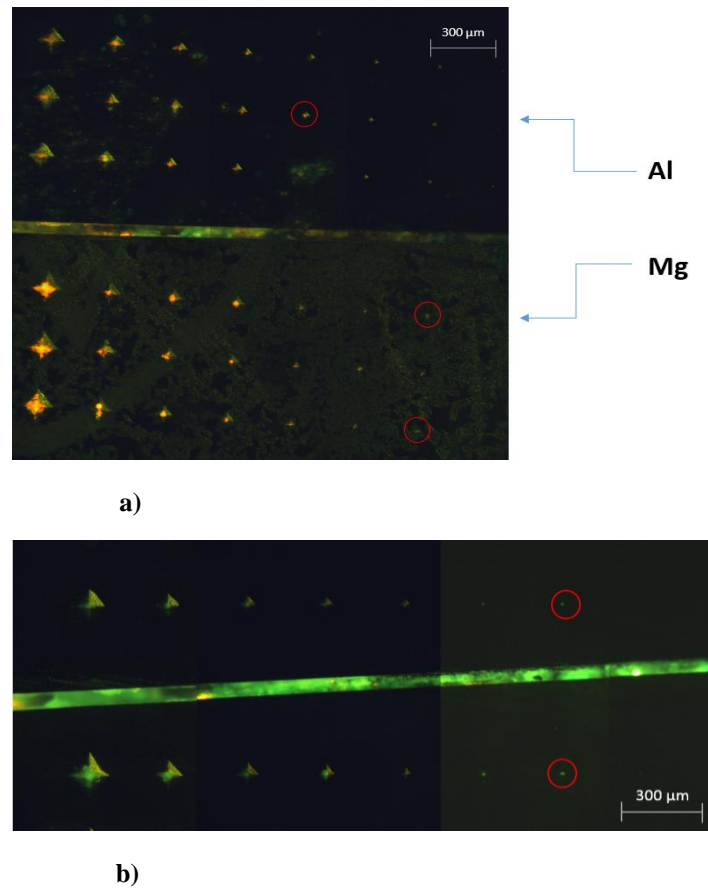


Figura 3.26 – Resultados dos ensaios realizados no primeiro provete da junta bimetalica (Al/Mg) após deposição de a) CB negativas; b) CB positivas.

É visível a morte das CB com potencial negativo nas superfícies de ambos os materiais e a biocorrosão que sucedeu na superfície do magnésio, ainda que estas tenham conseguido detetar até ao defeito G ($L = 22,22 \mu\text{m}/P = 4,49 \mu\text{m}$), no caso do magnésio, e até ao E ($L = 35,64 \mu\text{m}/P = 7,20 \mu\text{m}$) para o alumínio. A morte das CB poderá dever-se ao tempo que o provete aguardou até ser observado, após a etapa de remoção. Relativamente aos resultados obtidos com as CB com potencial positivo, estes foram semelhantes, sendo que o menor defeito detetado foi o G para a matriz de alumínio ($L = 17,63 \mu\text{m}/P = 3,56 \mu\text{m}$) e para a matriz de magnésio ($L = 22,22 \mu\text{m}/P = 4,49 \mu\text{m}$).

Em ambos os ensaios, é visível que os melhores resultados foram obtidos com CB positivas, uma vez que em ambas as matrizes o menor defeito detetado foi o G, todavia, na matriz de magnésio, as CB estão em maior quantidade.

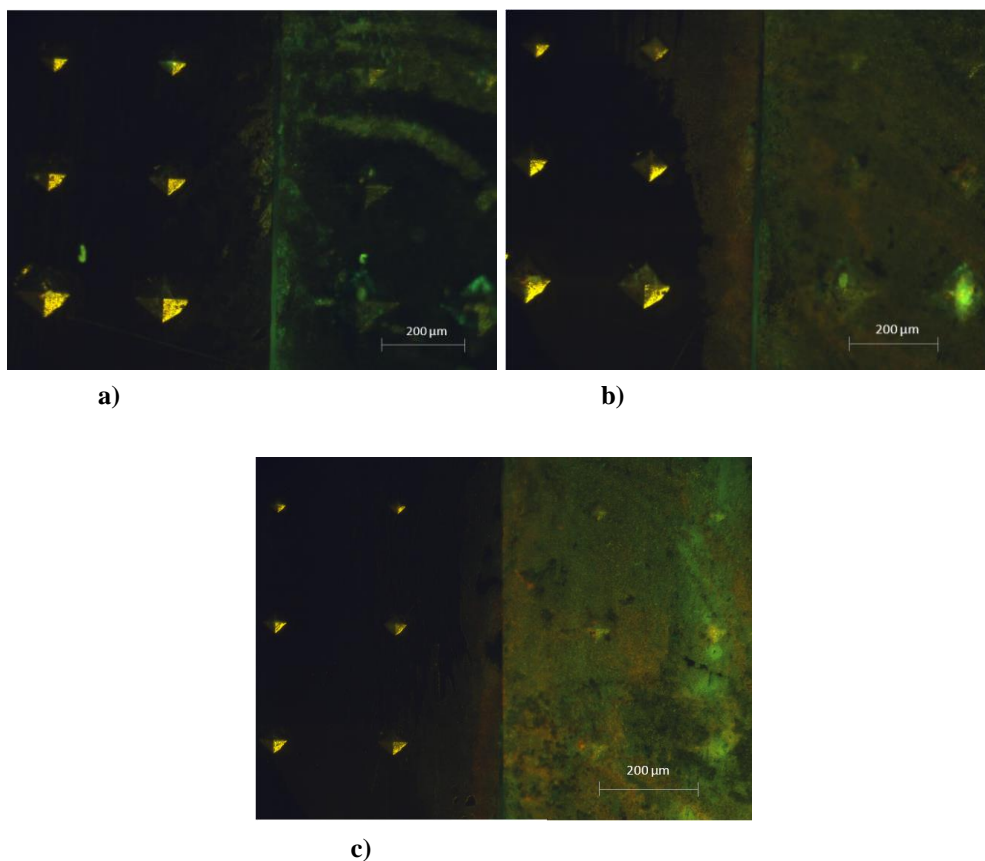


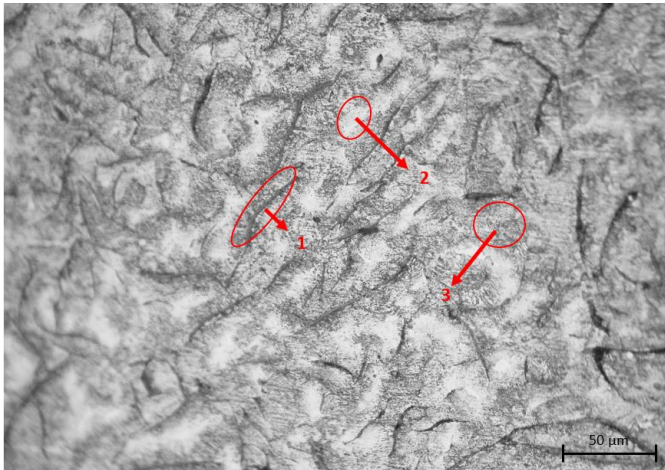
Figura 3.27 – Resultados dos ensaios realizados na junta bimetalítica Mg/Cu após deposição de: a) CB negativas; b) CB neutras; c) CB positivas.

Os resultados para este provete (Cu/Mg) contrastam com o provete anterior de Al/Mg, uma vez que a superfície do magnésio (direita) apresenta-se bem mais desgastada, o que poderá ter sido influenciado pelos potenciais eletroquímicos efetivamente opostos dos dois materiais, conjugado com a biocorrosão por parte das CB, à semelhança do provete anterior. No entanto, apesar de completamente corroída, a superfície do magnésio evidenciou a presença de CB, ao contrário do cobre, cujos vestígios destes microrganismos são inexistentes.

Ainda que não tenha sido possível definir o limite de detetabilidade, dada a degradação do magnésio, este material obteve melhores resultados nos três ensaios, uma vez que é possível identificar CB na sua superfície, ao contrário da superfície de cobre, cuja presença de CB na sua superfície é nula. Esta diferença acentuada de concentração de bactérias poderá também estar associada à libertação de iões, que poderá ter desencadeado uma ação antibacteriana devido à interação entre os dois materiais constituintes, já que têm potenciais eletroquímicos opostos. No entanto, não foram feitos testes suficientes de forma a ser esclarecida esta afirmação.

3.4.11 Ferro Fundido

Foi ensaiado ferro fundido cinzento, de constituição desconhecida, de forma a ser investigado o comportamento das CB perante um material que possui uma matriz perlítica com grafite vermicular, envolvida por ferrite. É um material bastante comum, devido ao seu baixo custo e elevada maquinabilidade. A Figura 3.28 apresenta uma amostra do ferro fundido ensaiado, após contraste com solução Nital 4%.



Legenda:

- (1) Grafite vermicular;
- (2) Perlite (regiões brancas do material);
- (3) Ferrite (região cinzenta que envolve a grafite).

Figura 3.28 – Ferro fundido cinzento, após contraste com solução Nital 4%.

A imagem que se segue (Figura 3.29, p. 69) ilustra os resultados dos ensaios obtidos com CB com potenciais negativo e neutro.

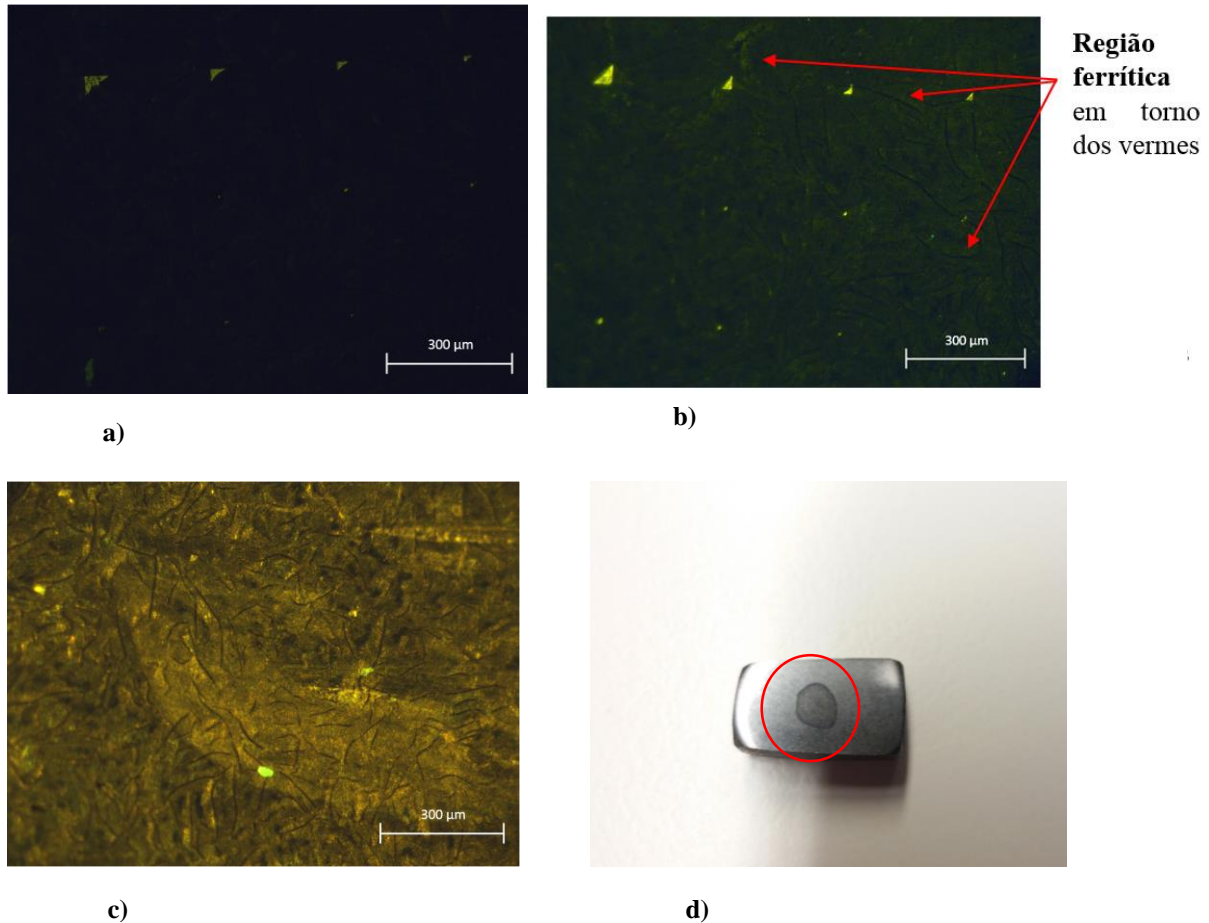


Figura 3.29 – Resultados dos ensaios: a) sem CB (luz fluorescente); b) CB negativas (luz fluorescente); c) CB neutras (luz fluorescente + visível); d) Biocorrosão na superfície do provete.

Tal como pode ser observado pelas imagens dos ensaios, o material não foi ensaiado com CB positivas dada a elevada corrosão observada na superfície, destruindo a matriz de indentações. É visível a inexistência desta matriz da Figura 3.29b para a Figura 3.29c, devido à biocorrosão provocada pela solução com bactérias (Figura 3.29d). Ainda assim, mesmo na Figura 3.29b que ilustra o ensaio com CB negativas e onde se tem uma melhor percepção da matriz, as CB negativas não penetraram em nenhum defeito, mas parecem ter tido preferência pelas regiões de ferrite do material – ferrite surge mais destacada na Figura 3.29b do que na Figura 3.29a. Isto pode indicar uma influência da microestrutura no comportamento das CB, bem como comprovar importância da hidrofobicidade, uma vez que estes resultados foram obtidos com deposição de CB negativas, cuja hidrofobicidade é a menor quando comparado com as restantes, numa superfície que se sabe ser hidrofílica ($\theta = 21,1^\circ$)

3.4.12 Pirite

A pirite é um mineral constituído por ferro e enxofre (FeS_2), representando o sulfeto mineral mais comum no mundo. O principal interesse em ensaiar este material com as CB deve-se ao facto de ser um mineral que apresenta inúmeros defeitos superficiais reais e é constituído por dois elementos químicos de grupos diferentes da tabela periódica, com propriedades distintas (Figura 3.30).

