



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO TECNOLÓGICO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

Mariane Carolina Proner

**AVALIAÇÃO DO CAMPO MAGNÉTICO PERMANENTE COMO ESTRATÉGIA  
PARA CONTROLE DA BIOINCRUSTAÇÃO**

Florianópolis  
2022

Mariane Carolina Proner

**AVALIAÇÃO DO CAMPO MAGNÉTICO PERMANENTE COMO ESTRATÉGIA  
PARA CONTROLE DA BIOINCRUSTAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos na Indústria de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Marco Di Luccio

Coorientadoras: Prof. Dra. Débora de Oliveira e Dra. Alessandra Cristina de Meneses

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Proner, Mariane Carolina

Avaliação do campo magnético permanente como estratégia para controle da bioincrustação / Mariane Carolina Proner ; orientador, Marco Di Luccio, coorientadora, Débora de Oliveira, coorientadora, Alessandra Cristina de Meneses, 2022.

133 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. 2. incrustação biológica. 3. ímã permanente. 4. campo magnético estático. 5. hipoclorito de sódio. I. Di Luccio, Marco . II. Oliveira, Débora de. III. Meneses, Alessandra Cristina de IV. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. V. Título.

Mariane Carolina Proner

**AVALIAÇÃO DO CAMPO MAGNÉTICO PERMANENTE COMO ESTRATÉGIA  
PARA CONTROLE DA BIOINCRUSTAÇÃO**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Andrea Azevedo Veiga, Dra.  
Petrobras

Prof. Hugo Moreira Soares, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Bruno Augusto Mattar Carciofi, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutora em Engenharia de Alimentos

---

Profa. Sandra Regina Salvador Ferreira, Dra.  
Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Prof. Marco Di Luccio, Dr.  
Orientador

Florianópolis, 2022.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Deus, por guiar meu caminho e me dar força e motivação nos momentos difíceis.

Aos meus pais, Olavo e Rosane, e meu irmão Lucas. Todo o apoio, a força e o amor de vocês foram fundamentais nessa caminhada, obrigada por tanto!

Ao Henrique, pela paciência, amor e carinho. Obrigada por acreditar em mim e pelo apoio incondicional em todos os momentos, você foi essencial para a conclusão desta etapa.

Aos meus orientadores Marco Di Luccio, Débora de Oliveira e Alessandra Cristina de Meneses pela confiança no meu trabalho, pelo incentivo, dedicação e ensinamentos compartilhados.

Ao LABSEM, que tornou essa caminhada mais leve e divertida. Obrigada por vocês serem tão presentes e sempre dispostos a ajudar.

Aos meus amigos da pós-graduação e de longa data, pelo incentivo, pelas longas conversas, pelos desabafos, e pela parceria em todos os momentos. Vocês foram essenciais.

Em especial, quero agradecer a Carla Lara e a Maria. A Carla foi fundamental e me ensinou muito desse universo da microbiologia e a Maria que foi meu braço direito e esquerdo nesse trabalho, e tornou esse ciclo mais leve.

À Karina Cesca, pelo seu tempo e conhecimento compartilhado comigo, principalmente na reta final.

À Petrobras, pelo apoio financeiro e intelectual na realização desse trabalho.

Ao LABMASSA, LCME, LAMEB, LINDEN, LIEB, PROFI, e-BIOTECH, LEMA e Central de análises do EQA pelas análises, equipamentos e estrutura física, que foram essenciais para o desenvolvimento da pesquisa.

À CAPES pela concessão da bolsa e apoio financeiro.

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos e à Universidade Federal de Santa Catarina.

A todos que contribuíram para realização deste trabalho.

Muito obrigada!

## RESUMO

A bioincrustação é um problema inerente em sistemas de resfriamento industriais podendo gerar uma série de problemas operacionais que interferem diretamente no desempenho do processo, como o aumento da resistência à transferência de calor e a aceleração da corrosão de metais. Assim, o controle do crescimento de biofilmes é fundamental para assegurar a eficiência da operação e evitar aumento de custos operacionais. A principal estratégia utilizada em nível industrial é a adição de biocida no fluido em contato com a superfície. Porém, a busca por novas técnicas que possam ser associadas às já existentes, visando aumentar a eficiência e economia do processo, são de interesse científico e tecnológico. Neste contexto, este trabalho tem por objetivo avaliar o uso de campo magnético permanente como estratégia emergente no controle de bioincrustação em corpos de prova, que simulam superfície de equipamentos de resfriamento, e o sinergismo com o hipoclorito de sódio. Para tal, um sistema de circulação de água em escala de bancada foi projetado e pares de ímãs permanentes foram acoplados na tubulação. As densidades de fluxo magnético de 0,05, 0,10, 0,23 e 0,45 T, o ímã na posição de repulsão e o uso combinado com  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de cloro livre foram avaliados em relação ao seu efeito sobre o crescimento de biofilme em superfície de corpos de prova de vidro durante 45 dias. Como resultados, os tratamentos magnéticos com 0,23 e 0,45 T e com o ímã na posição de repulsão reduziram em 80% a quantidade de bactérias sésseis em relação ao sistema controle, indicando uma redução do biofilme formado em superfície. Os resultados sugerem que a queda na concentração de bactérias no biofilme pode estar relacionada a uma alteração na produção de metabólitos, dificultando a adesão de células nos corpos de prova. Além disso, o uso combinado de campo magnético permanente e hipoclorito de sódio potencializou o tratamento, reduzindo em 99% a quantidade de bactérias sésseis quando comparado ao sistema controle. O sinergismo entre o hipoclorito de sódio e o campo magnético permanente reduziu significativamente as bactérias planctônicas, contribuindo no desempenho do controle de formação de biofilme. Com base no apresentado pode-se concluir que os resultados mostraram que a aplicação de campo magnético permanente é uma estratégia promissora na redução de bioincrustação em superfícies.

**Palavras-chave:** incrustação biológica, troca térmica, ímã permanente, campo magnético estático, hipoclorito de sódio.

## ABSTRACT

Biofouling is an inherent problem in industrial cooling systems and causes operational problems that directly interfere with the process performance, such as increased resistance to heat transfer and acceleration of metal corrosion. Thus, biofilm control is essential to ensure the operation efficiency and avoid increasing operational costs. The main strategy used at an industrial level is the addition of biocide in the fluid. However, the search for new techniques that can be associated with the existing ones is of scientific and industrial interest in order to increase the efficiency and economy of the process. In this context, this work aims to evaluate the use of permanent magnetic field as a strategy to control biofouling in coupons that simulate the cooling equipment surface and its association with sodium hypochlorite. Bench-scale water circulation system was designed and pairs of permanent magnets were attached to the pipe. The magnetic flux densities of 0.05, 0.10, 0.23, and 0.45 T, the magnet in the repulsion position, and the use combined with 0.5 mg L<sup>-1</sup> of sodium hypochlorite were evaluated in relation to its effect on the biofilm growth on the glass coupon surface for 45 days. As a result, the magnetic treatments with 0.23 and 0.45 T and with the magnet in the repulsion position reduced the amount of sessile bacteria by 80% in relation to the control system, indicating a reduction in the biofilm formed on the surface. The results suggest that the drop in biofilm may be related to an alteration in the metabolites production, making it difficult for adhere cells to the coupons. In addition, the associated use of a permanent magnetic field and sodium hypochlorite potentiated the treatment, reducing the amount of sessile bacteria by 99% when compared to the control system. The synergism between sodium hypochlorite and static magnetic field significantly reduced planktonic bacteria, contributing to the performance of biofilm formation control. Finally, the results showed that the application of permanent magnetic field is a promising strategy in the reduction of biofouling on surfaces.