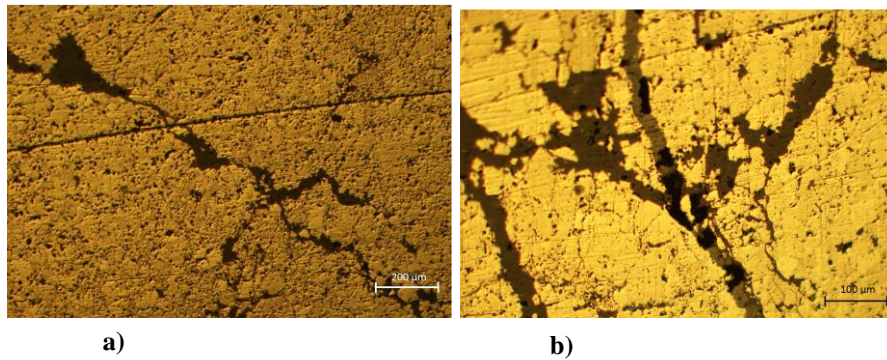


Figura 3.30 – Imagens pormenorizadas da superfície da pirite.

Na figura seguinte (Figura 3.31) são apresentados os resultados dos ensaios realizados com CB com os três potenciais zeta.

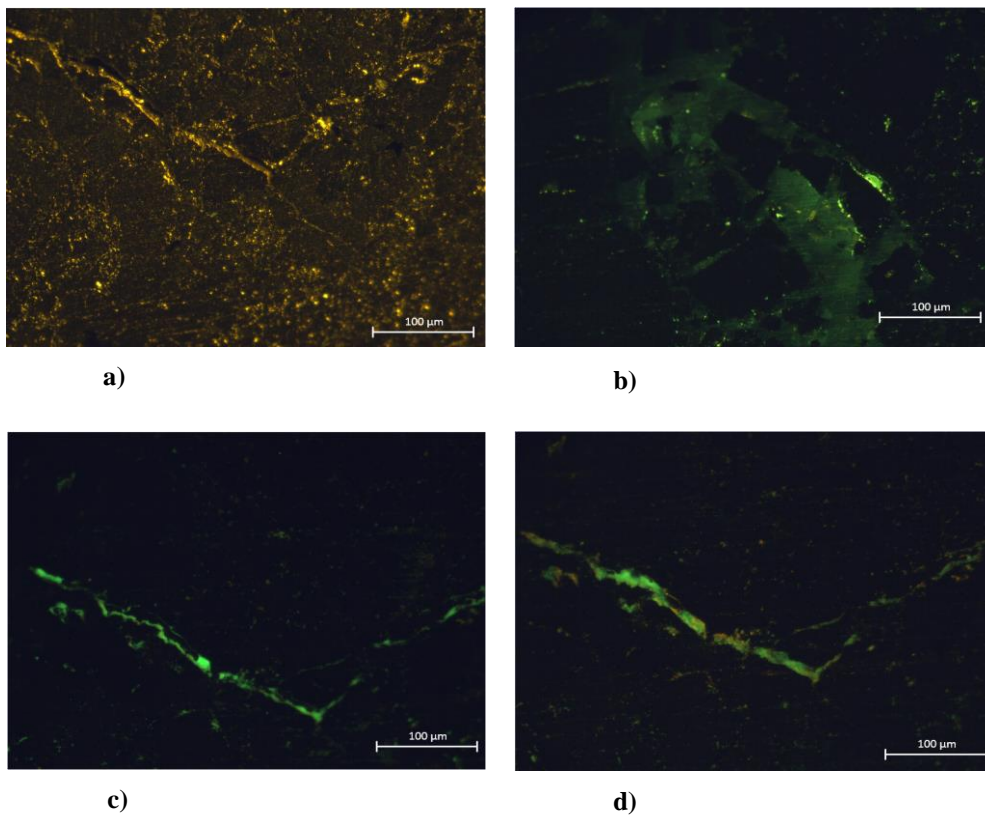


Figura 3.31 – a) Material sem CB; b) CB negativas; c) CB neutras; d) CB positivas.

Após analisadas as imagens da Figura 3.31, é visível que todas as CB aderiram bem à superfície do provete, porém as imagens mais perceptíveis dos defeitos superficiais são obtidas utilizando CB neutras. As CB negativas penetraram nos defeitos mais superficiais do provete, dada a sua reduzida hidrofobicidade e sendo a pirrite um material aproximadamente hidrofóbico. Já as CB positivas, apesar de detetarem os defeitos mais profundos (elevada hidrofobicidade), evidenciaram algumas células mortas na superfície do provete.

3.4.13 Aço Duplex (UNS S32101)

Este é um tipo de aço inoxidável composto pela combinação de dois tipos de microestruturas: ferrítica e austenítica. Este tipo de aços apresenta elevada resistência à corrosão e elevada resistência mecânica, aliada a uma boa tenacidade. Assim sendo, este material é de elevado interesse, uma vez que é cada vez mais abundante na indústria e possuiu duas microestruturas distintas, tendo em vista observar o comportamento das CB após a sua deposição no material.

Nas figuras que se seguem é apresentado o tipo de defeito do material (Figura 3.32), bem como os resultados dos ensaios com aplicação de CB negativas, neutras e positivas (Figura 3.33, p. 72).

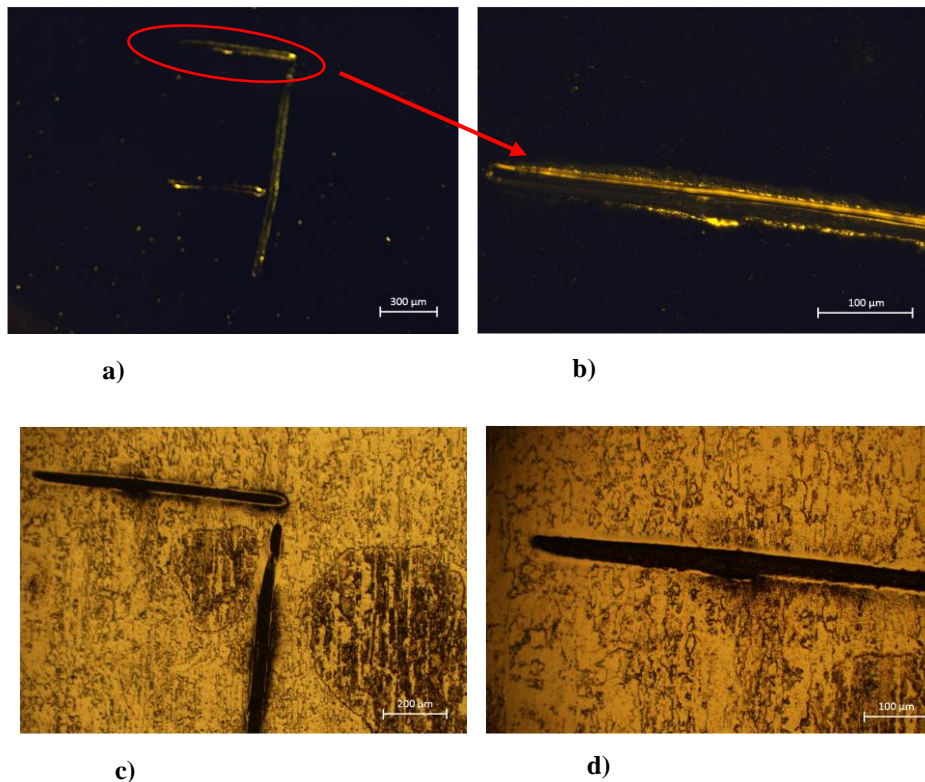


Figura 3.32 – a) Defeito tipo risco ainda sem CB; b) Pormenor da zona do defeito onde serão depositadas as CB; c) d) Pormenores do defeito riscado após contraste com solução Marble (1g CuSO₄ + 5ml HCl + 5 ml H₂O).

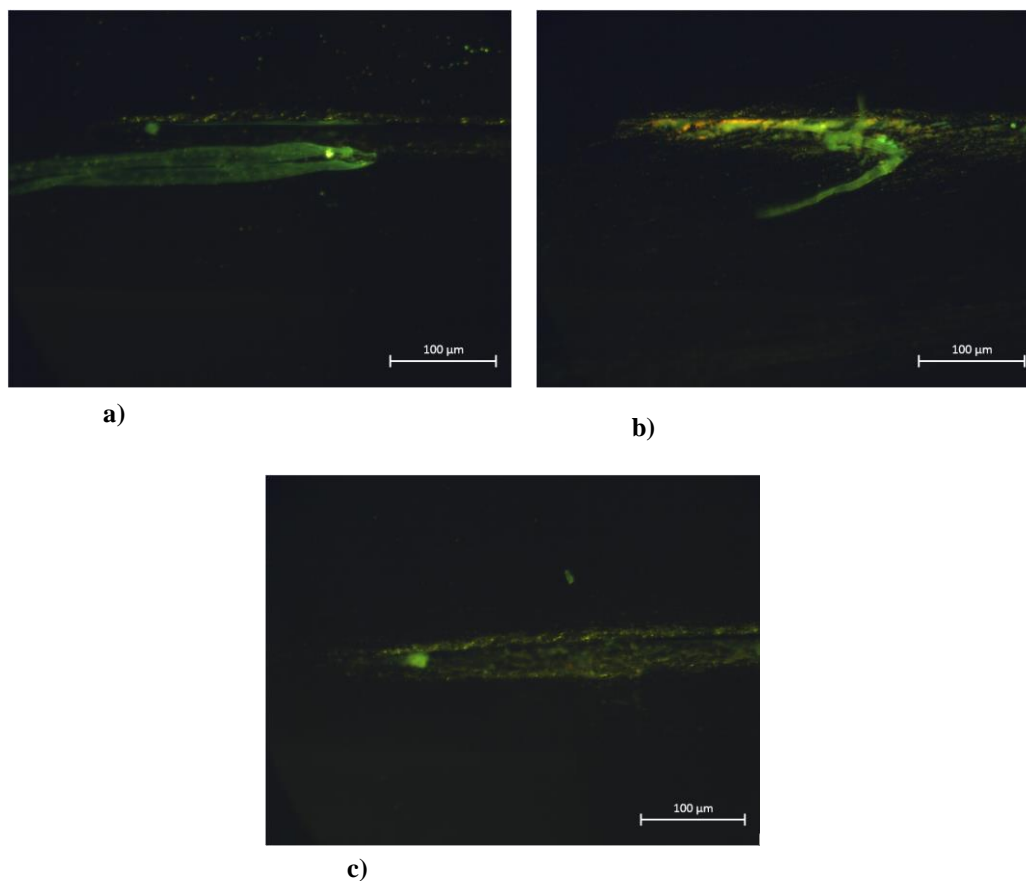


Figura 3.33 – Resultados dos ensaios após deposição de:
 a) CB negativas; b) CB neutras; c) CB positivas.

Após uma cuidada análise dos resultados, pode-se concluir que as CB com potencial neutro foram as que se apresentaram em maior quantidade no defeito, contrastando com as CB com potencial negativo, cujos resultados foram os menos favoráveis. Além disso, as CB neutras também apresentam uma maior quantidade de bactérias mortas (cor avermelhada), comparativamente com as dos outros dois ensaios. Quanto às CB com potencial positivo, estas foram capazes de detetar defeitos dentro do defeito principal, constituindo, assim, o conjunto de bactérias que apresentou os melhores resultados.

De um modo geral:

- As CB com potencial negativo, além de se apresentarem em menor quantidade no defeito, foram as que conduziram a resultados menos bons, não detetando o defeito com rigor (foram as que menos penetraram no defeito, devido à sua elevada tensão superficial que as levam a ser removidas durante a etapa de limpeza do excesso de suspensão bacteriana);
- As CB com potencial neutro apresentaram-se em grande quantidade no defeito, permitindo detetá-lo com facilidade, tendo penetrado mais do que as CB anteriores, mas menos do que as CB positivas;

- As CB com potencial positivo foram as que apresentaram os resultados mais precisos, tendo sido capazes de detetar as diferentes rugosidades presentes no defeito, uma vez que foram as que mais penetraram no mesmo. Este é um resultado credível, uma vez que quer a superfície da CB positiva, quer a superfície do provete de aço duplex são hidrofóbicas, resultando numa maior afinidade entre ambas.

3.4.14 Fe-Ni com estrutura Widmanstätten

Este provete consiste numa liga Fe-Ni com uma estrutura cristalina sob a forma de lamelas cruzadas (estrutura de Widmanstätten – Figura 3.34). Estas lamelas correspondem às fases kamacite e taenite, sendo que a variação da quantidade destas fases está relacionada com o teor de níquel – para reduzidos valores de níquel, predomina a fase kamacite em detrimento da taenite, que prevalece na situação contrária.



Figura 3.34 – Imagem representativa da estrutura Widmanstätten, onde se distingue a kamacite (lamelas cinzento escuras) da taenite (lamelas brancas).

A figura que se segue (Figura 3.35, p. 74) mostra o provete após o contraste (ataque químico: Nital 4%), onde é evidente que não foi possível obter a estrutura Widmanstätten tão desejada.