**Keywords:** biological fouling, heat exchange, permanent magnet, static magnetic field, sodium hypochlorite.

## DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO

<b>Tema</b>
<b>AVALIAÇÃO DO CAMPO MAGNÉTICO PERMANENTE COMO ESTRATÉGIA PARA CONTROLE DA BIOINCRUSTAÇÃO</b>
<b>Por quê?</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- Demanda por processos ambientalmente amigáveis</li><li>- Necessidade de melhorar a eficiência de sistemas de resfriamento</li><li>- Busca pela redução de custos operacionais</li></ul>
<b>Quem já fez?</b>
Atualmente, há poucos trabalhos que aplicaram o campo magnético como estratégia para controle de bioincrustação em sistemas de resfriamento e todos estão voltados para o uso de eletroímãs. Até o momento, não foi encontrado nenhum trabalho que investigou o uso de ímãs permanentes como estratégia alternativa, e o efeito sinérgico com biocidas.
<b>Hipóteses</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- É possível reduzir a bioincrustação em corpos de prova de vidro fazendo uso de campo magnético permanente?</li><li>- A densidade de fluxo magnético gerado por ímãs permanentes influencia na quantidade de biofilme em superfície?</li><li>- O sentido do campo magnético importa na quantidade de biofilme formada em superfície?</li><li>- Há efeito sinérgico entre biocida e campo magnético no crescimento de biofilme em superfícies?</li></ul>
<b>Métodos experimentais</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- Projeto e montagem dos sistemas de circulação de água</li><li>- Ensaios de formação de biofilme nos sistemas controle e magnético utilizando corpos de prova de vidro</li><li>- Variação da densidade de fluxo magnético</li><li>- Variação do sentido do campo magnético permanente</li><li>- Avaliação do efeito sinérgico entre ímãs e biocida</li><li>- Acompanhamento dos parâmetros físico-químicos da água</li><li>- Quantificação das bactérias heterotróficas totais planctônicas e sésseis</li><li>- Caracterização do biofilme formado</li></ul>
<b>Respostas</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- Identificar se o campo magnético permanente reduz a quantidade de bactérias heterotróficas totais sésseis</li><li>- Determinar se há diferença na quantidade de bactérias planctônicas e sésseis aplicando diferentes densidades de fluxo magnético</li><li>- Verificar se a posição do campo magnético (atração e repulsão) altera a quantidade de bactérias planctônicas e sésseis</li><li>- Verificar se a quantidade de substâncias poliméricas extracelulares é afetada na presença do campo magnético permanente</li><li>- Visualizar a morfologia do biofilme formado na presença e ausência do ímã permanente</li><li>- Acompanhar os parâmetros físico-químicos da água de circulação e verificar se o ímã permanente causa alguma alteração significativa</li><li>- Identificar se a associação do campo magnético com hipoclorito de sódio afeta a quantidade de biofilme formado</li></ul>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. SEQUÊNCIA DE EVENTOS QUE LEVAM À FORMAÇÃO DO BIOFILME EM UMA SUPERFÍCIE.....	22
FIGURA 2. ESQUEMA DOS TIPOS DE SISTEMAS DE RESFRIAMENTO À ÁGUA: (A) SISTEMA ABERTO DE PASSAGEM ÚNICA SEM RECIRCULAÇÃO, (B) SISTEMA ABERTO COM RECIRCULAÇÃO E (C) SISTEMA FECHADO COM RECIRCULAÇÃO.....	24
FIGURA 3. ESQUEMA DO MECANISMO DE CORROSÃO INDUZIDA POR MICRORGANISMO POR FORMAÇÃO DE CÉLULAS DE AERAÇÃO DIFERENCIAL.....	26
FIGURA 4. REPRESENTAÇÃO DAS LINHAS DE INDUÇÃO MAGNÉTICA .....	41
FIGURA 5. ESQUEMA DO COMPORTAMENTO DAS LINHAS DE INDUÇÃO EM UM TUBO COLOCADO ENTRE DUAS BARRAS MAGNÉTICAS.....	42
FIGURA 6. FLUXOGRAMA DAS ATIVIDADES REALIZADAS REFERENTE AOS TESTES APRESENTADOS NO CAPÍTULO 3 DESTA TESE.....	45
FIGURA 7. (A) SISTEMAS DE CIRCULAÇÃO DE ÁGUA EM ESCALA DE BANCADA PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DO CAMPO MAGNÉTICO SOBRE O CRESCIMENTO DE BIOFILME EM CORPOS DE PROVA, (B) VISTA SUPERIOR DO SISTEMA CONTROLE, E (C) VISTA SUPERIOR DO SISTEMA MAGNÉTICO, SENDO QUE (1) TANQUE DE POLIETILENO DE ALTA DENSIDADE, (2) ESPAÇO ONDE OS CORPOS DE PROVA SÃO COLOCADOS E (3) CONJUNTOS DE ÍMÃS PERMANENTES ACOPLADOS À TUBULAÇÃO DE ENTRADA AO TANQUE DE CIRCULAÇÃO DE ÁGUA.....	47
FIGURA 8. ESQUEMA DEMONSTRANDO O PAR DE ÍMÃ AJUSTADO NA TUBULAÇÃO PERPENDICULAR AO FLUXO DE ÁGUA.....	47
FIGURA 9. VISTA SUPERIOR DO ESCOAMENTO DA SOLUÇÃO DE CORANTE AO LONGO DO TANQUE DE CIRCULAÇÃO PARA VALIDAÇÃO DO REGIME DE ESCOAMENTO LAMINAR, SENDO QUE (A), (B), (C), (D), (E) E (F) INDICAM A ORDEM CRONOLÓGICA DO ESCOAMENTO.....	53
FIGURA 10. VISTA LATERAL DO ESCOAMENTO DA SOLUÇÃO DE CORANTE AO LONGO DO TANQUE DE CIRCULAÇÃO PARA VALIDAÇÃO DO REGIME DE ESCOAMENTO LAMINAR, SENDO QUE (A), (B), (C), (D), (E) E (F) INDICAM A ORDEM CRONOLÓGICA DO ESCOAMENTO.....	54
FIGURA 11. CONTAGEM DE BHT UTILIZANDO COMO FONTE DE CARBONO 160 MG L <sup>-1</sup> DE DIESEL ESTABILIZADO COM 1% DSS, COMO INÓCULO 5x10 <sup>2</sup> UFC ML <sup>-1</sup> DE CULTURA MISTURA, VAZÃO DE 50 L H <sup>-1</sup> , TEMPERATURA DE 30 °C E NA AUSÊNCIA DE ÍMÃ DURANTE 8 DIAS. (A) BHT PLANCTÔNICAS, E (B) BHT SÉSSEIS. LETRAS DIFERENTES SÃO VALORES COM DIFERENÇA SIGNIFICATIVA (P<0,05). ND: NÃO DETECTADO.....	55
FIGURA 12. FLUXOGRAMA DAS ATIVIDADES REALIZADAS REFERENTES AOS TESTES APRESENTADOS NO CAPÍTULO 4 DESTA TESE.....	58
FIGURA 13. ESQUEMA DO PAR DE ÍMÃ AJUSTADO NA TUBULAÇÃO, DEMONSTRANDO O COMPORTAMENTO DAS LINHAS DE INDUÇÃO NO TUBO QUANDO OS ÍMÃS ESTÃO NA POSIÇÃO DE ATRAÇÃO E REPULSÃO.....	60
FIGURA 14. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA DE CIRCULAÇÃO NO TANQUE DE CORPOS DE PROVA DO SISTEMA CONTROLE, E DOS SISTEMAS MAGNÉTICOS COM DENSIDADE DE FLUXO 0,45; 0,23; 010; 0,05 T E COM ÍMÃS EM POSIÇÃO DE REPULSÃO, UTILIZANDO COMO FONTE DE CARBONO DIESEL ESTABILIZADO COM 1% DE DSS, NA CONCENTRAÇÃO 160 MG/L, COMO INÓCULO CULTURA MISTA, COM CONCENTRAÇÃO INICIAL DE 5x10 <sup>2</sup> UFC.ML <sup>-1</sup> , VAZÃO DE 50 L.H <sup>-1</sup> E TEMPERATURA DE 30 °C. (A) PH, (B) CONDUTIVIDADE, (C) SÓLIDOS DISSOLVIDOS TOTAIS, (D) OXIGÊNIO DISSOLVIDO, E (E) POTENCIAL OXIRREDUTOR.....	66
FIGURA 15. QUANTIDADE DE BHT NA ÁGUA DE CIRCULAÇÃO DO SISTEMA CONTROLE, E DOS SISTEMAS MAGNÉTICOS COM DENSIDADE DE FLUXO 0,45; 0,23; 010; 0,05 T, COM ÍMÃS EM POSIÇÃO DE REPULSÃO, UTILIZANDO COMO FONTE DE CARBONO DIESEL ESTABILIZADO COM 1% DE DSS, NA CONCENTRAÇÃO 160 MG/L (ADIÇÃO NOS DIAS 0, 14 E 28), COMO INÓCULO CULTURA MISTA, COM CONCENTRAÇÃO INICIAL DE 5x10 <sup>2</sup> UFC.ML <sup>-1</sup> , VAZÃO DE 50 L.H <sup>-1</sup> E TEMPERATURA DE 30 °C. (A) BHT PLANCTÔNICAS, E (B) UNIDADE RELATIVA DE LUMINESCÊNCIA (URL). * VALORES COM DIFERENÇA SIGNIFICATIVA EM COMPARAÇÃO COM A AMOSTRA CONTROLE PARA CADA DIA DO EXPERIMENTO (P<0,05).....	69
FIGURA 16. QUANTIDADE DE BHT ADERIDAS AOS CORPOS DE PROVA DE VIDRO DO SISTEMA CONTROLE, E DOS SISTEMAS MAGNÉTICOS COM DENSIDADE DE FLUXO 0,45; 0,23; 010; 0,05 T E COM ÍMÃS EM POSIÇÃO DE REPULSÃO, UTILIZANDO COMO FONTE DE CARBONO DIESEL ESTABILIZADO COM 1% DE DSS, NA CONCENTRAÇÃO 160 MG L <sup>-1</sup> (ADIÇÃO NOS DIAS 0, 14 E 28), COMO INÓCULO CULTURA MISTA, COM CONCENTRAÇÃO INICIAL DE 5x10 <sup>2</sup> UFC.ML <sup>-1</sup> , VAZÃO DE 50 L.H <sup>-1</sup> E TEMPERATURA DE 30 °C. (A) BHT SÉSSEIS, E (B) UNIDADE RELATIVA DE LUMINESCÊNCIA (URL). * VALORES COM DIFERENÇA SIGNIFICATIVA EM COMPARAÇÃO COM A AMOSTRA CONTROLE PARA CADA DIA DO EXPERIMENTO (P<0,05). ND: NÃO DETECTADO.....	73