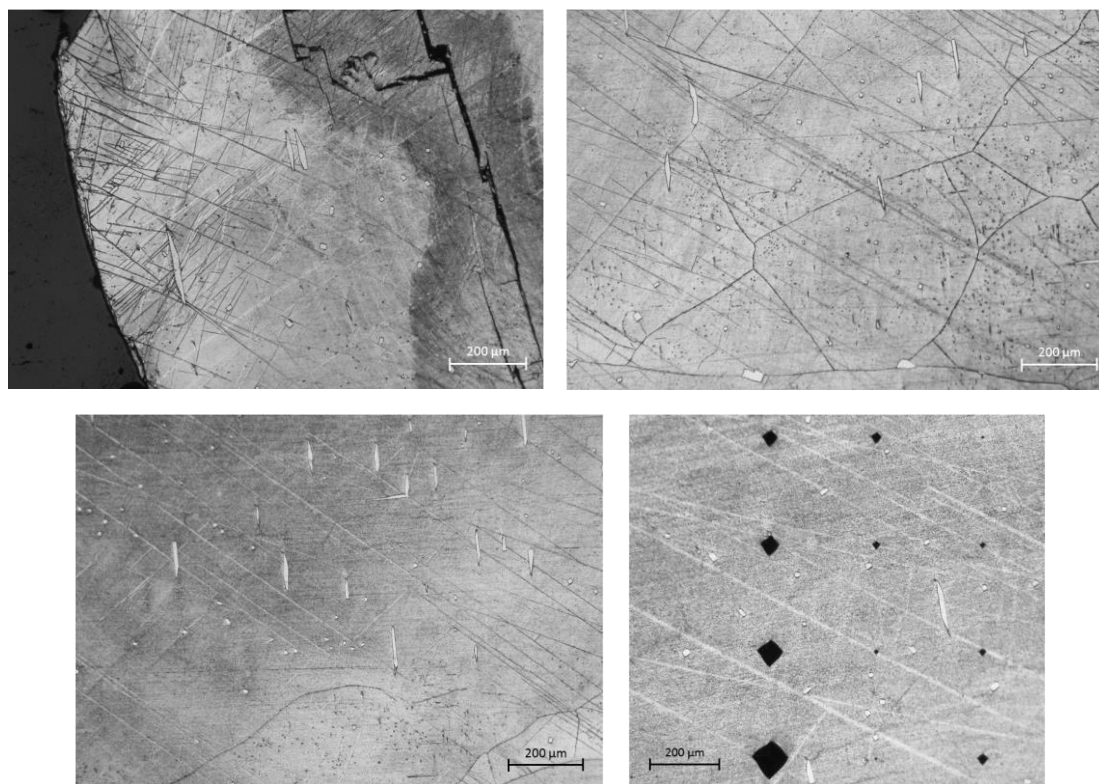


Figura 3.35 – Imagens da superfície do provete após contraste com ataque químico Nital 4%.

Apesar da estrutura Widmanstätten não ter sido obtida após o contraste, procedeu-se normalmente à aplicação de CB negativas, neutras e positivas (Figura 3.36, p. 75).

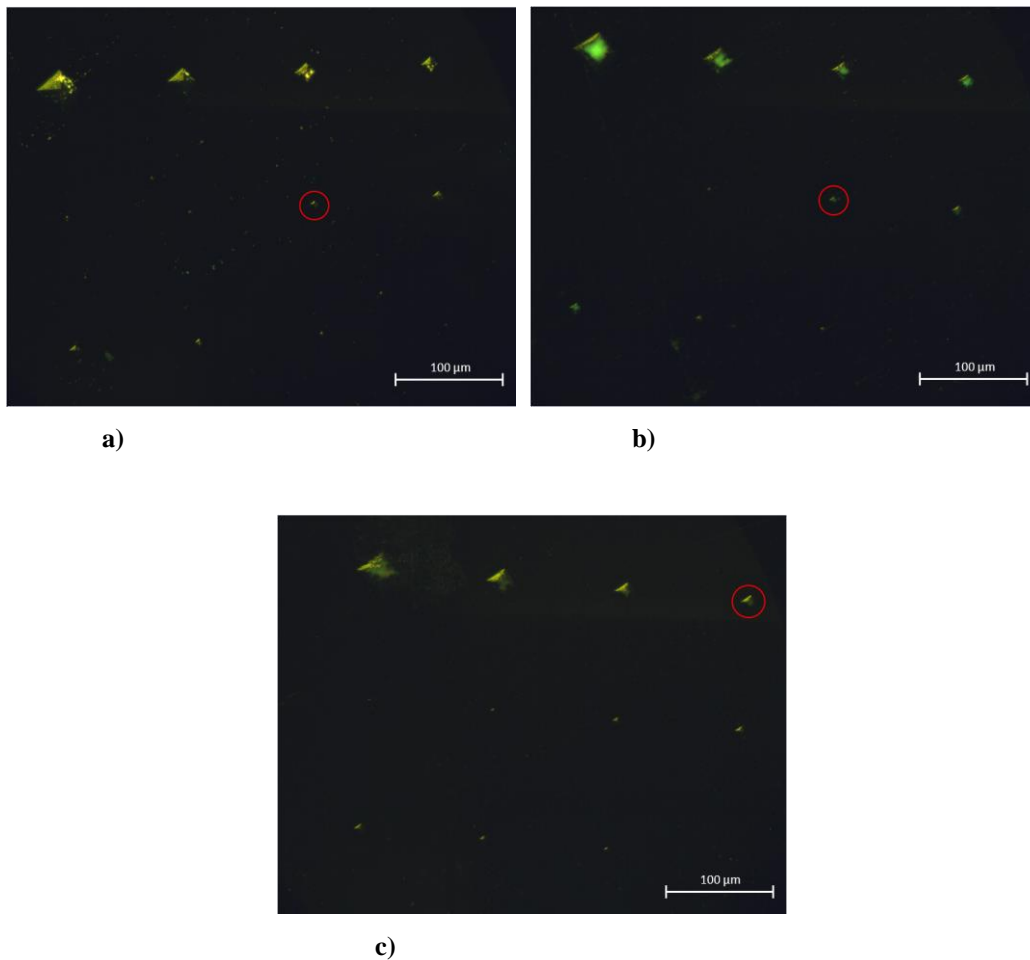


Figura 3.36 – Resultados dos ensaios com deposição de:
a) CB negativas; b) CB neutras; c) CB positivas.

Através da figura anterior (Figura 3.36), é perceptível que as CB neutras foram as que se apresentaram nos defeitos em maior quantidade, apesar de só terem identificado até ao defeito F ($L = 24,09 \mu\text{m}/P = 4,87 \mu\text{m}$). De igual forma, as CB negativas detetaram até ao mesmo defeito, apesar de terem perdido grande parte da sua fluorescência e estarem em pouca quantidade nos defeitos. Por fim, as CB positivas detetaram apenas até ao defeito D ($L = 46,58 \mu\text{m}/P = 9,41 \mu\text{m}$), e apresentaram-se em pequena quantidade nos defeitos.

Deste modo, concluiu-se que as CB negativas e neutras apenas conseguiram detetar até ao defeito F, havendo uma diferença visível entre a quantidade de ambas as CB na superfície (CB neutras estão em maior quantidade). Estes resultados estão em concordância com o esperado após analisadas as hidrofobicidades das superfícies das CB e do provete, uma vez que o provete é hidrofóbico intermédio e as CB neutras têm hidrofobicidade intermédia em reação as CB negativas e positivas.

3.4.15 Platinado

Os platinados são os contatos mecânicos (um móvel e um fixo) inseridos no corpo do distribuidor, no sistema de ignição do motor, que permitem interromper a passagem de corrente pelo circuito primário da bobina (Figura 3.37).

Apesar de serem considerados mecanismos obsoletos, uma vez vencidos pela eletrónica, foram utilizados durante muitos anos, inclusive ainda existem em automóveis mais antigos, e eram constituídos de materiais de alta qualidade, capazes de transportar entre 3 e 4 ampéres e abrir e fechar contactos 10 000 vezes por minuto, aproximadamente [43]. Contrariamente ao que o nome sugere, os platinados não possuem platina na sua constituição, sendo, na sua maioria, formados por um aço de alta qualidade coberto com uma camada de tungsténio, de forma a resistir ao desgaste provocado pela passagem de elevada corrente elétrica e pelo próprio choque entre estes contactos.



Figura 3.37 – Imagem ilustrativa dos platinados (assinalados) e da peça que os suporta.

A imagem seguinte (Figura 3.38) ilustra a matriz de defeitos a ensaiar (antes da deposição de CB), bem como uma zona onde prevaleceram os defeitos pela passagem de corrente elétrica, mesmo após o polimento. Na página seguinte (p. 77), seguem as imagens dos resultados dos ensaios com CB (Figura 3.39).

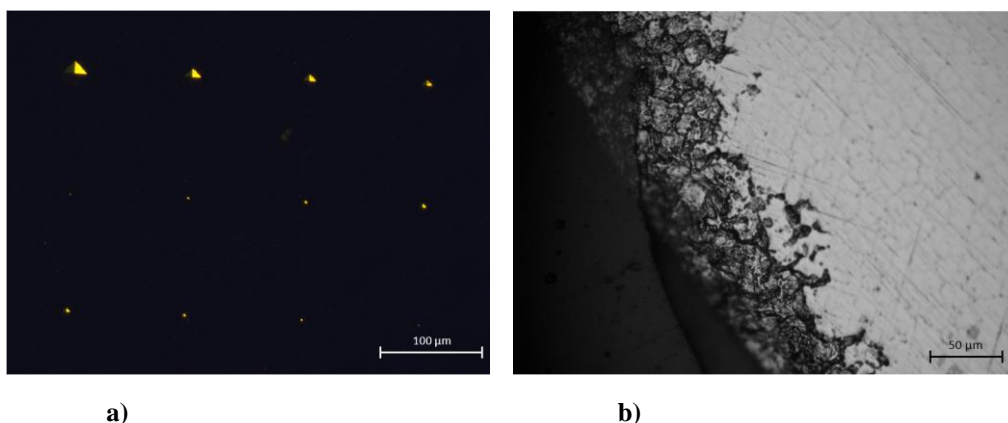


Figura 3.38 – a) Matriz de defeitos sem CB; b) Pormenor da região exterior do provete onde prevalecem os defeitos devido à passagem de elevada corrente elétrica.

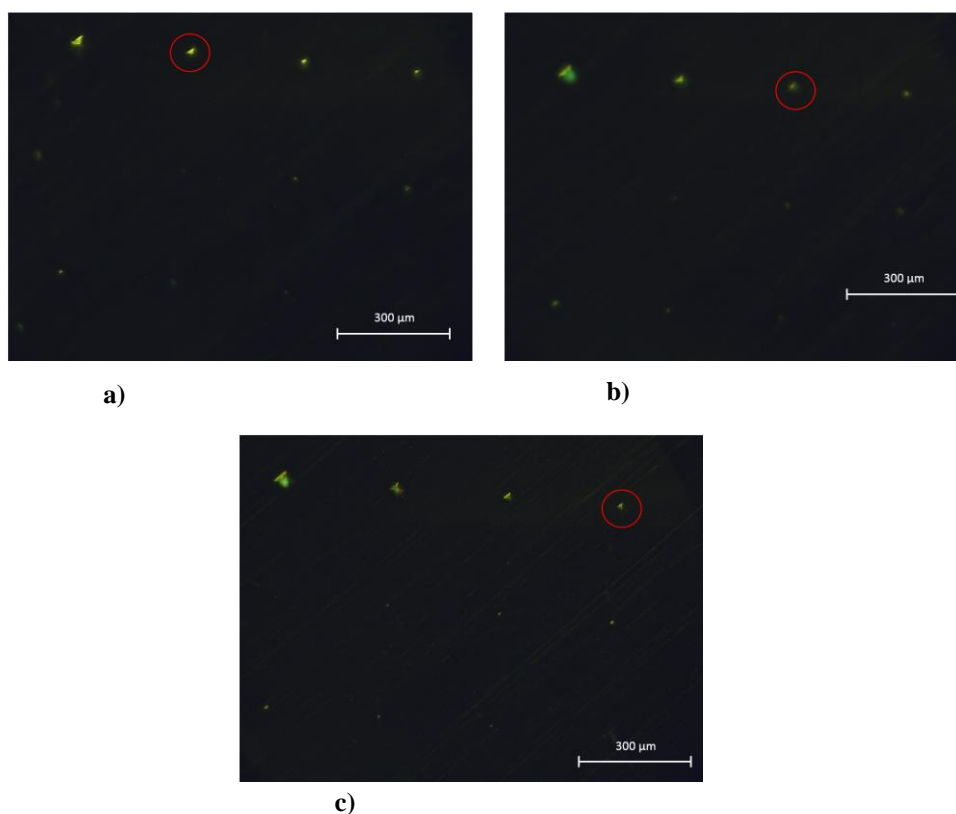


Figura 3.39 – Resultados dos ensaios após deposição de: a) CB negativas; b) CB neutras; c) CB positivas.

Analisadas as imagens referentes à aplicação de CB, é perceptível que, com este material, os resultados não foram tão bons como nos provetes anteriores, independentemente do potencial zeta das bactérias. No caso das CB negativas, estas conseguiram apenas detetar até ao segundo maior defeito, B ($L = 45,74 \mu\text{m}/P = 9,24 \mu\text{m}$), no qual estão em reduzida quantidade. Quanto às CB com potencial neutro, os resultados foram melhores, uma vez que detetaram até ao defeito seguinte, C ($L = 35,06 \mu\text{m}/P = 7,08 \mu\text{m}$) e estão em maior quantidade nos mesmos. Finalmente, as CB positivas, apesar de se apresentarem em menor quantidade que as neutras, conseguiram penetrar até ao defeito D ($L = 28,83 \mu\text{m}/P = 5,82 \mu\text{m}$), constituindo, assim, os melhores resultados dos ensaios para material, o que seria de esperar, dado o facto deste material ter uma superfície intermédia hidrofóbica e as CB positivas serem igualmente hidrofóbicas.