FIGURA 17. LOG DA RAZÃO ENTRE BHT SÉSSEIS E BHT SÉSSIL DO SISTEMA CONTROLE PARA CADA DIA DE EXPERIMENTO.....	76
FIGURA 18. (A) MASSA SECA ADERIDA, (B) CONCENTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS TOTAIS OBTIDA DAS SPE EXTRAÍDAS DO BIOFILME, E (C) BHT SÉSSEIS DOS CORPOS DE PROVA DO SISTEMA CONTROLE, E DOS SISTEMAS MAGNÉTICOS COM DENSIDADE DE FLUXO 0,45; 0,23; 010; 0,05 T E COM ÍMÃS EM POSIÇÃO DE REPULSÃO, NOS DIAS 0, 14, 28 E 43 DE EXPERIMENTO. * VALORES COM DIFERENÇA SIGNIFICATIVA EM COMPARAÇÃO COM A AMOSTRA CONTROLE PARA CADA DIA DO EXPERIMENTO (P<0,05). ND: NÃO DETECTADO.....	80
FIGURA 19. POTENCIAL ZETA DO BIOFILME EXTRAÍDO EM ÁGUA SALINA 0,85% ESTÉRIL DOS CORPOS DE PROVA DO SISTEMA CONTROLE, E DOS SISTEMAS MAGNÉTICOS COM DENSIDADE DE FLUXO 0,45; 0,23; 010; 0,05 T E COM ÍMÃS EM POSIÇÃO DE REPULSÃO, NOS DIAS 0, 14, 28 E 43 DE EXPERIMENTO. ....	84
FIGURA 20. PERCENTUAL DO NÚMERO DE SEQUÊNCIAS DE RNA DETECTADO NO BIOFILME EXTRAÍDO EM ÁGUA SALINA 0,85% ESTÉRIL DOS CORPOS DE PROVA DO SISTEMA CONTROLE, E DO SISTEMA MAGNÉTICO ÍMÃS EM POSIÇÃO DE REPULSÃO, NOS DIAS 3, 14, 28 E 43 DE EXPERIMENTO. ....	86
FIGURA 21. MICROGRAFIAS OBTIDAS POR MEV DOS BIOFILMES FORMADOS EM CORPOS DE PROVAS DE VIDRO NO DIA 43 DE EXPERIMENTO. (A), (B) E (C) SISTEMA CONTROLE, E (D), (E) E (F) SISTEMA MAGNÉTICO COM ÍMÃS EM POSIÇÃO DE REPULSÃO. ....	87
FIGURA 22. IMAGENS DA MCVL DO BIOFILME FORMADO EM CORPO DE PROVA DE VIDRO NO DIA 43 DE EXPERIMENTO. (A) E (B) SISTEMA CONTROLE, E (C), E (D) SISTEMA MAGNÉTICO COM ÍMÃS EM POSIÇÃO DE REPULSÃO.....	87
FIGURA 23. FLUXOGRAMA DAS ATIVIDADES REALIZADAS REFERENTE AOS TESTES APRESENTADOS NO CAPÍTULO 4 DESTA TESE.....	91
FIGURA 24. QUANTIDADE DE BACTÉRIAS PRESENTES NA ÁGUA SINTÉTICA, UTILIZANDO COMO FONTE DE CARBONO DIESEL ESTABILIZADO COM 1% DE DSS, NA CONCENTRAÇÃO 160 MG L <sup>-1</sup> , COMO INÓCULO CULTURA MISTA, COM CONCENTRAÇÃO INICIAL DE 6X10 <sup>3</sup> UFC.ML <sup>-1</sup> , E TEMPERATURA DE 30 °C, EM 0; 0,5; 1 E 24 H APÓS A ADIÇÃO DE NaClO COM CONCENTRAÇÕES DE: 0; 0,025; 0,050; 0,100; 0,250; 0,500 E 1,000 MG L <sup>-1</sup> .....	96
FIGURA 25. (A) QUANTIDADE DE BACTÉRIAS PRESENTES NA ÁGUA SINTÉTICA, UTILIZANDO COMO FONTE DE CARBONO DIESEL ESTABILIZADO COM 1% DE DSS, NA CONCENTRAÇÃO 160 MG/L, INÓCULO COMPOSTO POR CULTURA MISTA, COM CONCENTRAÇÃO INICIAL DE 6X10 <sup>3</sup> UFC.ML <sup>-1</sup> , E TEMPERATURA DE 30 °C, EM 0; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8 E 24 H APÓS A ADIÇÃO DE NaClO COM CONCENTRAÇÕES DE 0 E 0,05 MG/L. (B) TEMPO DE DECAIMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE CLORO LIVRE RESIDUAL NA ÁGUA SINTÉTICA. ....	98
FIGURA 26. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA DE CIRCULAÇÃO NO TANQUE DE CORPOS DE PROVA DO SISTEMA CONTROLE, MAGNÉTICO, NaClO E NaClO COM CAMPO MAGNÉTICO, UTILIZANDO COMO FONTE DE CARBONO DIESEL ESTABILIZADO COM 1% DE DSS, NA CONCENTRAÇÃO 160 MG/L (ADIÇÃO NOS DIAS 0, 14 E 28), COMO INÓCULO CULTURA MISTA, COM CONCENTRAÇÃO INICIAL DE 5X10 <sup>2</sup> UFC.ML <sup>-1</sup> , VAZÃO DE 50 L.H <sup>-1</sup> E TEMPERATURA DE 30 °C. (A) PH, (B) CONDUTIVIDADE, (C) SÓLIDOS DISSOLVIDOS TOTAIS, (D) OXIGÊNIO DISSOLVIDO, E (E) POTENCIAL OXIRREDUTOR. ....	100
FIGURA 27. QUANTIDADE BHT PLANCTÔNICAS PRESENTES NA ÁGUA DE CIRCULAÇÃO DO SISTEMA CONTROLE, MAGNÉTICO, NaClO E NaClO COM CAMPO MAGNÉTICO, UTILIZANDO COMO FONTE DE CARBONO DIESEL ESTABILIZADO COM 1% DE DSS, NA CONCENTRAÇÃO 160 MG/L (ADIÇÃO NOS DIAS 0, 14 E 28), COMO INÓCULO CULTURA MISTA, COM CONCENTRAÇÃO INICIAL DE 5X10 <sup>2</sup> UFC.ML <sup>-1</sup> , VAZÃO DE 50 L.H <sup>-1</sup> E TEMPERATURA DE 30 °C. * VALORES COM DIFERENÇA SIGNIFICATIVA EM COMPARAÇÃO COM A AMOSTRA CONTROLE PARA CADA DIA DO EXPERIMENTO (P<0,05). ....	103
FIGURA 28. QUANTIDADE DE BACTÉRIAS ADERIDAS AOS CORPOS DE PROVA DE VIDRO DO SISTEMA CONTROLE, MAGNÉTICO, NaClO E NaClO COM CAMPO MAGNÉTICO, UTILIZANDO COMO FONTE DE CARBONO DIESEL ESTABILIZADO COM 1% DE DSS, NA CONCENTRAÇÃO 160 MG/L (ADIÇÃO NOS DIAS 0, 14 E 28), COMO INÓCULO CULTURA MISTA, COM CONCENTRAÇÃO INICIAL DE 5X10 <sup>2</sup> UFC.ML <sup>-1</sup> , VAZÃO DE 50 L.H <sup>-1</sup> E TEMPERATURA DE 30 °C. (A) BHT SÉSSEIS, E (B) LOG DA RAZÃO ENTRE BHT SÉSSEIS E BHT SÉSSIL DO SISTEMA CONTROLE PARA CADA DIA DE EXPERIMENTO. * VALORES COM DIFERENÇA SIGNIFICATIVA EM COMPARAÇÃO COM A AMOSTRA CONTROLE PARA CADA DIA DO EXPERIMENTO (P<0,05). ND: NÃO DETECTADO.....	105
FIGURA 29. (A) MASSA ADERIDA, (B) CONCENTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS TOTAIS OBTIDA DAS SPE EXTRAÍDAS DO BIOFILME, E (C) BHT SÉSSEIS DOS CORPOS DE PROVA DO SISTEMA CONTROLE, MAGNÉTICO, NaClO E NaClO COM CAMPO MAGNÉTICO, NOS DIAS 0, 14, 28 E 43 DE EXPERIMENTO. * VALORES COM DIFERENÇA SIGNIFICATIVA EM COMPARAÇÃO COM A AMOSTRA CONTROLE PARA CADA DIA DO EXPERIMENTO (P<0,05). ND: NÃO DETECTADO. ....	108

FIGURA 30. POTENCIAL ZETA DO BIOFILME EXTRAÍDO EM ÁGUA SALINA 0,85% ESTÉRIL DOS CORPOS DE PROVA DO SISTEMA CONTROLE, MAGNÉTICO, NACLO E NACLO COM CAMPO MAGNÉTICO, NOS DIAS 0, 14, 28 E 43 DE EXPERIMENTO.....	111
FIGURA 31. IMAGENS DO BIOFILME FORMADO EM CORPOS DE PROVA DE CADA SISTEMA NO DIA 43 DE EXPERIMENTO. (A) MEV E (B) MCVL DO SISTEMA CONTROLE, (C) MEV E (D) MCVL DO SISTEMA MAGNÉTICO, (E) MEV E (F) MCVL DO SISTEMA NACLO, (G) MEV E (H) MCVL DO SISTEMA NACLO COM CAMPO MAGNÉTICO.....	112

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. ESTUDOS DO USO DE BIOCIDAS OXIDATIVOS COM FOCO NA REDUÇÃO DE BIOINCRUSTAÇÕES EM EQUIPAMENTOS DE PROCESSO. ....	31
TABELA 2. ESTUDOS DO USO DE BIOCIDAS NÃO-OXIDATIVOS COM FOCO NA REDUÇÃO DE BIOINCRUSTAÇÕES EM EQUIPAMENTOS DE PROCESSO. ....	34
TABELA 3. COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS QUÍMICOS E FÍSICOS PARA CONTROLE DE CRESCIMENTO DE BIOFILME EM SISTEMAS DE RESFRIAMENTO. ....	35
TABELA 4. ESTUDOS DO USO DE MÉTODOS FÍSICOS COM FOCO NA REDUÇÃO DE BIOINCRUSTAÇÕES EM EQUIPAMENTOS DE PROCESSO. ....	36
TABELA 5. COMPOSIÇÃO DE SAIS UTILIZADOS NO PREPARO DA ÁGUA DE RESFRIAMENTO SINTÉTICA. ...	50

## LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

BHT: bactérias heterotróficas totais

CIM: concentração inibitória mínima

CM: campo magnético

CQA: compostos quaternários de amônio

DMD: diagnóstico microbiológico digital

DPD: N,N-dietil-p-fenilenodiamina

DSS: dodecil sulfato de sódio

MCVL: microscopia confocal de varredura a laser

MEV: microscopia eletrônica de varredura

$N_{Re}$ : número de Reynolds

PCA: *plate count agar*

SPE: substâncias poliméricas extracelulares

URL: unidade relativa de luminescência

UV: luz ultravioleta

$\zeta$ : potencial zeta

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
1.1. OBJETIVO GERAL .....	18
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
1.3. ESTRUTURA DO DOCUMENTO .....	19
<b>2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>21</b>
2.1. BIOINCRUSTAÇÃO: CONCEITOS GERAIS .....	21
2.2. BIOINCRUSTAÇÃO EM SISTEMAS DE RESFRIAMENTO INDUSTRIAIS .....	23
2.3. ESTRATÉGIAS PARA REDUZIR A BIOINCRUSTAÇÃO EM SISTEMAS DE RESFRIAMENTO	26
<b>2.3.1. Biocidas</b> .....	<b>29</b>
2.3.1.1. <i>Biocidas oxidativos</i> .....	29
2.3.1.2. <i>Biocidas não-oxidativos</i> .....	32
<b>2.3.2. Métodos físicos</b> .....	<b>34</b>
<b>2.3.3. Campo magnético</b> .....	<b>40</b>
2.3.3.1. <i>Campo magnético como estratégia antibioincrustação em sistemas de resfriamento</i>	42
2.3.3.2. <i>Considerações a respeito do estado da arte</i> .....	44
<b>3. VALIDAÇÃO DO SISTEMA DE CIRCULAÇÃO DE ÁGUA CONSTRUÍDO E DA FORMAÇÃO DE BIOFILME EM CORPOS DE PROVA</b> .....	<b>45</b>
3.1. MATERIAIS E MÉTODOS .....	46
3.1.1. <b>Componentes dos sistemas de circulação de água</b> .....	<b>46</b>
3.1.2. <b>Corpos de prova</b> .....	<b>48</b>
3.1.3. <b>Validação do escoamento dos sistemas de circulação de água</b> .....	<b>48</b>
3.1.4. <b>Composição da água de circulação</b> .....	<b>49</b>
3.1.5. <b>Validação da formação de biofilme nos sistemas de circulação de água</b> .....	<b>51</b>
3.1.6. <b>Determinação do crescimento microbiano</b> .....	<b>51</b>
3.1.7. <b>Análise estatística</b> .....	<b>52</b>
3.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	53
3.2.1. <b>Validação do funcionamento dos sistemas de circulação de água</b> .....	<b>53</b>
3.2.2. <b>Validação da formação de biofilme em corpos de prova dispostos no sistema de circulação de água</b> .....	<b>54</b>
3.3. CONCLUSÕES PARCIAIS .....	56
<b>4. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO CAMPO MAGNÉTICO PERMANENTE NO CRESCIMENTO DE BIOFILME</b> .....	<b>58</b>
4.1. MATERIAIS E MÉTODOS .....	59
4.1.1. <b>Ensaio de formação do biofilme em sistema de circulação de água exposto ao campo magnético</b> .....	<b>59</b>
4.1.2. <b>Ensaio de viabilidade celular</b> .....	<b>61</b>
4.1.3. <b>Análises de caracterização</b> .....	<b>61</b>
4.1.3.1. <i>Massa seca aderida no corpo de prova</i> .....	62
4.1.3.2. <i>Quantificação das SPE</i> .....	62
4.1.3.3. <i>Potencial zeta</i> .....	63
4.1.3.4. <i>Quantificação do número de sequência de RNA</i> .....	63
4.1.3.5. <i>Morfologia do biofilme</i> .....	63
4.1.4. <b>Análise estatística</b> .....	<b>64</b>
4.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	65
4.2.1. <b>Efeito do campo magnético nos parâmetros físico-químicos da água sintética de circulação</b> .....	<b>65</b>
4.2.2. <b>Efeito do campo magnético nas BHT planctônicas e sésseis</b> .....	<b>68</b>
4.2.3. <b>Caracterização do biofilme formado em corpos de prova de vidro na ausência e presença de campo magnético permanente</b> .....	<b>79</b>
4.3. CONCLUSÕES PARCIAIS .....	89

<b>5. AVALIAÇÃO DO USO DE HIPOCLORITO DE SÓDIO ASSOCIADO AO CAMPO MAGNÉTICO PERMANENTE NO CRESCIMENTO DE BIOFILME</b> .....	<b>90</b>
5.1. MATERIAIS E MÉTODOS .....	91
5.1.1. Determinação da concentração inibitória mínima.....	92
5.1.2. Tempo de ação e de decaimento do cloro residual livre .....	93
5.1.3. Avaliação do efeito sinérgico do hipoclorito de sódio e do campo magnético permanente na formação de biofilme em corpos de prova de vidro .....	94
5.1.4. Análises de caracterização .....	95
5.1.5. Análise estatística .....	95
5.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	95
5.2.1. Concentração inibitória mínima .....	95
5.2.2. Tempo de ação e decaimento da concentração de cloro residual livre .....	97
5.2.3. Avaliação do efeito da associação de NaClO e campo magnético no controle da bioincrustação .....	99
5.2.3.1. Parâmetros físico-químicos da água.....	100
5.2.3.2. Concentração de BHT planctônicas e sésseis.....	102
5.2.3.3. Caracterização do biofilme formado .....	107
5.3. CONCLUSÕES PARCIAIS .....	114
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>115</b>
6.1. CONCLUSÕES .....	115
6.2. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS .....	115
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>117</b>
<b>APÊNDICE</b> .....	<b>127</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Grande parte dos processos industriais, em setores diversos como indústria alimentícia, química ou farmacêutica, requer o resfriamento de um fluido que gera ou recebe calor durante uma operação unitária. Para tal, se faz essencial o uso de sistemas de resfriamento, como os trocadores de calor e torres de resfriamento. Esses equipamentos e suas tubulações apresentam um meio propício para a proliferação microbiana devido às condições de operação e composição do fluido de resfriamento (geralmente a água), como contato com ar atmosférico (aeração), temperatura na faixa de 25 a 35 °C, pH próximo a 7 e a presença de dispersantes, inibidores de corrosão e lubrificantes, servindo como fonte de nutriente para o estímulo do crescimento. Por estes motivos, os sistemas de resfriamento são altamente susceptíveis à formação de bioincrustação (CLOETE; JACOBS; BROZEL, 1998; CLOETE; BRÖZEL, 1992).

De modo geral, a bioincrustação é a adesão irreversível de microrganismos em superfícies, causando uma série de problemas operacionais nesses sistemas de resfriamento, tais como aumento da resistência à transferência de calor e aumento da propensão à corrosão do material, os quais impactam diretamente no desempenho do processo, refletindo em aumento nos custos operacionais (FLEMMING *et al.*, 2009).

A compreensão do mecanismo de formação do biofilme em superfícies, bem como estudos de técnicas de monitoramento e controle da incrustação biológica são fundamentais para alcançar e manter o desempenho desejável nos sistemas de resfriamento. Apesar de o mecanismo de desenvolvimento de biofilme em superfícies já ser consolidado na literatura, as técnicas para controle de sua formação são de grande interesse em estudos e aplicação em processos em escala industrial.

De modo geral, as incrustações são controladas com o pré-tratamento do fluido de alimentação do equipamento pela adição de produtos químicos (biocidas oxidativos ou não) devido à sua simplicidade, eficácia e baixo custo. Porém, dependendo do tipo de biocida e da concentração utilizada pode haver formação de subprodutos tóxicos ao meio ambiente e nocivos à saúde, tornando seu uso um problema (BUCS *et al.*, 2014).

Desta forma, estratégias baseadas em métodos físicos, como aplicação de campos magnético, elétrico, pulsado e ultrassônico, têm sido propostas na literatura e são alternativas ao tratamento anti-incrustação de águas de resfriamento industriais.

Os métodos físicos têm como principais vantagens a não regulamentação do descarte de efluente, uma vez que são inofensivos ao meio ambiente (não produzem resíduos secundários). Além disso, têm o potencial de reduzir custos com manutenção e aumentar a segurança do processo, uma vez que podem contribuir na redução da quantidade de produto químico utilizada (BOTT, 2001; PIYADASA *et al.*, 2017a; TRUEBA *et al.*, 2015; TRUEBA; GARCÍA; OTERO, 2014).

Dentre os métodos físicos, destaca-se o uso de campos magnéticos. Além de serem versáteis, de fácil instalação e escalonamento, alguns trabalhos mostram que campos magnéticos podem alterar o crescimento de bactérias, causando até a morte celular, o que mostra que esta é uma técnica promissora na prevenção à bioincrustação em equipamentos (CELLINI *et al.*, 2008; GIORGI; MARCANTONIO; BERSANI, 2011; PIATTI *et al.*, 2002; RE; AGOSTINI; GIORGI, 2004; ZAIDI *et al.*, 2014).

Na literatura há estudos que investigam o uso de campos magnéticos na redução de incrustação salina em sistemas de troca térmica (HAN *et al.*, 2018; IMBROGNO *et al.*, 2018; LIPUS *et al.*, 2015; PIYADASA *et al.*, 2017b; XU *et al.*, 2018; ZHAO; LIU; ZHAO, 2014). Porém, poucos trabalhos têm se dedicado à investigação do seu efeito na redução do bioincrustação em superfícies de tais equipamentos.

Dos poucos trabalhos disponíveis na literatura, destacam-se os de um grupo espanhol que tem se dedicado ao estudo da aplicação de campos magnéticos gerados por eletroímãs no controle de bioincrustações em superfícies de trocadores de calor, utilizando água do mar como fluido de resfriamento. Nestes estudos, foi comprovado que é possível reduzir a espessura do biofilme em tubulações e, por consequência, a resistência de troca térmica (GARCÍA; TRUEBA, 2018; TRUEBA *et al.*, 2015; TRUEBA; GARCÍA; OTERO, 2014). Ressalta-se também o estudo realizado por Mercier *et al.* (2016), que avaliaram o efeito de um campo gerado por eletroímã de baixa frequência em um circuito contendo corpos de prova de aço inox, alimentado com água de rio. Este apresentou resultados satisfatórios, uma vez que com a aplicação do campo, os autores observaram a redução do crescimento de biofilme nos corpos de prova.

Dos trabalhos citados, observa-se que em todos foram utilizados eletroímãs de baixa frequência. Também não há relatos variando a densidade de fluxo magnético ou a sinergia entre campo magnético e biocidas. Além disso, os eletroímãs apresentam como principal desvantagem a necessidade de instalações elétricas para

gerar a corrente que alimenta a bobina, bem como o aquecimento do dispositivo, que algumas vezes necessita de outros dispositivos para arrefecimento do sistema. Por este motivo, o uso de ímãs permanentes surge como uma alternativa, uma vez que não necessita de instalações complexas, não envolve uso de energia elétrica e também sofrem aquecimento durante a operação, além de ser de fácil instalação (não há necessidade de alteração na disposição de sistemas operacionais).

Frente ao exposto, o presente trabalho propõe investigar, pela primeira vez, os efeitos de campo magnético permanente sobre o crescimento de biofilmes em superfícies que simulam equipamentos de sistemas de resfriamento. Para tal, dois sistemas de bancada de circulação de água foram projetados para acoplar os corpos de prova que simulam superfícies de equipamento e estimular a formação do biofilme, sendo um sistema controle e outro exposto à ação do campo magnético nas tubulações. Os efeitos de sentido e densidade de fluxo magnético do campo, bem como o efeito sinérgico do campo magnético com hipoclorito de sódio foram avaliados em relação à quantificação de células livres e aderidas na superfície dos corpos de prova, às propriedades físico-químicas do biofilme formado e às análises de caracterização do biofilme formado.

### 1.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desta tese foi investigar o efeito do campo magnético permanente e o seu sinergismo com biocida como estratégia para o controle de formação de biofilme bacteriano em corpos de prova de vidro representando superfície de sistemas de resfriamento.

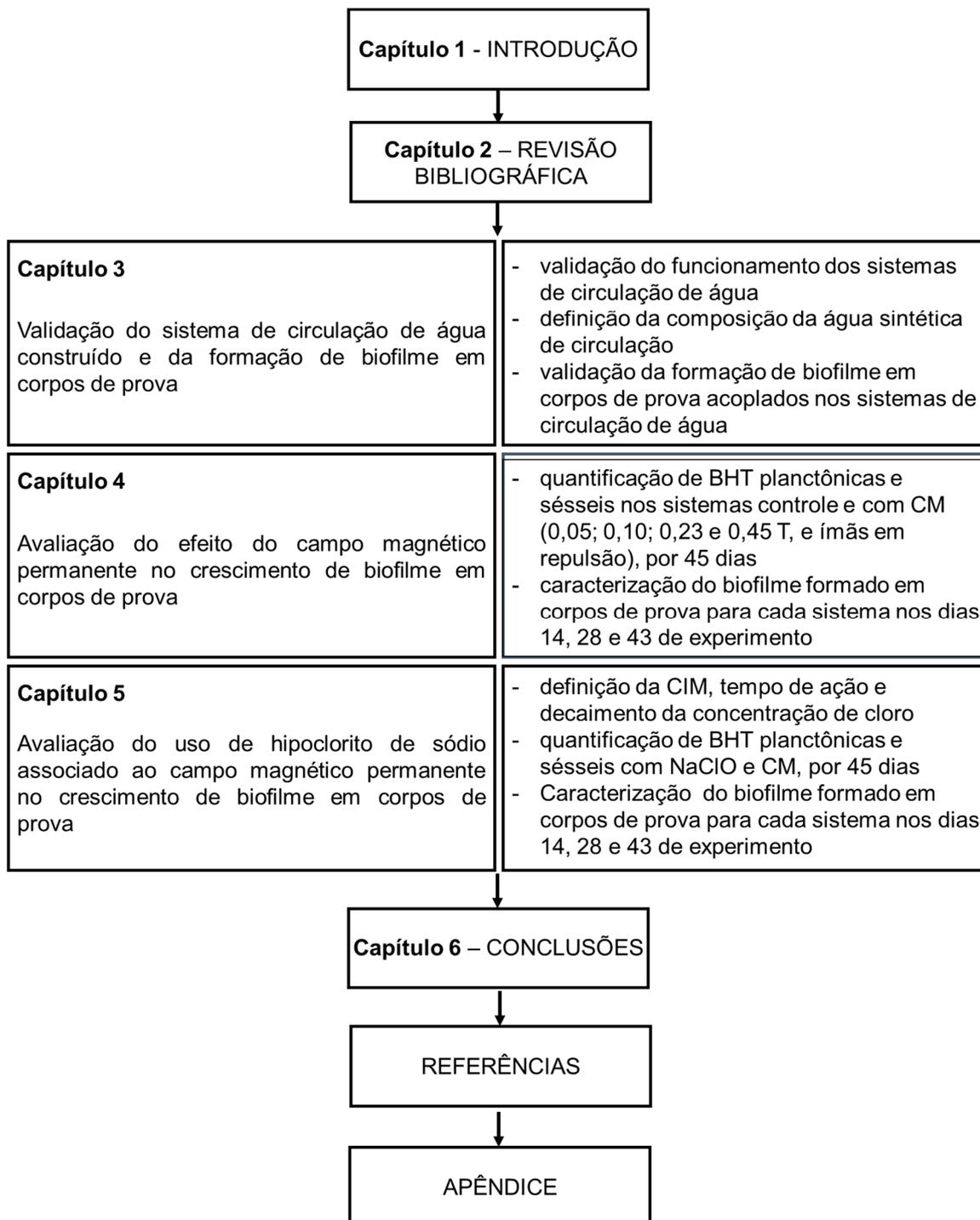
### 1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Projetar, construir e validar o funcionamento de dois sistemas de circulação de água de bancada idênticos para corpos de prova planos. Um para operação sem e outro com ímãs permanentes acoplados;

- b. Validar a formação de biofilme nos corpos de prova de vidro nos sistemas de circulação de água utilizando água de circulação sintética;
- c. Avaliar o efeito de diferentes densidades de fluxo magnético (0,45, 0,23, 0,10 e 0,05 T) e a posição dos ímãs permanentes (atração e repulsão) sobre o crescimento de biofilmes em corpos de prova de vidro instalados no sistema de circulação de água;
- d. Estudar o efeito de solução de hipoclorito de sódio ( $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de cloro livre) sobre o crescimento de biofilme em corpos de prova de vidro instalados no sistema em escala de bancada na ausência e presença de campo magnético;
- e. Caracterizar os biofilmes formados nos corpos de prova em relação a quantificação de bactérias heterotróficas totais, sólidos totais, quantificação de substâncias poliméricas extracelulares; quantificação do número de sequências de RNA, potencial zeta, microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal de varredura a laser.