3.4.16 Provetes com revestimentos da indústria aeronáutica

Tal como foi apresentado no capítulo anterior, atualmente têm-se desenvolvido alternativas de forma a substituir os revestimentos cromados e anodizados na indústria aeronáutica. Neste ramo, a OGMA – Indústria Aeronáutica de Portugal, S.A. apostou em aplicar revestimentos depositados por *plasma* e *flame spray* na maioria dos componentes que são fabricados. Algumas características desses provetes com revestimentos seguem na próxima Tabela 3.11.

Tabela 3.11 – Características dos revestimentos dos provetes fornecidos pela OGMA – Indústria Aeronáutica de Portugal, S.A.

Cor do revestimento	Material base	Material do revestimento	Tipo de deposição
Cinza escuro	Aço Inox	NiCr4Al21Bentonite + Bond layer Ni-4%Al	Flame Spray
Cinza	Liga de Alumínio	Al9Si6NB20Polyester + Bond Layer Ni-5%Al	Plasma Spray
Dourado	Aço Inox	Cu9AlFe + Bond Layer Molibdénio (99%)	Flame Spray
Branco	Aço Inox	98% Al ₂ O ₃ + Bond Layer Ni-5%Al	Plasma Spray

Apesar de se tratarem de revestimentos porosos (tipo de materiais nos quais o sucesso da técnica é limitado), os ensaios com deposição de CB com potenciais negativo, neutro e positivo procederam-se de igual forma, seguindo nas imagens seguintes os resultados dos mesmos (Figura 3.40-Figura 3.43).

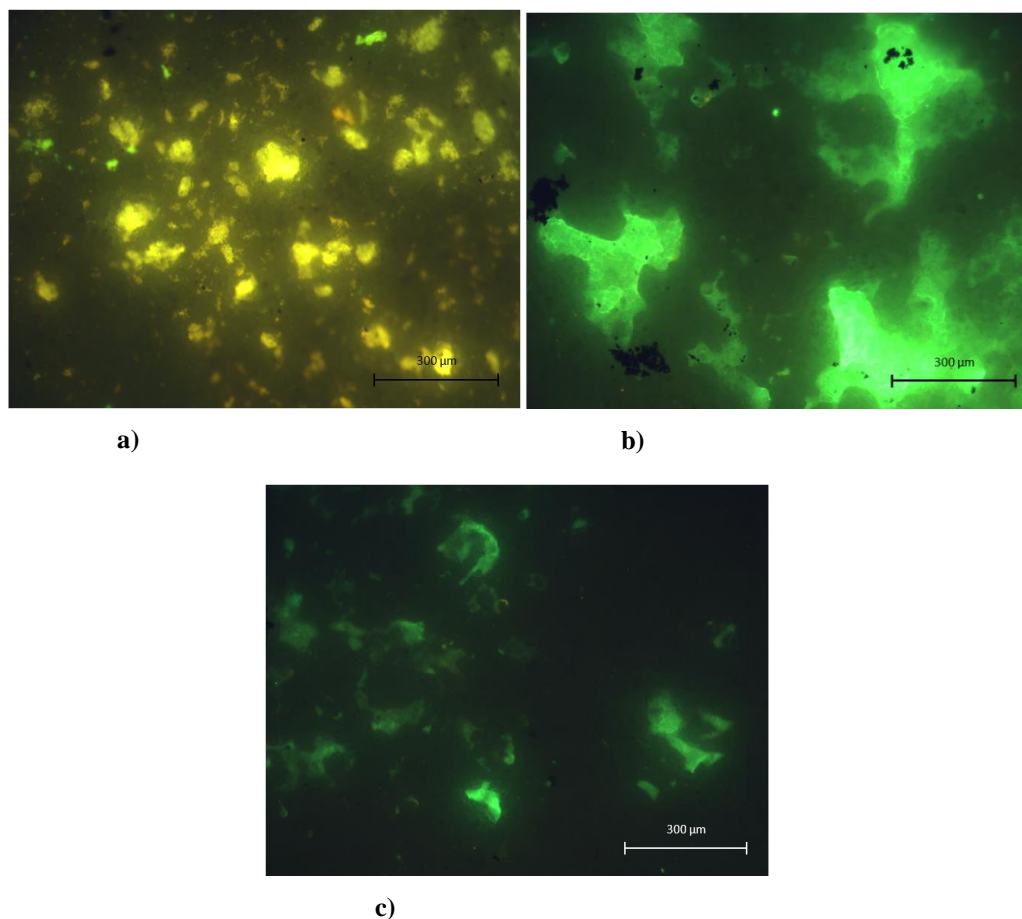


Figura 3.40 – Resultados dos ensaios com o provete **Branco** com deposição de: a) CB negativas; b) CB neutras; c) CB positivas.

Na figura Figura 3.40a é possível ver que as CB negativas detetaram as porosidades do revestimento Branco num plano mais próximo, proximidade esta que é explicada através da sua menor hidrofobicidade e é consequência do seu crescimento num meio de cultura com fontes de carbono em cadeias curtas [44].

Na Figura 3.40b, com CB neutras, uma vez que estas são mais hidrofóbicas que as negativas, conseguiram penetrar mais nos poros do material. Além disso, graças ao seu meio de cultura com maior teor em átomos de carbono do que o meio de crescimento das CB negativas, durante o seu crescimento foram formados *clusters* que têm tamanho proporcional ao comprimento da cadeia de carbonos [44]. Consequentemente, estes *clusters* das CB neutras serão menores do que os das CB positivas. O fenómeno poderá, então, influenciar o processo de adesão, uma vez que a formação destes aglomerados facilita a sua deposição na superfície a ensaiar, podendo trazer benefícios para a adesão. Por estas razões, os resultados para ambas as CB neutras e positivas (Figura 3.40b,c) correspondem à sua deposição em planos gradualmente mais profundos, nos quais estas se dispõem em forma de aglomerados, ao contrário das CB negativas, que estão simplesmente dispersas.

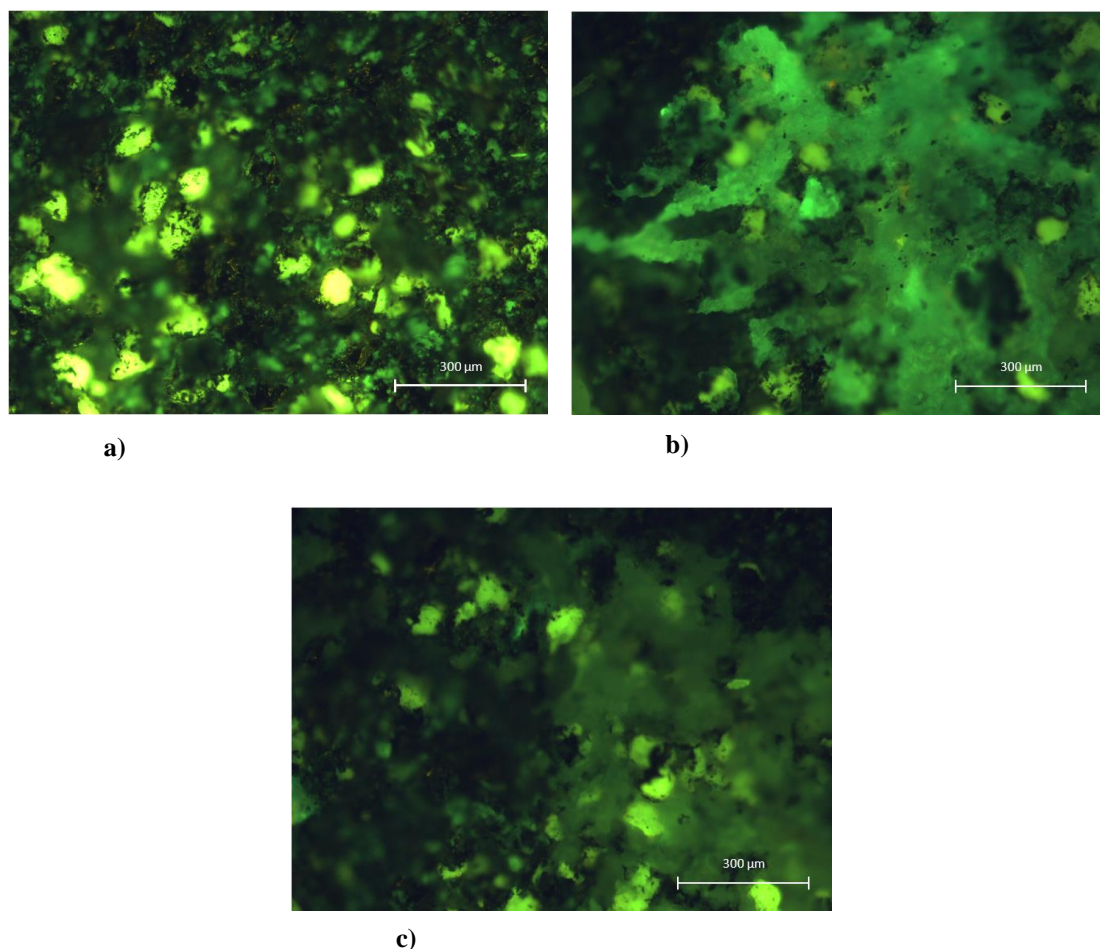


Figura 3.41 – Resultados dos ensaios com o provete **Cinza** com deposição de:
a) CB negativas; b) CB neutras; c) CB positivas.

Durante a preparação deste ensaio, enfrentaram-se algumas dificuldades na deposição das CB negativas, dada à sua característica hidrofílica que estava a impedir a aderência das CB à superfície (realmente na imagem Figura 3.41a, as porosidades detetadas estão num plano bastante superficial).

A diferença no crescimento das CB com potenciais neutro e positivo em relação às negativas é bastante visível pelo modo como estas se depositam nos poros do revestimento (Figura 3.41b e Figura 3.41c). Uma vez que crescem em densos *clusters*, quando depositadas na superfície, tenderão a manter-se mais unidas do que as CB negativas. Pelas imagens, entende-se também, que as CB positivas foram as que mais penetraram na porosidade do revestimento, já que as suas imagens foram captadas num plano mais longe, em comparação com as restantes. Esta maior penetração está relacionada com a maior hidrofobicidade da CB positiva, em relação às restantes, e à sua menor tensão superficial (~ 37 mN/m) [44], que está diretamente relacionada com a sua capacidade em penetrar nos poros e que tende a diminuir com o aumento do número de carbonos nas cadeias presentes no meio de cultivo.

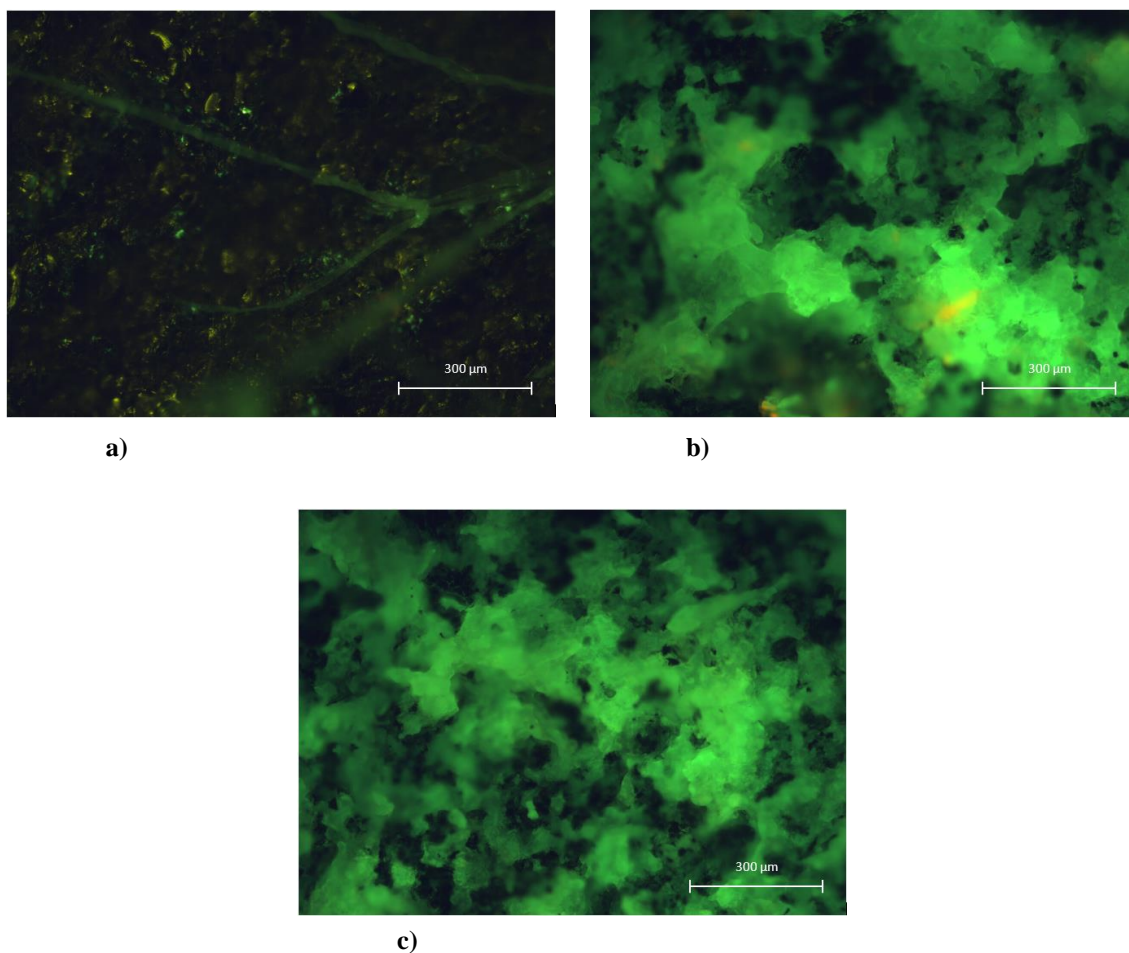


Figura 3.42 – Resultados dos ensaios com o provete **Dourado** com deposição de:
a) CB negativas; b) CB neutras; c) CB positivas.

À semelhança dos provetes anteriores, também para este as CB negativas voltaram a penetrar muito menos nos poros, sendo que grande parte da suspensão bacteriana foi retirada durante a etapa de remoção do excesso. Contrariamente aos anteriores provetes, também para este as CB neutras e positivas não penetraram muito nos poros, fazendo, então, um levantamento topográfico da superfície do revestimento. Dada a grande quantidade de bactérias positivas e neutras que aderiram à superfície do revestimento, a topografia por elas revelada assemelha-se a uma imagem a três dimensões (3D)..

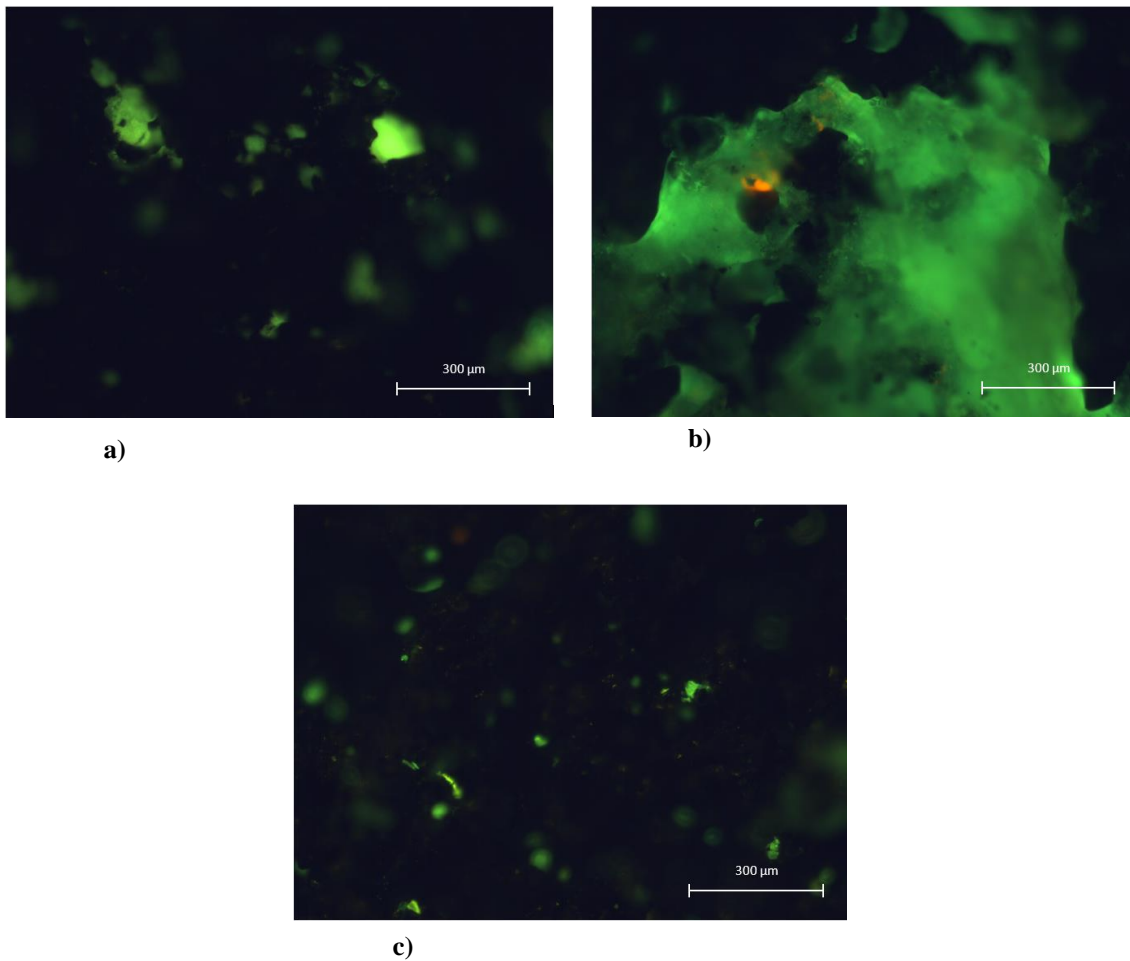


Figura 3.43 – Resultados dos ensaios com o provete **Cinza Escuro** com deposição de:
a) CB negativas; b) CB neutras; c) CB positivas.

Analogamente aos provetes anteriores, as CB negativas voltaram a exibir pouca penetração nos poros do revestimento, assim como as CB neutras fizeram novamente um levantamento topográfico do material, tendo em conta a elevada quantidade de bactérias no provete (Figura 3.43b).

Relativamente aos resultados obtidos com CB positivas, estas apresentaram-se em menor quantidade no provete, porém conseguiram penetrar até poros que estavam em planos mais profundos.

3.4.17 PLA

O PLA, sigla para o Ácido Polilácteo, é um polímero com propriedades semelhantes aos do tereftalato de polietileno (PET) mas que também é biodegradável especialmente, em água e dióxido de carbono.

Foi produzido um provete com dimensões de 10x10 mm por impressão 3D, cuja superfície está representada na Figura 3.44. Os defeitos existentes correspondem a matrizes convencionais de indentações, ainda que, devido às propriedades do material, não sejam perceptíveis.

Além disso, o facto do material fluorescer com um comprimento de onda semelhante ao das bactérias, dificultou a deteção das mesmas.

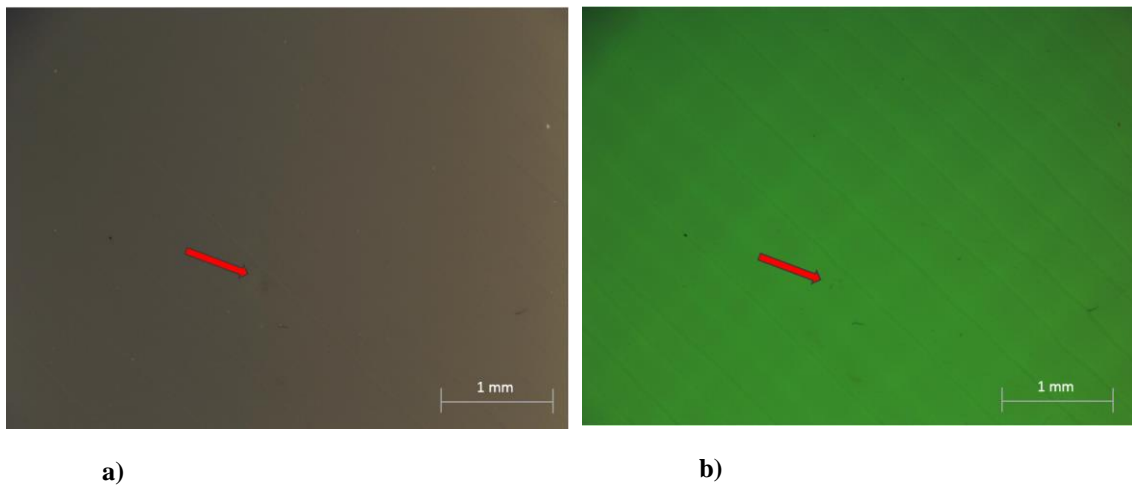


Figura 3.44 – Superfície do PLA antes da deposição de CB: a) com luz visível; b) com luz fluorescente.

As próximas figuras ilustram os resultados dos ensaios com deposição de CB com potenciais negativo e positivo.

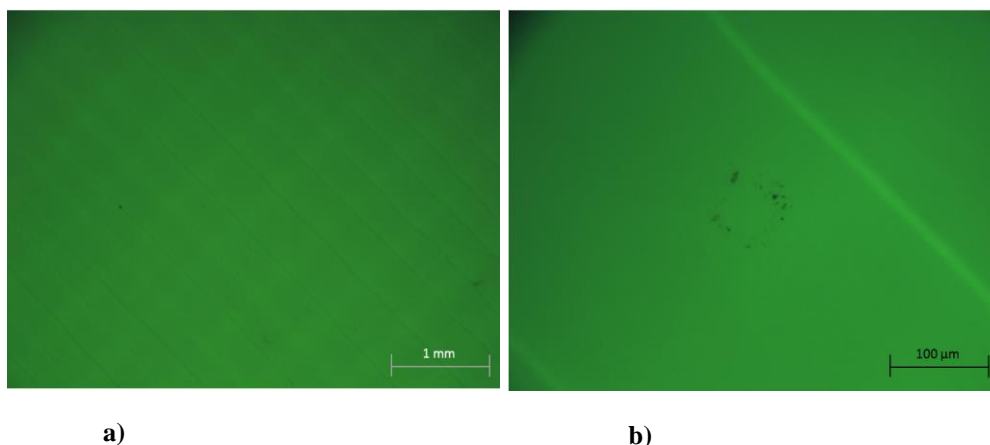


Figura 3.45 – Resultados dos ensaios após deposição de CB com potencial negativo: a) superfície sem quaisquer CB; b) pormenor de um defeito sem CB.

Pelas imagens, é perceptível que uma das principais dificuldades, durante o ensaio, foi a identificação das CB negativas, uma vez que o material fluoresce próximo do comprimento de onda das bactérias. A Figura 3.45b apresenta o pormenor de um defeito contornado por alguma sujidade e não por CB.

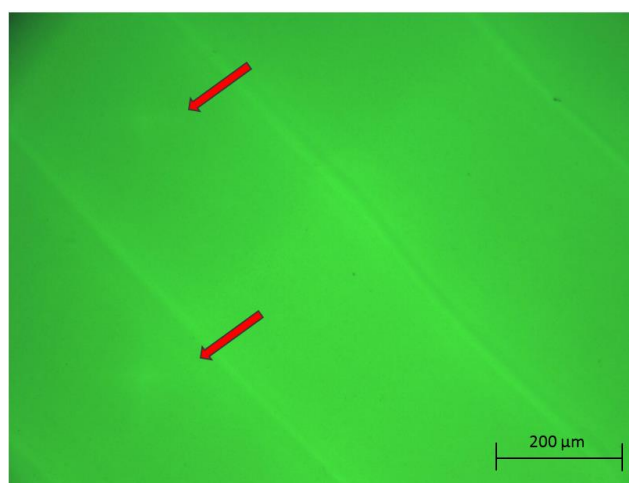


Figura 3.46 – Resultados do ensaio após deposição de CB positivas, onde são perceptíveis dois defeitos sem CB.

Após a deposição e remoção das CB com potencial positivo (Figura 3.46), não se verificou a sua presença nos defeitos ou na própria superfície do material, concluindo, assim, que toda a suspensão foi removida durante a etapa da remoção.

A fim de confirmar se realmente as CB não aderiam à superfície e teriam sido removidas da superfície durante a limpeza, a superfície do material foi fotografada antes e depois desta etapa e apresentada na página seguinte (Figura 3.47, p. 85).

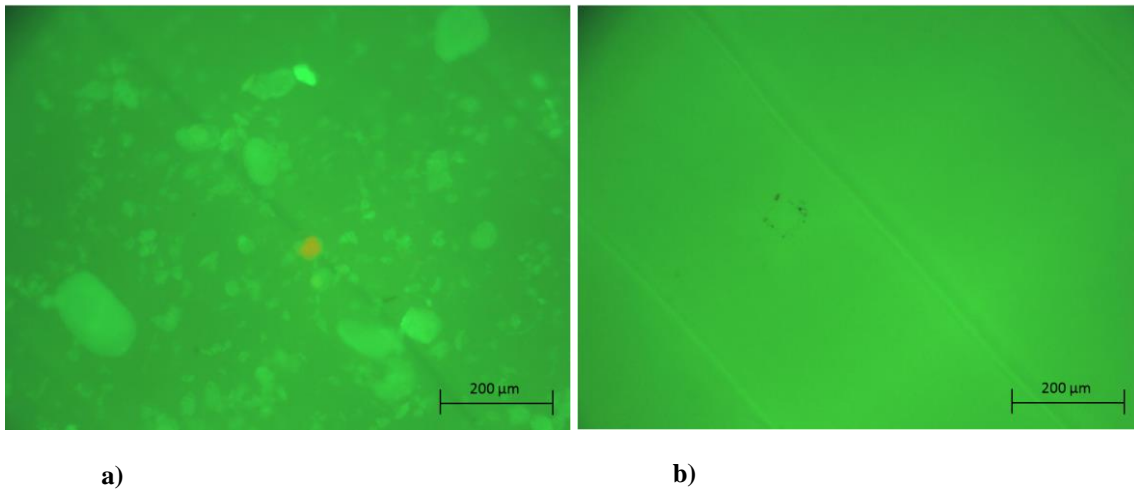


Figura 3.47 – a) Fotografia à superfície do material antes da remoção do excesso de suspensão bacteriana; b) Superfície do material após a etapa de remoção do excesso.

Após uma análise da Figura 3.47, é perceptível que a suspensão bacteriana, presente na Figura 3.47a foi totalmente eliminada durante a limpeza da superfície (Figura 3.47b). Constatase a não aderência da suspensão bacteriana à superfície, graças às suas características hidrofóbicas e elevada rigidez, resultando numa matriz com defeitos pouco perceptíveis.