### 1.3. ESTRUTURA DO DOCUMENTO

O trabalho encontra-se organizado em capítulos. O Capítulo 1 apresenta a introdução e os objetivos de tese e o Capítulo 2 é composto pela revisão bibliográfica, na qual são abordados conceitos gerais de biofilme e sistemas de resfriamento, com foco em estratégias para reduzir o crescimento de biofilmes em superfícies. Os Capítulos 3 a 5 apresentam os resultados de cada etapa do trabalho. Em cada capítulo há uma descrição dos materiais e métodos utilizados, os resultados obtidos e as respectivas conclusões. O Capítulo 6 traz as considerações finais e sugestões para trabalhos futuros. Como forma de melhor entendimento das etapas do trabalho, a estrutura detalhada do documento é apresentada no diagrama a seguir.



BHT: bactérias heterotróficas totais  
 CM: campo magnético  
 CIM: concentração inibitória mínima  
 NaClO: hipoclorito de sódio

## 2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Esta seção apresenta os fundamentos sobre formação de biofilme e sistemas de resfriamento, e foca em estudos encontrados na literatura sobre estratégias utilizadas para o controle de crescimento de biofilme em superfícies de sistemas de resfriamento, os quais foram usados para fundamentar e executar o presente trabalho. Subdividido em 3 tópicos principais, este capítulo apresenta os conceitos gerais sobre biofilmes, descreve os tipos de sistemas de resfriamento e os efeitos que o biofilme causa nestes, e por fim traz uma revisão das estratégias usadas para reduzir o crescimento de biofilme nas superfícies desses sistemas. O texto apresentado a seguir serviu como base para o artigo de revisão publicado na revista *Industrial & Engineering Chemistry Research*, intitulado *Industrial cooling systems and antibiofouling strategies: a comprehensive review*. (<https://dx.doi.org/10.1021/acs.iecr.0c05985>)

### 2.1. BIOINCRUSTAÇÃO: CONCEITOS GERAIS

Bioincrustação é o termo utilizado quando ocorre o crescimento indesejado de biofilmes em uma determinada superfície, a ponto de ocasionar problemas técnicos em sistemas ou organismos. Flemming (2002) considera a bioincrustação como um reator de biofilme “no lugar errado e na hora errada”, gerando problemas operacionais inaceitáveis. Em outras palavras, pode-se considerar que a bioincrustação é um efeito do crescimento de biofilmes, tornando sua definição subjetiva, dependendo das condições operacionais (FLEMMING, 2020).

Por sua vez, biofilme pode ser definido como uma comunidade séssil composta por células microbianas que se ligam a uma interface ou entre si com auxílio das substâncias poliméricas extracelulares (SPE) (DONLAN, 2002; HORI; MATSUMOTO, 2010; JAIN; MARSILI, 2011; LV *et al.*, 2015; MATTILA-SANDHOLM; WIRTANEN, 1992; PATEL *et al.*, 2014; VRIJENHOEK; HONG; ELIMELECH, 2001).

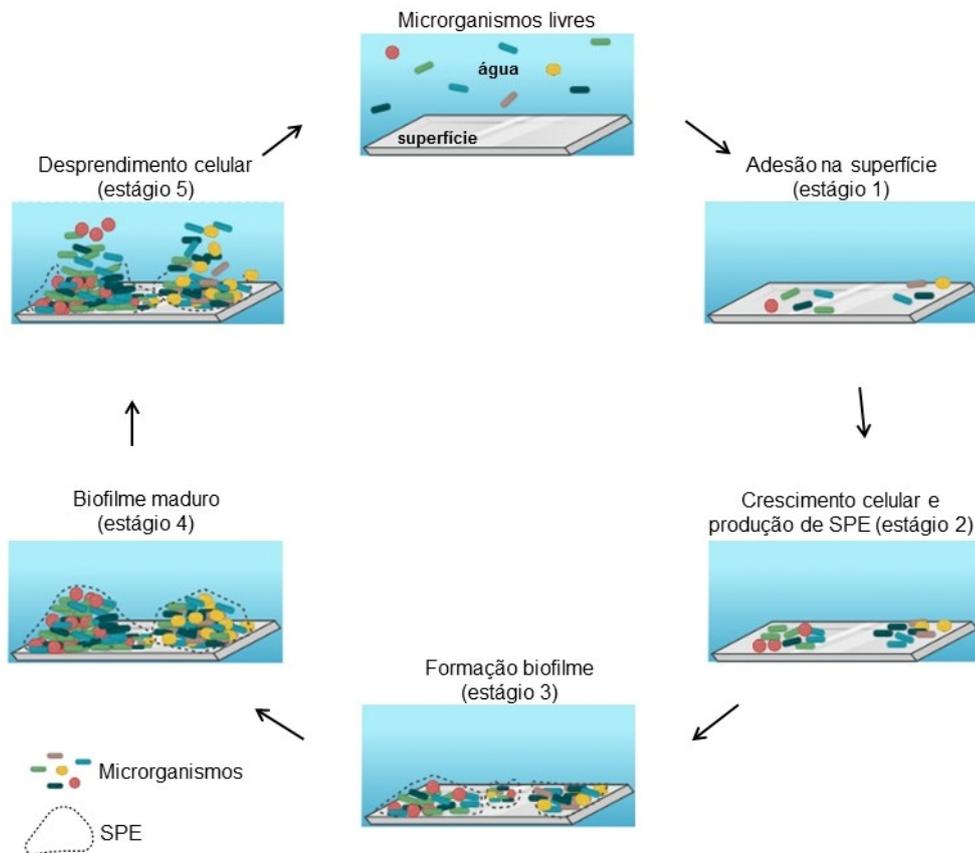
Manter-se em estado séssil é favorável para as células, pois os biofilmes possuem tolerância antimicrobiana e maior proteção contra estresses ambientais (pH extremo, oxigênio, temperatura, choque osmótico, entre outros). Além disso, as SPE fornecem estabilidade mecânica para o biofilme e permitem interações sinérgicas com

o meio, favorecendo a hidratação e a troca rápida de nutrientes, metabólitos e material genético (ANNOUS; FRATAMICO; SMITH, 2009; COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999; DONLAN, 2002; FLEMMING, 2020; PATEL *et al.*, 2014; VU *et al.*, 2009).

Várias espécies microbianas podem estar envolvidas no desenvolvimento dos biofilmes (O'TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000), uma vez que utilizam desse meio como estratégia de sobrevivência em um ambiente hostil (FLEMMING, 2002; HERZBERG; ELIMELECH, 2007). Porém, as bactérias são a classe microbiana que aparecem com maior frequência na sua composição (MATIN *et al.*, 2011).

Pelo fato da bioincrustação ser um efeito do crescimento de biofilme, é importante conhecer seu mecanismo de desenvolvimento, que compreende um processo dinâmico com cinco estágios (DONLAN, 2002; GU; REN, 2014; O'TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000), como ilustrado na Figura 1.

**Figura 1.** Sequência de eventos que levam à formação do biofilme em uma superfície.



Fonte: Autor.

SPE: substâncias poliméricas extracelulares.

Primeiramente, as células livres se aproximam de uma determinada superfície, seja pelo movimento do fluido ou pela motilidade celular (VAN HOUTDT; MICHIELS, 2005). Essa etapa é crucial para que ocorra a adesão celular inicial (estágio 1) e é influenciada principalmente pelas propriedades da célula e da superfície, como a carga superficial e o grau de hidrofobicidade (PALMER; FLINT; BROOKS, 2007). O próximo estágio consiste na adesão da célula na superfície (estágio 2), iniciando a multiplicação celular e produção das SPE (HERZBERG; KANG; ELIMELECH, 2009; RAMSEY; WHITELEY, 2004).

À medida que as células se replicam e as SPE se acumulam (estágio 3), pequenas colônias são formadas (GU; REN, 2014), transformando-as em biofilme maduro (estágio 4), devido ao acúmulo das SPE (ANNOUS; FRATAMICO; SMITH, 2009). Nesse momento, as SPE proporcionam integridade estrutural ao biofilme, agindo como uma barreira (MATIN *et al.*, 2011).

As SPE podem ser consideradas o material matricial primário do biofilme e a sua composição é complexa, envolvendo proteínas, carboidratos, polissacarídeos, DNA, e lipídeos (DONLAN, 2002; FLEMMING *et al.*, 2009). Como mencionado, as SPE oferecem vantagens importantes para as células, pois através delas há a incorporação de água na estrutura do biofilme (DONLAN, 2002) e por sorção podem sequestrar nutrientes do ambiente (FLEMMING *et al.*, 2009).

O desprendimento celular é o último estágio no mecanismo de desenvolvimento do biofilme (estágio 5). Para colonizar novas superfícies e para evitar a escassez de nutrientes devido ao aumento da densidade populacional, as células se desprendem do biofilme maduro e reiniciam a formação de um novo biofilme em outro ponto da superfície (DAVIES; MARQUES, 2009; MATIN *et al.*, 2011).

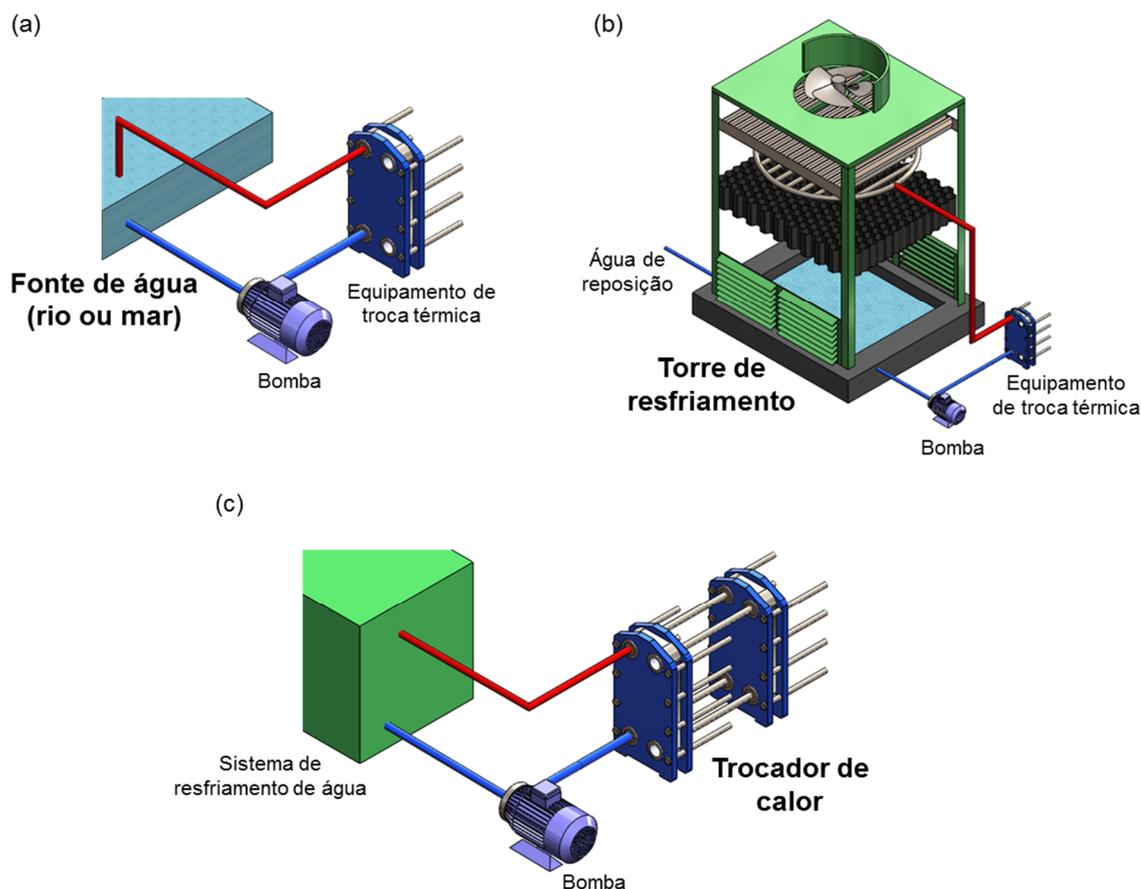
## 2.2. BIOINCRUSTAÇÃO EM SISTEMAS DE RESFRIAMENTO INDUSTRIAIS

Os sistemas industriais com maior propensão à formação da bioincrustação são os sistemas de resfriamento e os sistemas de filtração por membranas. Um sistema de resfriamento é baseado em um conjunto de elementos necessários para transferência de calor entre fluidos, sendo a água muito utilizada como fluido

refrigerante, por apresentar propriedades interessantes, como baixa viscosidade e elevada condutividade térmica (FILHO; LOPES, 2015; PATEL *et al.*, 2014).

Os sistemas de resfriamento à água podem ser classificados como: (1) sistemas abertos de passagem única (sem recirculação) e (2) sistemas com recirculação, os quais podem ser fechados ou abertos (FILHO; LOPES, 2015). Os esquemas de cada sistema são apresentados na Figura 2.

**Figura 2.** Esquema dos tipos de sistemas de resfriamento à água: (a) sistema aberto de passagem única sem recirculação, (b) sistema aberto com recirculação e (c) sistema fechado com recirculação.



Fonte: Reproduzido com permissão de Proner *et al.* (2021). Copyright 2021 American Chemical Society (Figura 1A do Apêndice).

No sistema aberto sem recirculação (Figura 2a) a água é captada diretamente de uma fonte (rio, por exemplo), circula em um equipamento de troca térmica e é descartada ao final do processo diretamente no ambiente (RAO, 2015). No sistema aberto com recirculação (Figura 2b) a água passa por um sistema ventilado para dissipar o calor absorvido durante uma operação unitária e retorna para o processo. Nesse caso, as torres de resfriamento são um exemplo (FILHO; LOPES, 2015). Por fim, para os sistemas fechados com recirculação (Figura 2c) a água circula em um

circuito fechado (trocador de calor). Geralmente, o calor absorvido pela água nesses sistemas fechados é transferido para um sistema de recirculação aberto, como as torres de resfriamento (BAHADORI, 2016; FILHO; LOPES, 2015).

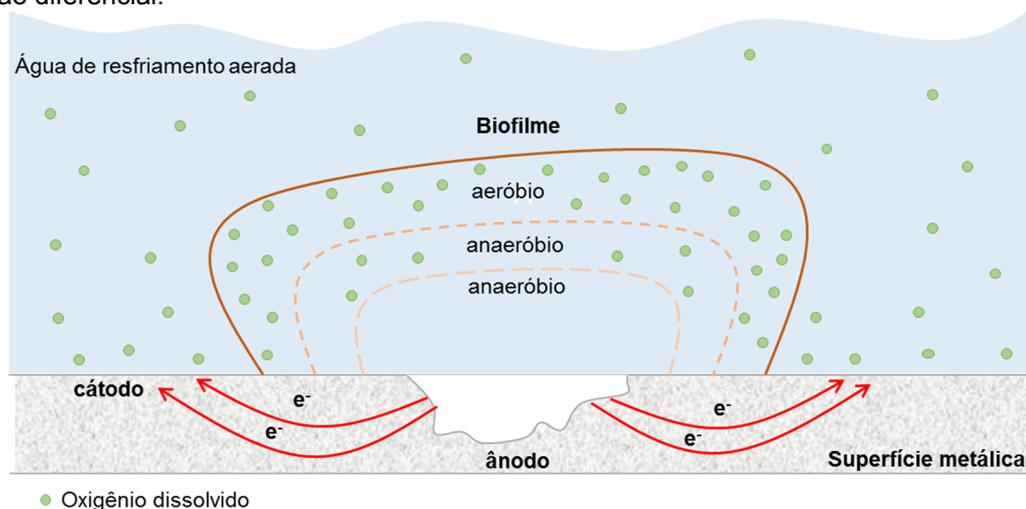
A bioincrustação gera inúmeros problemas nos sistemas citados, afetando tanto o desempenho da operação como o equipamento em si (componentes físicos). Em circuitos de água de resfriamento os efeitos mais comuns são o aumento da resistência à transferência de calor e a corrosão microbiológica da superfície do equipamento (FLEMMING *et al.*, 2009).

O depósito de biofilmes sobre a superfície de equipamentos de troca térmica representa uma resistência adicional à transferência de calor, uma vez que o desenvolvimento desses depósitos forma uma camada gel na superfície do equipamento, a qual fica isolada da fase líquida. Por consequência, se tem uma “superfície extra” com condutividade térmica inferior à metálica (LUDENSKY, 2003) e a transferência de calor do fluido para a interface do equipamento passa a ser controlada por difusão e não mais por convecção (FLEMMING, 2002).

Além da queda de desempenho de sistemas de resfriamento, é comum relacionar a bioincrustação com a corrosão do material que compõe os equipamentos de troca térmica, conhecida como corrosão induzida por microrganismos. Esta consiste na corrosão de metais induzida pela atividade metabólica de um ou mais microrganismos, e pode ocorrer direta ou indiretamente (CLOETE; BRÖZEL, 1992).

A formação de células de aeração diferencial representa o mecanismo de corrosão comumente ligado aos sistemas de resfriamento. Resumidamente, quando os microrganismos aderem a uma superfície é criada uma região anaeróbia, devido ao consumo de oxigênio por microrganismos aeróbios (região interna ao biofilme) e outra região mais externa que está em contato com o meio oxigenado (superfície do biofilme). Essa adesão não uniforme resulta na formação de células de aeração diferencial, nas quais na área coberta pelo biofilme há um esgotamento do oxigênio funcionando como um ânodo (doador de elétrons) e a área vizinha em contato com o ar oxigenado funcionando como cátodo (receptor de elétrons). Essa diferença de concentração de oxigênio em duas regiões da superfície metálica gera uma diferença de potencial, ocasionando a oxidação do metal na região anódica (CLOETE; BRÖZEL, 1992). Para melhor entendimento, a Figura 3 traz um esquema do mecanismo da CIM.

**Figura 3.** Esquema do mecanismo de corrosão induzida por microrganismo por formação de células de aeração diferencial.



Fonte: Reproduzido com permissão de Proner *et al.* (2021). Copyright 2021 American Chemical Society (Figura 1A do Apêndice).

Os efeitos da bioincrustação geram impactos econômicos negativos na cadeia produtiva, os quais são difíceis de mensurar, pois são causados por uma série de fatores, como queda no desempenho do processo, diminuição da qualidade e quantidade do produto, danos ao material do equipamento, superdosagem de anti-incrustantes e produtos de limpeza, e interrupções dos processos produtivos devido à limpeza e manutenção prolongada. De modo geral, o aumento da resistência à transferência de calor é o primeiro aspecto dos custos relacionados à bioincrustação, representando cerca de 20% no aumento do consumo energético. Por este motivo, é comum a prática do dimensionamento preventivo em plantas de troca térmica (FLEMMING *et al.*, 2009; FLEMMING, 2020).

### 2.3. ESTRATÉGIAS PARA REDUZIR A BIOINCRUSTAÇÃO EM SISTEMAS DE RESFRIAMENTO

As águas utilizadas em sistemas de resfriamento não são estéreis, ou seja, uma certa quantidade de células que entra em contato com o equipamento é potencial para a formação de biofilme, uma vez que se multiplicarão consumindo substâncias biodegradáveis dissolvidas na fase aquosa. Pode-se afirmar que a extensão do crescimento do biofilme é determinada pela presença de células, disponibilidade de

nutrientes e condições operacionais (COSTERTON *et al.*, 1995; COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999; DONLAN; COSTERTON, 2002; FLEMMING, 2002).

Dentro desse contexto, considerando que biofilmes crescem com qualquer carga microbiana e material biodegradável disponíveis, a bioincrustação se torna um problema que não consegue ser totalmente eliminado, e fazer uso de técnicas com intuito de mitigar seus efeitos negativos nos sistemas industriais é necessário. Uma estratégia antibioincrustante eficaz compreende diversas ações integradas (como uma boa manutenção do sistema e superfícies com pouca rugosidade, de fácil higienização) apoiadas pela aplicação de técnicas que visam o controle do desenvolvimento do biofilme, permitindo uma intervenção precoce, reduzindo os impactos negativos no desempenho e no custo do processo (FLEMMING, 2020).