3.4.18 CD e DVD

O processo de gravação de um CD, ou DVD, passa pelo registo dos bits na sua camada de alumínio através de um feixe Laser, sendo que as indentações deixadas nessa camada do CD/DVD correspondem à informação armazenada. A Figura 3.48 ilustra o aspeto e as principais dimensões das indentações a Laser, em diferentes dispositivos.

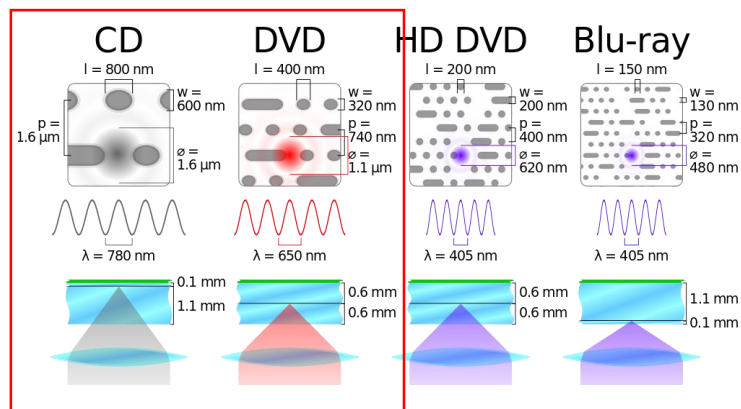


Figura 3.48 – Imagem esquemática, ilustrando as diferenças entre as indentações do Laser em diferentes dispositivos, com destaque para o CD e DVD, uma vez que foram os provetes ensaiados.

Deste modo, a fim de verificar a capacidade das CB na caracterização de superfícies, foram preparados provetes a partir da película de alumínio de um CD e um DVD, uma vez que as indentações, em ambos os casos, são da ordem de grandeza das bactérias. As superfícies de alumínio do CD e do DVD foram retiradas com auxílio de fita cola e, seguidamente, foram cobertas com CB. As imagens referentes a estes ensaios seguem na figura seguinte (Figura 3.49).

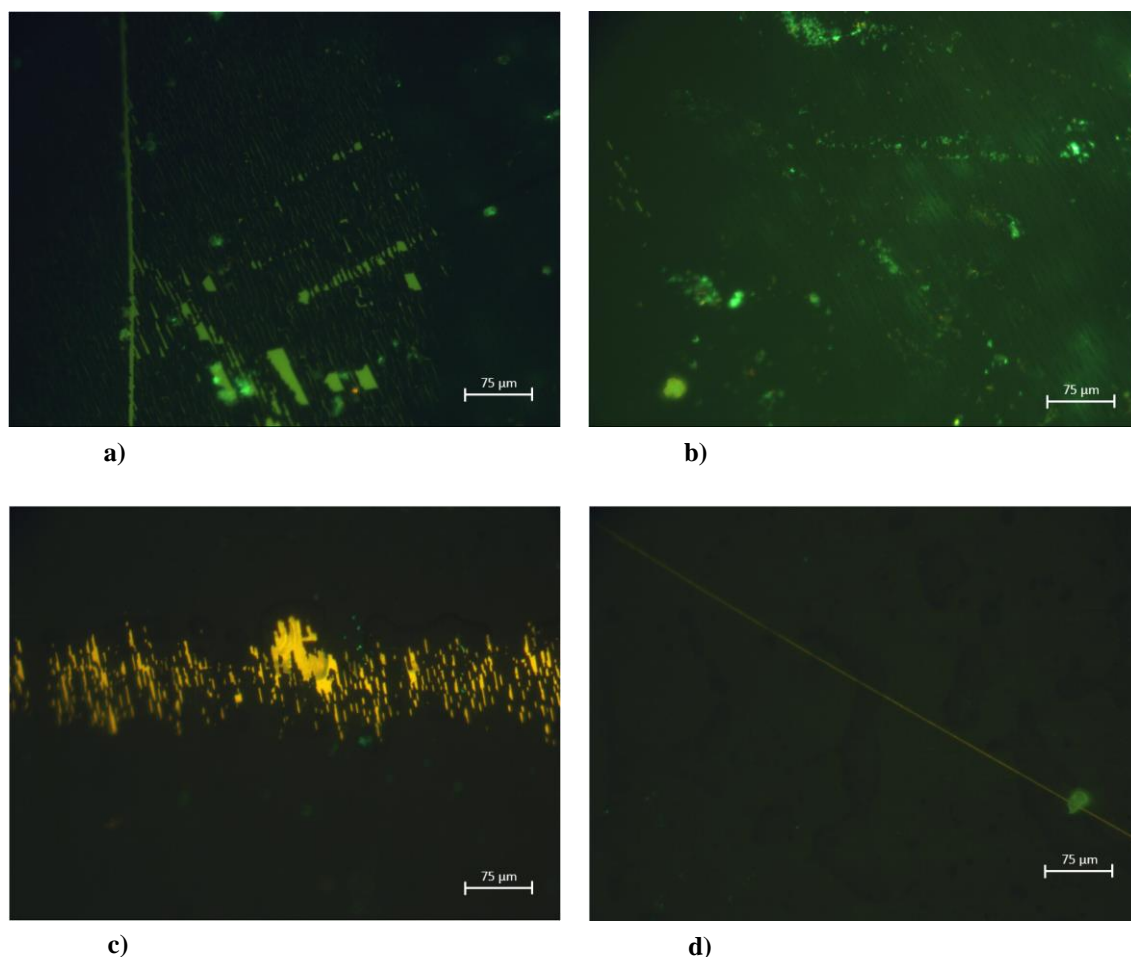


Figura 3.49 – Resultados dos ensaios com deposição de: a),b),c) CB negativas; d) CB positivas.

Analisadas as imagens dos ensaios, tornou-se claro que o objetivo não havia sido alcançado. Nem as CB positivas, nem as CB negativas, que não aderiram à superfície de ensaio, conseguiram detetar as pequenas indentações a Laser. Este insucesso dos ensaios pode ter sido devido à fita cola utilizada, uma vez que se constatou que esta estava a marcar a fina película de alumínio com a própria rugosidade do material de que era feita.

Deste modo, a fim de se averiguar se os resultados inconclusivos destes ensaios se tinham devido, ou não, ao tipo de fita cola usado, para retirar a camada de alumínio do DVD optou-se por descolar o próprio dispositivo, não havendo defeitos induzidos por agentes externos. Para este material, foram apenas depositadas CB negativas (Figura 3.50, p. 87).

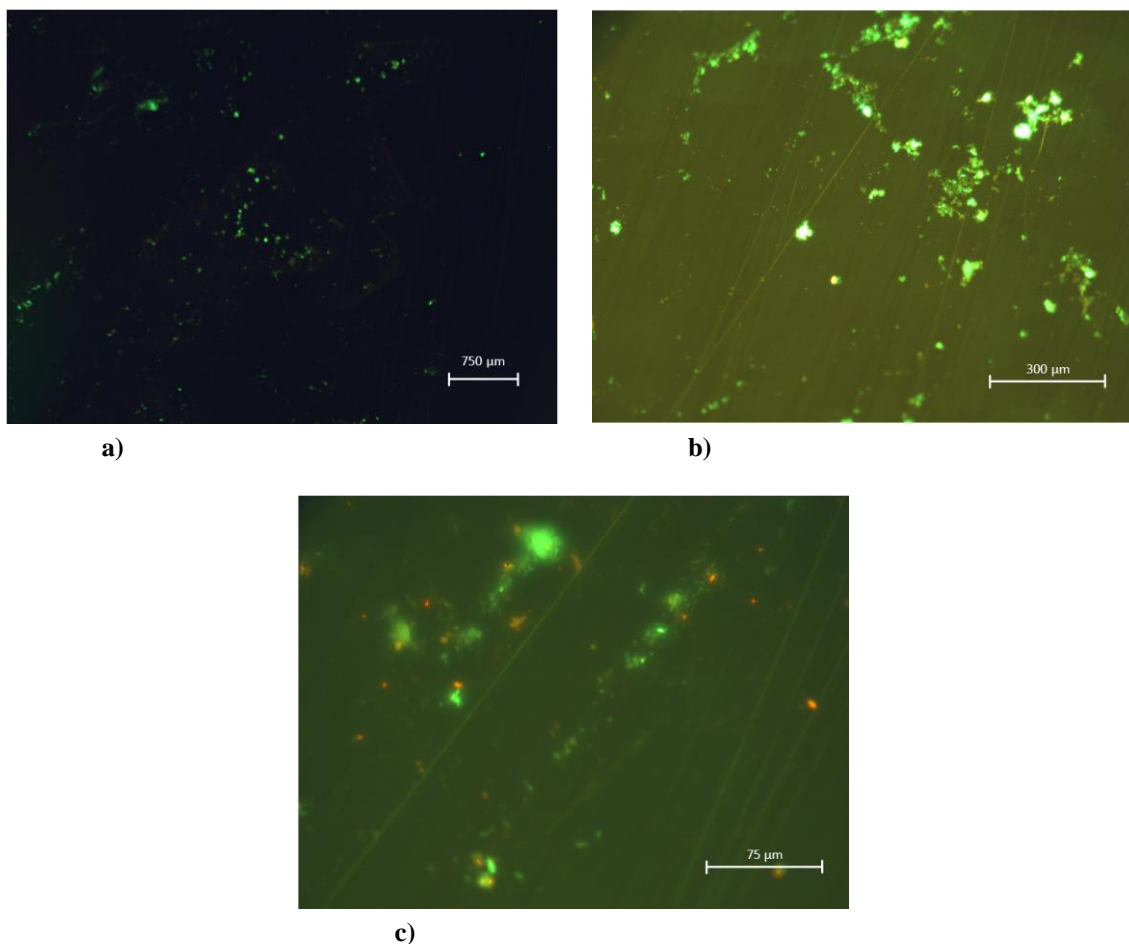


Figura 3.50 – Resultados da aplicação de CB negativas (sem remoção do excesso de suspensão) na superfície de alumínio de um DVD.

Também os ensaios com a camada de alumínio do DVD evidenciaram resultados semelhantes aos anteriores não tendo sido detetado qualquer padrão da topografia gerada pelo Laser.

Deste modo, concluiu-se que a técnica de END em estudo não foi eficaz na tarefa do mapeamento da superfície do CD e DVD e deteção das pequenas indentações criadas a Laser. Apesar dos resultados dos ensaios parecerem evidenciar a possível incapacidade das CB em detetar defeitos de tamanho tão reduzido, não foram feitos ensaios suficientes.

4. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE EQUIPAMENTO CUSTOMIZADO

4.1 Introdução

Neste capítulo apresenta-se o equipamento customizado construído no Núcleo de Tecnologia Industrial do DEMI, FCT-UNL, que pretende impulsionar o processo de industrialização da técnica, através de uma abordagem mais simples e compacta da etapa de inspeção dos provetes.

4.2 Conceção do Equipamento Customizado

A dependência existente entre a realização dos ensaios com CB e a disponibilidade dos laboratórios do iBB (IST) impulsionou significativamente a necessidade de autonomização e industrialização da técnica. Deste modo, no Núcleo de Tecnologia Industrial (NTI) da FCT-UNL, foi criado um equipamento customizado de forma a facilitar a etapa da inspeção dos provetes ensaiados. Pretende-se que o equipamento substitua o microscópio de fluorescência, à semelhança do que é utilizado nos laboratórios iBB (Olympus CX40, ilustrado na Figura 4.1), que não permite atuar prontamente no local onde seja necessário inspecionar uma amostra. Deste modo, na Tabela 4.1 são apresentados diversos requisitos funcionais que o equipamento de inspeção customizado deverá apresentar.



Figura 4.1 – Imagem ilustrativa do microscópio Olympus CX40 utilizado nos ensaios com CB, no iBB (IST).

Tabela 4.1 – Requisitos funcionais do equipamento dedicado à inspeção visual.

	Requisitos	Comentários
1	Capacidade de ampliação .	Deverá ser garantida ampliação suficiente para a matriz convencional de defeitos (4x3) ser totalmente abrangida na imagem.
2	Luz incidente com comprimento de onda suficiente para excitar as CB .	Para emitirem fluorescência, as bactérias necessitam de excitação com um comprimento de onda entre os 450-480 nm.
3	Visualização da fluorescência das CB .	A fluorescência das bactérias corresponde a um comprimento de onda da ordem dos 515 nm.
4	Portabilidade e baixo custo do equipamento.	Para aumentar as potencialidades da técnica à escala industrial, as dimensões e peso do equipamento, bem como o custo associado devem ser reduzidos.

O equipamento customizado desenvolvido é constituído pelo microscópio digital via USB (Mighty Scope 5M da Aven Tools, ilustrado na Figura 4.2), sustentado por um suporte xyz, de forma a ser possível controlar a posição e a focagem do provete.

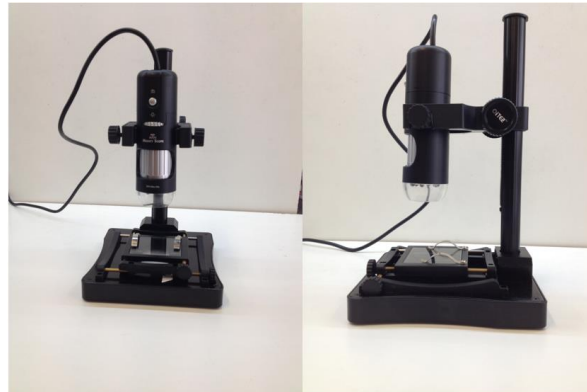


Figura 4.2 – Mighty Scope 5M da Aven Tools sustentado pelo suporte xyz.

O esquema que se segue (Figura 4.3) pretende comparar o poder de ampliação deste microscópio da Aven Tools e o convencional microscópio da Olympus.

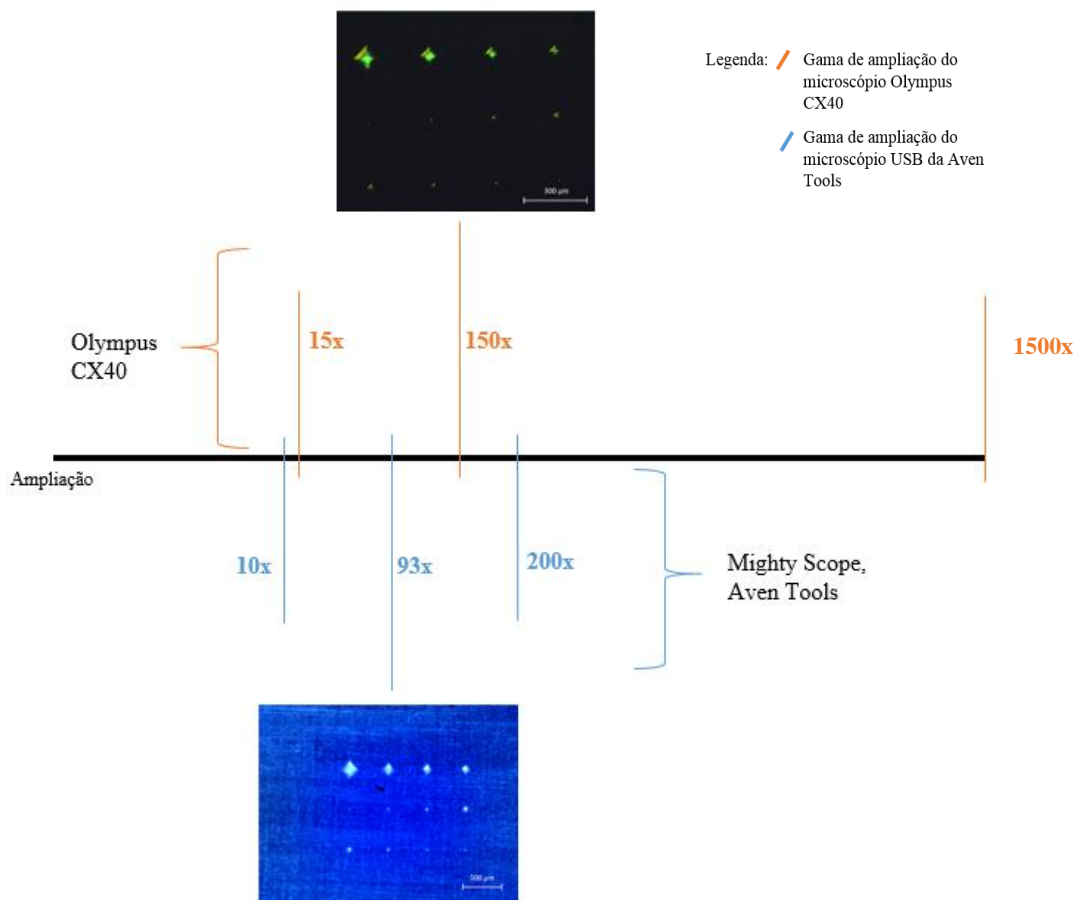
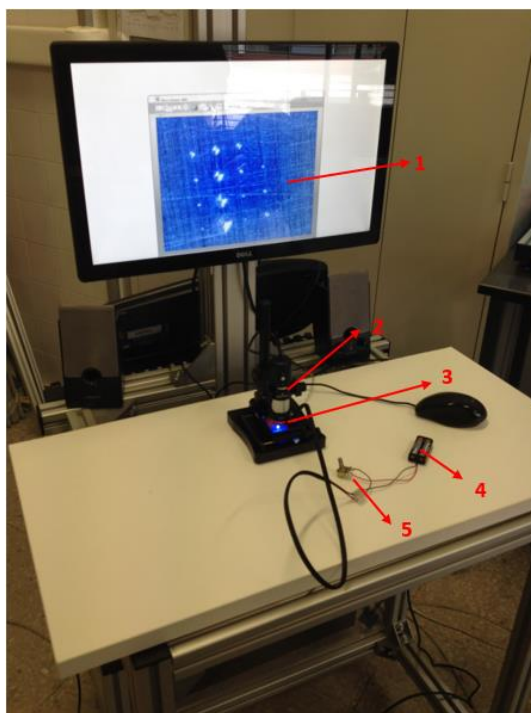


Figura 4.3 – Comparação entre a gama de ampliações do microscópio Olympus CX40 (iBB) e do Mighty Scope, da Aven Tools (NTI).

De forma a garantir a excitação das CB, foram incorporados LEDs, fabricados pela TT Electronics e Optek Technology, numa coroa produzida no laboratório por impressão 3D. Estes LEDs emitem luz azul com o comprimento de onda entre de cerca de 450 nm, cuja intensidade é controlada por um potenciómetro, que utiliza duas pilhas AAA como fonte de tensão. Toda esta montagem e conceção de equipamento auxiliar ao microscópio USB foi realizada no NTI, sendo ilustrado o conjunto (equipamento) na seguinte Figura 4.4.



Legenda:

- (1) *Software* próprio do microscópio;
- (2) Microscópio sustentado pelo suporte xyz;
- (3) Coroa de LEDs encaixada no microscópio;
- (4) Pilhas AAA como fonte de tensão;
- (5) Potenciómetro.

Figura 4.4 – Montagem final do equipamento customizado.

Por fim, de forma a cumprir com todos os requisitos funcionais propostos, é necessário ser incorporado um mecanismo de filtração da radiação recebida pelo microscópio que permita visualizar apenas o comprimento de onda emitido pelas CB (~ 515 nm). Neste seguimento, foram encontradas algumas soluções para combater esta limitação.

Sabendo que o CCD (Dispositivo de Carga Acoplada) incorporado no microscópio já possui filtros de barreiras (emissão), a solução mais económica passa pela aquisição e incorporação de filtros polarizadores no microscópio do equipamento customizado. Estes filtros polarizadores têm como função permitir apenas a passagem e visualização de luz polarizada (Figura 4.5, p. 93), absorvendo (impedindo a visualização) de luz não polarizada ou polarizada noutras direções desalinhas com o plano deste filtro [45,46]. Os filtros adquiridos correspondem às lentes polarizadas linearmente (Figura 4.6, p. 93) dos dispositivos oculares utilizados para assistir a filmes em 3D.

Colmatado o problema, este equipamento constitui uma alternativa prática e económica para a substituição do convencional “microscópio de laboratório”, uma vez que é facilmente transportável, garante ampliação suficiente para ser visualizada uma matriz de defeitos convencional, a qualidade e nitidez da imagem são bastante satisfatórias e, após adaptações, é capaz de excitar CB e receber o comprimento de onda emitido pelas mesmas, de forma a serem corretamente detetados os defeitos superficiais.

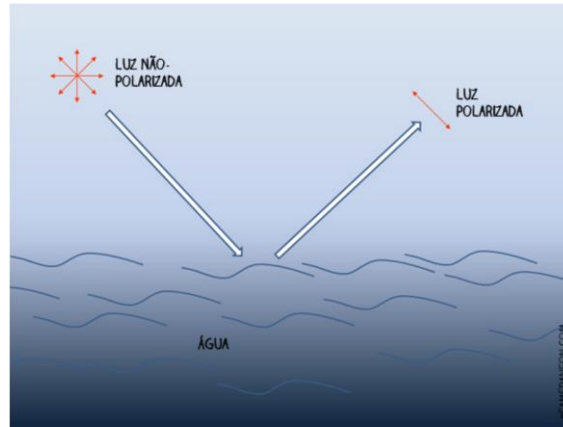


Figura 4.5 – Representação esquemática da polarização natural da luz incidente numa superfície [45].

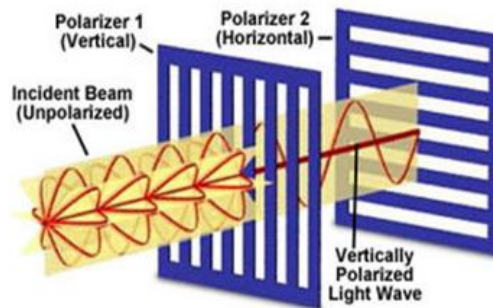


Figura 4.6 – Representação esquemática do processo de seleção das lentes polarizadas linearmente [46]

5. CONCLUSÕES E PROPOSTAS DE DESENVOLVIMENTOS FUTUROS

5.1 Introdução

São apresentadas, neste capítulo, as conclusões referentes aos ensaios realizados, sendo que, ao longo de todo o trabalho, estas também foram incluídas em comentários e nas análises específicas dos ensaios, pretendendo-se apenas consolidar as conclusões mais abrangentes.

Relativamente às propostas para desenvolvimentos futuros, são apontados alguns tópicos importantes para o progresso da técnica e feitas sugestões que se consideram ser relevantes para a técnica de END com CB.

5.2 Conclusões

No âmbito dos ensaios experimentais com a técnica END com CB, na Tabela 5.1 são sintetizados os seus resultados.

Tabela 5.1– Resultados dos ensaios experimentais com CB.

Material	Bactéria		Limiar de Detetabilidade L [μm]/P [μm]
	<i>Rhodococcus erythropolis</i> (-), (0) ou (+)		
AA 1100	-		8,42 / 1,70
AISI 316L	-		11,1 / 2,30
Nióbio (não polido)	+		33,53 / 6,77
Nióbio (polido até P2500)	+		20,77 / 4,20
Nióbio (polido com OPS)	+		35,79 / 7,23
CuAlMn 0°	M	+	9,16 / 1,85
	P		51,45 / 10,39
CuAlMn 45°	M	+	19,36 / 3,91
	P		31,99 / 6,46
CuAlMn 90°	M	+	30,44 / 6,15
	P		17,06 / 3,45
Moeda 1€	Núcleo	+	19,66 / 3,97
	Coroa		40,02 / 8,08
Moeda 0,10€	+		19,93 / 4,03
Moeda 0,02€	Aço	+	28,11 / 5,68
	Cobre	-	25,58 / 5,17
Junta	Al	+	17,63 / 3,56
Bimetálica	Mg		22,22 / 4,49
Fe-Ni	0		24,09 / 4,87
Platinado	+		28,83 / 5,82

De um modo geral, para todos os materiais testados foram detetados os seus defeitos presentes, excetuando no caso da junta bimetálica Cu/Mg, ferro fundido, os revestimentos fornecidos aeronáuticos cedidos pela OGMA e o PLA:

- **Junta Cu/Mg:** as CB não aderiram à superfície do cobre em nenhuma das situações, podendo indicar um efeito antibacteriano devido à libertação de iões entre os dois materiais, resultado de terem potenciais eletroquímicos opostos. Além disso, adicionando a ação das CB e a sua natureza bastante reativa já comprovada no trabalho de Patrick Inácio [4], a superfície do magnésio ficou completamente corroída, não permitindo analisar resultados. Apenas se pode concluir que o magnésio foi o material onde, preferencialmente, as CB se detetaram, em detrimento do cobre.

- **Ferro fundido:** devido à biocorrosão verificada neste material, e à semelhança da junta bimetalica anterior, não foi possível determinar o limite de detetabilidade. No entanto, para o ensaio com CB negativas, parece existir uma preferência pelas matrizes de ferrite que circundam a grafite vermicular, evidenciando a influência do fator da heterogeneidade química.
- **Revestimentos aeronáuticos:** devido à sua elevada porosidade e sendo essa uma das limitações da técnica, conclui-se que esta não é aplicável aos provetes de revestimentos, apesar das CB neutras e positivas terem feito um mapeamento destas porosidades.
- **PLA:** para o provete deste material, as CB não conseguiram fixar-se aos defeitos, devido às suas características hidrofóbicas. Além disso, uma vez que refletia a luz incidente num comprimento de onda próximo do das CB, a análise de resultados foi bastante limitada.

As CB permitiram detetar diferentes tipos de defeito, além dos defeitos padrão, tais como diferentes riscos presentes na amostra de aço duplex ou defeitos característicos da superfície da pirite.

Para os provetes de Nióbio com diferentes rugosidades superficiais, verificou-se que a uma maior rugosidade estava associada uma maior quantidade de CB, principalmente com potencial positivo, depositadas no provete (maioritariamente na superfície e nem tanto nos defeitos). Isto parece comprovar a sua capacidade de caracterizar as superfícies dos materiais. No entanto, para os ensaios nas películas de alumínio do CD e DVD não foi possível identificar os padrões característicos do Laser que resultam da gravação. Este resultado pode dever-se ao facto das indentações no DVD serem demasiado pequenas, em comparação com as dimensões convencionais da CB utilizada (0,92 μm).

O principal objetivo do ensaio do NiTi foi averiguar a influência da variação de fases cristalográficas no mesmo material. Com efeito, após a aplicação de CB positivas neste provete, estas pareceram evidenciar um padrão ao longo do mesmo, aumentando a sua concentração nos defeitos e a sua fluorescência. Uma vez que o NiTi reúne características hidrofílicas, esperavam-se melhores resultados para as CB negativas (também mais hidrofílicas que as restantes), diferenças estas que poderão estar relacionadas com outras características desconhecidas do provete, tais como a tensão e carga superficial.

Para os provetes da liga de CuAlMn, as CB positivas apresentaram maior concentração e fluorescência nas indentações e na superfície, nomeadamente no provete com corte a 0° para os provetes martensíticos, em detrimento dos austeníticos.

Também foi comprovado que, perante defeitos reais de menores dimensões do que as indentações, as CB têm preferência por essas discontinuidades que lhes proporcionam maior área útil de contacto. No caso concreto da moeda de 1€, as CB, perante uma superfície com indentações

e riscos superficiais, tiveram preferência por estes últimos e inclusive apresentaram-se em maior quantidade, uma vez que a área de contacto efetiva é maior no caso dos riscos do que nas indentações.