Os principais métodos de controle do crescimento de biofilme em superfícies são baseados na ação antibacteriana de compostos químicos sintéticos (biocidas), de compostos naturais (substâncias produzidas por microrganismos, método biológico) ou de uma ação mecânica (método físico). Entre as técnicas para controle de biofilme conhecidas, os biocidas (método químico) são a principal ferramenta no combate à formação de biofilme na indústria. Eles são facilmente adicionados à água de alimentação que carrega os compostos químicos por todo o sistema de resfriamento, garantindo o controle da bioincrustação de maneira eficaz e direta. A concentração e o tipo de composto ativo do biocida desempenham um papel relevante na eficácia do tratamento. Porém, o descarte descontrolado desses resíduos pode gerar consequências graves e negativas a longo prazo sobre a biodiversidade ambiental (BALAMURUGAN; PRASHANTH; RAO, 2014; EGUÍA *et al.*, 2007, 2008; LIU *et al.*, 2011b; TRUEBA; GARCÍA; OTERO, 2014).

Diante desse cenário, com o aumento da consciência ecológica e a aprovação de leis mais rígidas em relação ao descarte de resíduos químicos no ecossistema nas últimas décadas, o interesse por técnicas alternativas de controle do biofilme e que possam contribuir diretamente na redução dos impactos ambientais gerados por resíduos químicos está crescendo (BUCS *et al.*, 2014; FLEMMING, 2020). Desse modo, alguns estudos propõem a utilização de métodos físicos e biológicos.

Em relação aos métodos físicos, como uso de ultrassom, campo elétrico e magnético e luz UV, estudos mostram que são técnicas promissoras para substituir ou trabalhar em sinergismo com os produtos químicos e garantir um controle satisfatório da bioincrustação em equipamentos de sistemas de resfriamento como

trocadores de calor e torres de resfriamento (HOTRUM *et al.*, 2015; KIM; PARK; HA, 2016; MERCIER *et al.*, 2016; PANDIT *et al.*, 2017).

Por sua vez, os métodos biológicos surgiram com base na capacidade de certos microrganismos de excretar compostos que inibem o crescimento de microrganismos concorrentes (CAO *et al.*, 2011). As técnicas biológicas fazem uso do *quorum quenching* e bacteriófagos (CAO *et al.*, 2011; DOBRETSOV; ABED; TEPLITSKI, 2013; MALAEB *et al.*, 2013). No entanto, a maioria dos estudos que propõem os métodos biológicos estão focados no controle de bioincrustação em membranas (KÖSE-MUTLU *et al.*, 2019; MA *et al.*, 2018; PICHARDO-ROMERO *et al.*, 2020).

Dentro dos métodos biológicos é interessante destacar alguns conceitos. As bactérias possuem um sistema conhecido como *quorum sensing*, o qual consiste em um mecanismo molecular que proporciona uma comunicação entre células por meio da troca de compostos, os chamados auto indutores (exemplo, lactonas de acil-homoserina), permitindo que as bactérias possam monitorar sua densidade populacional no ambiente local e regular seu comportamento de forma coletiva (como induzir a formação, o amadurecimento e a dispersão de um biofilme). O *quorum quenching* é um mecanismo capaz de interromper essa comunicação bacteriana pela inibição dos auto indutores com a secreção de enzimas (exemplo, acilases e lactonases) que levam à clivagem desses compostos (BLANCHET *et al.*, 2017; REHMAN; LEIKNES, 2018; SOLANO; ECHEVERZ; LASA, 2014). Por sua vez, bacteriófagos são seres acelulares pertencentes ao grupo dos vírus que infectam especificamente bactérias podendo levar a morte por meio da lise celular (ŁUSIAK-SZELACHOWSKA; WEBER-DABROWSKA; GÓRSKI, 2020; PAPAANNI *et al.*, 2020).

A seguir serão detalhadas as principais estratégias para reduzir a formação de biofilme em superfícies, priorizando os métodos químicos e físicos, que são as principais técnicas investigadas em sistemas de resfriamento e que são alvo de estudo neste trabalho.

### 2.3.1. Biocidas

Biocidas são substâncias compostas por um ou mais agentes ativos capazes de reduzir ou anular a atividade metabólica de um microrganismo (EGUÍA *et al.*, 2008), por meio de ataques aos componentes celulares (parede celular, membrana citoplasmática, citoplasma), promovendo estresse aos microrganismos (VEIGA, 2010). A ação e a eficácia do biocida depende de diversos fatores como o tipo, a concentração utilizada, pH do fluido, tempo de exposição, espécie e quantidade de microrganismo presente no meio (SRIYUTHA MURTHY *et al.*, 2004).

Os biocidas podem ser classificados como oxidantes, quando degradam a matéria orgânica da célula (destrói as estruturas vitais da célula), e não oxidantes, os quais atacam alvos particulares dentro da célula, ou seja, são substâncias químicas que apresentam mecanismo de ação específico para cada tipo de microrganismo (EGUÍA *et al.*, 2008; TRUEBA; GARCÍA; OTERO, 2014; VEIGA, 2010).

#### 2.3.1.1. Biocidas oxidativos

Os principais biocidas oxidativos são os clorados (hipoclorito de sódio e dióxido de cloro), o peróxido de hidrogênio e o ozônio. Os compostos clorados são tradicionalmente utilizados na indústria devido ao seu custo-benefício, sendo um produto econômico de comprovada eficácia quanto a sua ação *antifouling* (EGUÍA *et al.*, 2008).

Dentre os compostos clorados ativos, o hipoclorito de sódio (NaClO) é o desinfetante usado na maioria dos sistemas de refrigeração e tratamento de água potável (EGUÍA *et al.*, 2007). A ação biocida do NaClO é baseada na formação do ácido hipocloroso (HOCl), um agente oxidativo poderoso, que se difunde pela parede celular do microrganismo reagindo com as proteínas, desativando enzimas (EGUÍA *et al.*, 2007; TACHIKAWA *et al.*, 2005).

Apesar de apresentarem diversas vantagens, o uso de compostos derivados de cloro (com exceção do dióxido de cloro) em plantas industriais apresenta problemas, o seu uso pode gerar impacto ecológico relacionado ao cloro residual descarregado no meio. Além disso, na presença de matéria orgânica, estes compostos podem reagir formando compostos organoclorados, os quais podem

produzir subprodutos como os clorofenóis, que são considerados tóxicos e cancerígenos. Desta forma, estudos voltados para encontrar novos compostos que não agridam o meio ambiente têm sido conduzidos, utilizando os chamados biocidas ambientalmente limpos, como o dióxido de cloro, peróxido de hidrogênio e ozônio (BOTT, 1998; EGUÍA *et al.*, 2000; TRUEBA; GARCÍA; OTERO, 2014).

O dióxido de cloro ( $\text{ClO}_2$ ), diferentemente de outros compostos clorados, não hidrolisa em meio aquoso, permanecendo como gás dissolvido em água, sem formação de ácido hipocloroso. Assim, sua ação biocida ocorre por oxidação associada exclusivamente à sua molécula (AL-BLOUSHI *et al.*, 2018a; SIMON *et al.*, 2014).

O peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) é um composto com alto poder oxidativo, mas baixa ação biocida quando exposto a alta carga microbiana. Por isso, normalmente é combinado com outros métodos que possam potencializar a sua ação. Sua atuação como biocida está ligada à produção de radicais hidroxilas: radicais livres que atacam componentes celulares essenciais, como proteínas, levando à morte celular (CLOETE; JACOBS; BROZEL, 1998; LINLEY *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2016, 2017).

Considerado um oxidante poderoso, o ozônio ( $\text{O}_3$ ) também possui ação biocida. Visto como um composto seguro em relação ao manuseio e ao meio ambiente, o  $\text{O}_3$  é dissolvido rapidamente em água sem produção de subprodutos orgânicos halogenados (AL-BLOUSHI *et al.*, 2017). Sua principal desvantagem é a instabilidade; por apresentar um tempo de meia vida relativamente baixo, há dificuldades em garantir o seu contato em todas as áreas envolvidas no sistema (AL-BLOUSHI *et al.*, 2017, 2018a; CLOETE; JACOBS; BROZEL, 1998; YU; ZHANG; GRAHAM, 2017).

Os biocidas ambientalmente limpos apresentam como desvantagem, quando aplicados em escala industrial, o seu custo-benefício, uma vez que envolvem valores mais elevados para sua produção. Já entre as principais vantagens destaca-se a não toxicidade do ambiente exposto a sua ação, já que os subprodutos gerados a partir deles não são agressivos aos seres vivos presentes no meio aquoso, como  $\text{H}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$  (EGUÍA *et al.*, 2000). Uma compilação dos estudos realizados com biocidas oxidativos como estratégia antibioincrustante em diferentes processos industriais são apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Estudos do uso de biocidas oxidativos com foco na redução de bioincrustações em equipamentos de processo.

<b>Microrganismo</b>	<b>Biocida</b>	<b>Concentração (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Redução</b>	<b>Referência</b>
Consórcio	NaClO ClO <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,1 e 0,4 (equivalentes em Cl <sub>2</sub> )	Para 0,1 mg.L <sup>-1</sup> : 70% (NaClO), 50% (ClO <sub>2</sub> ) e 80% (O <sub>3</sub> ) Para 0,4 mg.L <sup>-1</sup> : todos 97%	Al-Bloushi et al. (2018)
Consórcio	NaClO ClO <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	2000 (NaClO) 9% HCl + 7,5 % NaClO <sub>2</sub> (ClO <sub>2</sub> ) 1,5 g.Nm <sup>-3</sup> (O <sub>3</sub> )	Redução de 80% com NaClO, 90% com ClO <sub>2</sub> e 97% com O <sub>3</sub>	Al-Bloushi et al. (2017)
<i>Amphibalanus reticulatus</i>	ClO <sub>2</sub>	0,1, 0,2 e 0,5	Maior concentração maior a redução 0,5 mg.L <sup>-1</sup> inibiu 90% do crescimento	Venkatnarayanan et al. (2017)
Consórcio	NaClO ClO <sub>2</sub>	1 (NaClO) 0,2 e 0,4 (ClO <sub>2</sub> )	Nível de ATP reduziu 76% para todos, Número de células reduziu 90% (NaClO) e 20%(ClO <sub>2</sub> )	Simon et al. (2014)
<i>Bacillus pumilus</i> e <i>Planomicrobium flavidum</i>	NaClO O <sub>3</sub>	0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 1,5, e 1,8	Com 0,5 mg.L <sup>-1</sup> de O <sub>3</sub> inativou 99,9% das células e NaClO 90%	Swaraj et al. (2013)
Consórcio	Cl <sub>2</sub> ClO <sub>2</sub>	0,2	Redução de 99% (Cl <sub>2</sub> ) e 99,9% (ClO <sub>2</sub> )	Rand et al. (2007)
<i>Cordylophora lacustris</i>	Cl <sub>2</sub>	0,10, 0,20, 0,30, 0,40, 0,50, 0,75 e 1,0	Redução velocidade de crescimento de 23% (0,10 mg.L <sup>-1</sup> ) a 100% (1 mg.L <sup>-1</sup> )	Rajagopal et al. (2002)
Consórcio	NaClO	0,5 e 1,0	Redução de 42% (0,5 mg.L <sup>-1</sup> ) e 55% (1,0 mg.L <sup>-1</sup> )	Eguía et al. (1998)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	O <sub>3</sub>	0,8	Redução de 87% (19 dias) e 33% (28 dias)	Kaur; Bott; Leadbeater (1992)
Consórcio	Cl <sub>2</sub> ClO <sub>2</sub>	0,15 e 1,0	Redução de 90% para todos os casos	Mayack et al. (1984)

NaClO: hipoclorito de sódio

ClO<sub>2</sub>: dióxido de cloroO<sub>3</sub>: ozônioCl<sub>2</sub>: cloro

De modo geral, é possível observar na Tabela 1 que, independentemente do biocida e concentração utilizada, todos apresentaram resultados positivos na redução de biofilmes aderidos em superfície quando comparados a amostras controle. Além disso, percebe-se que os trabalhos estão voltados a encontrar compostos que substituam o hipoclorito de sódio por outros com ação biocida semelhante e que sejam ambientalmente limpos. Destaca-se também que as estratégias utilizadas nas pesquisas não são exclusivamente testar compostos alternativos, mas também variar parâmetros operacionais, como concentração, tempo de exposição, temperatura e espécie de microrganismo alvo.