Do ponto de vista da influência do fator da química da superfície no comportamento das CB, e no seguimento do ensaio com o ferro fundido, apesar de ter sido alvo de elevada corrosão, parece ter havido preferência pelas matrizes ferríticas, parte das CB negativas.

O provete Fe-Ni com uma estrutura cristalina de Widmanstätten não permitiu, após ataque químico, a visualização pormenorizada das fases kamacite e taenite, impedindo averiguar o comportamento das CB perante uma estrutura tipicamente heterogénea.

Salienta-se o fato das CB com potencial positivo, as quais conduziram a melhores resultados da técnica, têm maior hidrofobicidade que as restantes, o que promove a sua penetração nos materiais, possuem um potencial zeta mais positivo (+4,65 mV), que fortifica e favorece as ligações com superfícies com potencial negativo (maioria das superfícies) e, por fim, produz mais biosurfactantes que induz uma redução da tensão superficial das superfícies, levando a uma penetração em descontinuidades superficiais de menor dimensão.

Relativamente ao equipamento customizado produzido, foi comprovada a sua capacidade de inspeção de provetes contento CB, uma vez que permite uma ampliação suficiente para abranger a matriz de defeitos e permite excitar as CB, através de uma coroa de LED com o comprimento de onda de ~450 nm. De forma a identificar as CB na matriz de defeitos, foram incorporados filtros polarizados que permitem a visualização de comprimentos de onda de 515 nm.

5.3 Propostas de Desenvolvimentos Futuros

Um dos aspetos que merece desenvolvimento adicional é a caracterização das superfícies dos materiais a ensaiar de forma mais específica, nomeadamente ao nível da sua tensão superficial e potencial zeta. Conjugadas estas características dos materiais com as características das bactérias, e uma vez que se conhecem as interações intervenientes no processo de adesão, obter-se-ão resultados mais fidedignos, do ponto de vista da microbiologia.

Do ponto de vista experimental, propõem-se a realização de ensaios com o equipamento customizado, de modo a realizar uma extensiva validação experimental, dada a sua importância, numa primeira fase, para a industrialização da técnica. Além disso, também se recomenda a continuação da aplicação da técnica em materiais emergentes na engenharia e outros que permitam validar a aplicação da técnica em diferentes áreas anteriormente mencionadas.

BIBLIOGRAFIA

- [1] B. João, “Desenvolvimento de Técnicas Baseadas em Filmes de Células Bacterianas para Aplicação em Ensaaios Não Destrutivos de Materiais de Engenharia,” Dissertação de Mestrado em Engenharia Mecânica, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 2011.
- [2] B. Mateus, “Desenvolvimento e Aplicação de Equipamento para Detecção de Defeitos Através de Células Bacterianas em Componentes Microfabricados,” Dissertação de Mestrado em Engenharia Mecânica, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 2012.
- [3] D. Carvalho, “Desenvolvimento e Aplicação de Técnicas Inovadoras de Ensaaios Não Destrutivos (END) com Células Bacterianas,” Dissertação de Mestrado em Engenharia Mecânica, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 2012.
- [4] P. Inácio, “Inspeção de Componentes Microfabricados com Células Bacterianas: Simulação, Instrumentação e Validação Experimental,” Dissertação de Mestrado em Engenharia Mecânica, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 2014.
- [5] A. Costa, “Simulação, Desenvolvimento de Equipamento e Validação Experimental de Ensaaios Não Destrutivos com Células Bacterianas,” Dissertação de Mestrado em Engenharia Mecânica, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 2014.
- [6] T. G. Santos, R. M. Miranda, M. T. Vieira, A. R. Farinha, T. J. Ferreira, L. Quintino, P. Vilaça, and C. C. C. R. De Carvalho, “Developments in micro- and nano-defects detection using bacterial cells,” *NDT & E International*, vol. 78, pp. 20–28, 2016.
- [7] T. G. Santos, R. M. Miranda, and C. C. C. R. De Carvalho, “A new NDT technique based on bacterial cells to detect micro surface defects,” *NDT & E International*, vol. 63, pp. 43–49, 2014.
- [8] T. G. Santos, R. M. Miranda, F. Nascimento, L. Quintino, P. Vilaça, and C. C. C. R. de Carvalho, “Surface discontinuity detection using bacterial suspensions,” *Welding in the World*, vol. 59, no. 5, pp. 723–730, 2015.
- [9] T. G. Santos, P. L. Inácio, A. A. Costa, R. M. Miranda, and C. C. C. R. De Carvalho, “Nova Técnica de END Baseada em Células Bacterianas para Detecção de Micro e Nano Defeitos Superficiais,” *Soldagem & Inspeção*, vol. 20, no. 2, pp. 253–259, 2015.

- [10] P. Pata, “Fundamentos e Aplicações da Metodologia de Ensaios Não Destrutivos com Células Bacterianas,” Dissertação de Mestrado em Engenharia Mecânica, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 2015.
- [11] T. G. Santos, “Aula - PAFEND, Líquidos Penetrantes,” Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, pp. 1–17, 2015.
- [12] E. Siores, A. S. Lamb, and L. M. Swallow, “Bacterial Magnetic Particles for Potential Applications in Nanoscale,” in *4th International Conference on NDT*, 2007, pp. 1–4.
- [13] J. W. C. Lewandowski, D. E. Korber, and H. Lappin-Scott, “Microbial Biofilms,” *Annual Reviews Inc.*, vol. 49, pp. 1–45, 1995.
- [14] H. H. Tuson and D. B. Weibel, “Bacteria–surface interactions,” *Soft Matter*, vol. 9, no. 17, pp. 4368–4380, 2013.
- [15] M. Hermansson, “The DLVO theory in microbial adhesion,” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 14, no. 1–4, pp. 105–119, 1999.
- [16] M. Katsikogianni and Y. F. Missirlis, “Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions,” *European Cells and Materials*, vol. 8, pp. 37–57, 2004.
- [17] G. Trefalt and M. Borkovec, “Overview of DLVO Theory,” Laboratory of Colloid and Surface Chemistry, University of Geneva, 2014.
- [18] L. da C. D. Chaves, “Estudo da Cinética de Formação de Biofilmes em Superfícies em Contacto com Água Potável,” Dissertação de Mestrado em Tecnologia do Ambiente, Universidade do Minho, 2004.
- [19] M. Bendersky and J. M. Davis, “DLVO interaction of colloidal particles with topographically and chemically heterogeneous surfaces,” *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 353, no. 1, pp. 87–97, 2011.
- [20] M. Spector, L. Peretti, F. Salas, and G. Romero, “Bacterial Conduction in Prosthesis,” *Procedia Materials Science*, vol. 8, pp. 351–357, 2015.
- [21] S. S. M. Tavares, F. B. Mainier, F. Zimmerman, R. Freitas, and C. M. I. Ajus, “Characterization of prematurely failed stainless steel orthopedic implants,” *Engineering Failure Analysis*, vol. 17, no. 5, pp. 1246–1253, 2010.
- [22] C. R. F. Azevedo and E. H. Jr, “Failure analysis of surgical implants in Brazil,” *Engineering Failure Analysis*, vol. 9, pp. 621–633, 2002.
- [23] C. W. Chan, I. Hussain, D. G. Waugh, J. Lawrence, and H. C. Man, “In vitro mesenchymal stem cell responses on laser-welded NiTi alloy,” *Materials Science and Engineering C*, vol. 33, no. 3, pp. 1344–1354, 2013.
- [24] V. Caridi, “Correlation between surface characteristics of different orthodontic materials and adherence of microorganisms,” *WebmedCentral Orthodontics*, vol. 5, pp. 1–6, 2014.
- [25] M. Rogante, “Materials & Design SANS-study of the nano-defects in a NiCrMoV wheel of the axial compressor of a heavy duty gas turbine,” *Materials and Design*, vol. 26, pp. 191–195, 2005.

-
- [26] M. Shirani and G. Härkegård, "Fatigue life distribution and size effect in ductile cast iron for wind turbine components," *Engineering Failure Analysis*, vol. 18, no. 1, pp. 12–24, 2011.
- [27] H. M. Rafsanjani and J. D. Sørensen, "Effect of Defects Distribution on Fatigue Life of Wind Turbine Components," *Procedia IUTAM*, vol. 13, pp. 144–150, 2015.
- [28] P. Tom, P. Skarvada, and R. Mack, "Detection and Localization of Defects in Monocrystalline Silicon Solar Cell ~," *Advances in Optical Technologies*, vol. 2010, no. ii, pp. 1–6, 2010.
- [29] L. Wood, "Markets in Wear Coatings: Hard Chrome and its Alternatives - 2016," *Research and Markets*, 2016. [Online]. Available: <https://globenewswire.com/news-release/2016/02/03/807366/0/en/Markets-in-Wear-Coatings-Hard-Chrome-and-its-Alternatives-2016.html>. [Accessed: 20-Jun-2009].
- [30] F. Museux and R. Theilmann, "Introducing more eco-efficient chemical treatments for aircraft structure - Towards a chromate-free AIRBUS," *FAST 45 - Airbus Technical Magazine*, pp. 2–9, Dec-2009.
- [31] S. M. da Costa, C. Jesus, P. Martinho, A. P. Matos, A. P. Ricardo, V. M. Gonçalves, E. D. Lopes, R. do Carmo, M. Rothgeb, and E. Sá, "Substituição de Sistemas de Pintura para aeronaves com Cromados e elevado teor em COVs," *Center for Pollution Prevention Program (C3P)*, 2009. [Online]. Available: http://www.c3p.org/AlternativesToHighVOCChromeCoating_PT.htm. [Accessed: 21-Sep-2016].
- [32] F. Castro, C. Vilarinho, and D. Soares, "Gestão de Resíduos Industriais por Incorporação em Materiais para Construção Civil," *IBEROMET: VIII Congresso Iberoamericano de Metalurgia y Materiales*, pp. 1–8, 2004.
- [33] K. Legg, "Choosing a Hard Chrome Alternative," *Rowan Technology Group*, pp. 1–8.
- [34] G. Kriesch, W. J. Fullen, and E. Turns, "Overview : Aerospace Anodize Finishes," *19th Annual International Anodizing Conference & Exposition*, 2010. [Online]. Available: <http://www.pfonline.com/articles/overview-aerospace-anodize-finishes>. [Accessed: 20-Jun-2009].
- [35] A. D. Juhl, "Anodizing for aerospace: 101," *Materials Today*, 2010. [Online]. Available: <http://www.materialstoday.com/metal-finishing/features/anodizing-for-aerospace-101/>. [Accessed: 20-Jun-2009].
- [36] J. H. Osborne, "Nonchromate Conversion Coatings in use at Boeing," *DoD Metal Finishing Workshop - Chromate Alternatives for Metal Treatment and Sealing*, pp. 1–4, 2006.
- [37] D. Stephenson, "Greener paint for planes," *Boeing Frontiers*, pp. 38–39, 2008.
- [38] B. A. Manty, M. L. Weis, and J. H. Cavanaugh, "Advanced Techniques for Replacing Hexavalent Chrome Plating", *Advanced Techniques for Replacing Chromium: An Information Exchange*,
- [39] M. Farooqi, "Cadmium Plating Alternatives," *Paint and Coatings Industry Magazine*, 2008. [Online]. Available: <http://www.pcimag.com/articles/95782-cadmium-plating-alternatives>. [Accessed: 20-Jun-2009].
-

- [40] “Cadmium Plating Alternative,” *AlumiPlate Inc*, 2009. [Online]. Available: <http://www.alumiplate.com/solutions/cadmium-plating-alternative/>. [Accessed: 20-Jun-2009].
- [41] R. M. Miranda, “Resultados recentes com métodos biológicos,” in *Seminário MicroBac*, 2015, pp. 1–13.
- [42] C. C. C. R. De Carvalho, B. Parreño-Marchante, G. Neumann, M. M. R. Da Fonseca, and H. J. Heipieper, “Adaptation of *Rhodococcus erythropolis* DCL14 to growth on n-alkanes, alcohols and terpenes,” *Applied Microbial and Cell Physiology*, vol. 67, no. 3, pp. 383–388, 2005.
- [43] R. Tavares and T. Rocha, “Sistemas de Ignição,” Unidade Curricular de Sistemas Automóveis (SIAUT), Instituto Superior de Engenharia do Porto - IPP.
- [44] C. C. C. R. De Carvalho, L. Y. Wick, and H. J. Heipieper, “Cell wall adaptations of planktonic and biofilm *Rhodococcus erythropolis* cells to growth on C5 to C16 n-alkane hydrocarbons,” *Applied Microbial and Cell Physiology*, vol. 82, no. 2, pp. 311–320, 2009.
- [45] D. Juliano and E. Pabst dos Reis, “Filtros Polarizadores - Fotografia,” *Camera Neon*, 2013. [Online]. Available: <http://www.cameraneon.com/acessorios/filtros/filtro-polarizador/>. [Accessed: 20-Jun-2009].
- [46] M. Fragoso, P. Cruz, and V. Marcelino, “Televisão 3D,” Comunicação de Áudio e Vídeo, Instituto Superior Técnico, 2011.
- [47] L. Grmela, P. Škarvada, P. Tománek, R. MacKů, and S. Smith, “Local investigation of thermal dependence of light emission from reverse-biased monocrystalline silicon solar cells,” *Solar Energy Materials and Solar Cells*, vol. 96, no. 1, pp. 108–111, 2012.
- [48] D. Campoccia, L. Montanaro, and C. R. Arciola, “A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces,” *Biomaterials*, vol. 34, no. 34, pp. 8533–8554, 2013.
- [49] A. S. da S. Sabino, “Preparação e caracterização de nanoestruturas liposil,” Dissertação de Mestrado em Engenharia Biomédica, Instituto Superior Técnico, 2011.