### 2.3.1.2. *Biocidas não-oxidativos*

Os biocidas não-oxidativos são comumente utilizados de modo alternado com outros compostos para evitar que o microrganismo crie resistência à ação do biocida. Dentro dessa classe os mais importantes são: isotiazolinas, compostos quaternários de amônio, glutaraldeído, sulfato de tetrakis(hidroximetil)fosfônio (THPS) e dibromo nitrilo propionamida (DBNPA) (CLOETE; JACOBS; BROZEL, 1998; JIA *et al.*, 2017; MILLER; ANNE KOEBEL, 2006).

A ação biocida das isotiazolinas está relacionada a sua capacidade de conduzir ataques nucleofílicos em enzimas contendo grupo tiol (- SH), prejudicando as funções celulares (CÓLLIER *et al.*, 1990; TANG *et al.*, 2013).

Os compostos quaternários de amônio (detergentes catiônicos) interagem com os fosfolipídios das membranas citoplasmáticas. Devido à sua carga superficial positiva, estes compostos se aderem na parede celular (carregada negativamente), criando tensões na parede, causando a ruptura da membrana celular (BAUDRION; PÉRICHAUD; VACELET, 2000; LIU *et al.*, 2011a; MCDONNELL; RUSSELL, 1999).

O glutaraldeído apresenta ação desinfetante devido à capacidade de reticulação, que desestabiliza os grupos aminas presentes na membrana celular de modo que a permeabilidade é alterada (impede o transporte de nutrientes para a célula), ocasionando a morte celular (LAOPAIBOON; PHUKOETPHIM; LAOPAIBOON, 2006; WEN *et al.*, 2010).

O THPS possui propriedade antibacteriana especialmente contra bactérias redutoras de sulfato. Quando em solução aquosa, o THPS se dissocia rapidamente formando a trihidroximetilfosfina (THP), fosfina biologicamente ativa que atua como um agente redutor, quebrando as ligações dissulfeto nas proteínas e enzimas celulares (MARQUES; SHIROMA; DE JESUS, 2015; XU; LI; GU, 2014).

A DBNPA é um biocida de rápida ação muito utilizado na indústria de papel para controlar a incrustação biológica em máquinas de papel. A DBNPA tem uma natureza eletrofílica, o que favorece a reação com o grupo tiol presente nas proteínas citoplasmáticas, inativando-as (HUANG *et al.*, 2009; SHIROMA; MARQUES; JESUS, 2015).

Um resumo de alguns estudos encontrados na literatura sobre o uso de biocidas não-oxidativos é mostrado na Tabela 2, que lista o objetivo do estudo, biocida e concentrações testadas, e redução do biofilme formado.

**Tabela 2.** Estudos do uso de biocidas não-oxidativos com foco na redução de bioincrustações em equipamentos de processo.

Biocida	Objetivo	Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	Redução	Referência
Isotiazolina THPS	Melhorar a ação dos biocidas com adição de D-aminoácidos	5	Ação dos biocidas foi melhorada	Jia et al. (2017)
CQA	Avaliar a eficácia de dois CQA's na redução de biofilme	1,5 e 0,5	Redução de 96%do biofilme	Trueba et al. (2013)
THPS + d-tirosina	Avaliar o efeito do THPS+d-tirosina na prevenção e redução de biofilme	50+1	Redução de 99% do biofilme	Xu et al. (2012)
Glutaraldeído	Avaliar o impacto do tratamento com glutaraldeído no biofilme e células planctônicas	10	Redução de células planctônicas e biofilme	Liu et al. (2011b)
CQA DBNPA	Avaliar a eficácia de biocidas na redução do biofilme	1 a 8	Inibiram a formação de biofilme	Huang et al. (2009)

THPS: sulfato de tetrakis(hidroximetil)fosfônio

CQA: compostos quaternários de amônio

DBNPA: dibromo nitrilo propionamida

### 2.3.2. Métodos físicos

Em processos industriais, o uso de biocidas é o mais comum para combater o crescimento de biofilme na superfície de equipamentos (FLEMMING, 2020). Entretanto, o hipoclorito de sódio, apesar de sua eficácia em baixa concentração e baixo custo, gera subprodutos organoclorados tóxicos ao meio ambiente e pode causar danos ao material da superfície do equipamento. Por outro lado, os biocidas ambientalmente limpos, apontados como alternativa ao cloro, apresentam um custo elevado. Desta forma, métodos físicos se tornaram alvo de pesquisas e são alternativas ao tratamento antibioincrustação de águas de resfriamento industriais, tendo como principal vantagem a não regulamentação do descarte de efluente uma vez que são inofensivos ao meio ambiente (BOTT, 2001; TRUEBA *et al.*, 2015; TRUEBA; GARCÍA; OTERO, 2014).

Dentre os métodos físicos existentes, os estudos para redução de biofilme em superfícies são voltados à aplicação de campo elétrico, ultrassom, luz ultravioleta e campo magnético. A Tabela 3 traz um resumo comparativo entre os métodos químicos e físicos, e a Tabela 4 traz uma compilação dos estudos que aplicam esses métodos para o controle do crescimento de biofilme.

**Tabela 3.** Comparação entre os métodos químicos e físicos para controle de crescimento de biofilme em sistemas de resfriamento.

<b>Biocidas</b>	<b>Métodos físicos</b>
Uso consolidado na indústria	Tecnologia emergente
Eficácia comprovada na redução de biofilme	Necessita de mais estudos para comprovar ação <i>antibiofouling</i>
Produto químico adicionado no fluido de resfriamento	Ação na superfície do equipamento, sendo necessário adaptar ou acoplar peças no sistema de resfriamento
Algumas classes podem acelerar a corrosão do metal	Não possuem potencial corrosivo
Produzem resíduos secundários	Não produzem subprodutos
Alguns são nocivos ao meio ambiente devido à produção de subprodutos tóxicos	São inofensivos ao meio ambiente

**Tabela 4.** Estudos do uso de métodos físicos com foco na redução de bioincrustações em equipamentos de processo.

<b>Método</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Conclusão</b>	<b>Referência</b>
Ultrassom	Avaliar o efeito da aplicação de ultrassom seguido da adição de hipoclorito de sódio em água salina na formação de biofilme	Os resultados indicam que o uso de ultrassom junto com o hipoclorito de sódio reduz o tempo de exposição e a dose de cloro necessária para reduzir o biofilme	Haque; Kwon (2018)
Campo elétrico	Avaliar a formação de biofilme de <i>P. aeruginosa</i> em uma superfície de carbono na presença e ausência de campo elétrico com voltagem de 0,9 V	Acredita-se que o campo elétrico aplicado afeta o potencial redox da membrana celular o que inibi o crescimento bacteriano	Pandit et al. (2017)
Luz ultravioleta	Demonstrar o efeito sinérgico entre a luz ultravioleta e o hipoclorito de sódio para reduzir biofilme de <i>Listeria monocytogenes</i> em superfície aço inox	Os resultados indicam que o tratamento combinado (1800 mWs.cm <sup>-2</sup> de UV com 200 mg/L de NaOCl) pode ser viável para uso em superfícies de aço inoxidável em cozinhas industriais, instalações e restaurantes.	Kim; Park; Há (2016)
Campo eletromagnético	Avaliar o efeito do campo eletromagnético de baixa frequência em um circuito alimentado com água de rio	Os resultados mostraram que a aplicação do campo eletromagnético afetou a composição da comunidade planctônica e sésil, reduzindo a formação de biofilme em superfície	Mercier et al. (2016)

NaClO: hipoclorito de sódio

**Continuação Tabela 4.** Estudos do uso de métodos físicos com foco na redução de bioincrustações em equipamentos de processo.

Método	Objetivo	Conclusão	Referência
Ultrassom	Investigar o uso de ultrassom na prevenção do <i>biofouling</i> em trocador de calor durante o processamento de leite	Os resultados indicam que as vibrações na superfície do equipamento dificultam a formação de biofilme	Hotrum et al. (2015)
Campo eletromagnético	Avaliar a ação antibiofouling de um campo eletromagnético aplicado continuamente em água salina utilizada em um trocador de calor	Os resultados indicam que o campo eletromagnético acelera a precipitação do carbonato de cálcio e reduziu a capacidade de adesão do biofilme	Trueba et al. (2015)
Luz ultravioleta	Avaliar a redução do <i>biofouling</i> em um trocador de calor escala piloto usando luz ultravioleta	O tratamento com luz ultravioleta reduziu a resistência à transferência de calor em 55 % quando comparada com a controle	López-Galindo; Casanueva; Nebot (2010)
Campo elétrico	Investigar a ação do campo elétrico em biofilme de <i>P. aeruginosa</i> em superfície metálica	Ao aplicar uma corrente anódica na superfície, as bactérias que permaneceram aderidas ficaram inativas com o passar do tempo	Hong et al. (2008)

O campo elétrico possui a capacidade de inativar microrganismos e há muitos anos é alvo de pesquisas como um método de esterilização em equipamentos hospitalares e desinfecção de alimentos, obtendo-se resultados promissores (DONLAN; COSTERTON, 2002; HARRISON; BARBOSA-CÁNOVAS; SWANSON, 1997; HÜLSHEGER; POTEI; NIEMANN, 1983; MARX; MOODY; BERMÚDEZ-AGUIRRE, 2011; SALE; HAMILTON, 1967). Por estas características, o campo elétrico passou a ser considerado uma alternativa na prevenção e controle da bioincrustação em superfícies (ABOU-GHAZALA; SCHOENBACH, 2000; GAW *et al.*, 2017; KANG *et al.*, 2008; PIYADASA *et al.*, 2017b; THAMARAISELVAN *et al.*, 2018; VAN DER BORDEN *et al.*, 2004).

Para a prevenção de biofilmes, normalmente, 20 a 80 kV.cm<sup>-1</sup> de força elétrica é aplicada para se ter a inativação dos microrganismos. Como mecanismo de ação, propõe-se que a aplicação de campos elétricos em células causa um acúmulo de cargas elétricas na membrana celular, causando uma eletroporação (abertura de poros) induzida pela tensão na membrana, o que gera alterações no fluxo de íons/nutrientes. Dependendo da densidade de fluxo elétrico aplicado e do tempo de contato essa formação de poros leva a danos irreversíveis e morte celular. Assim, o nível de inativação microbiana e por consequência a redução na formação de biofilmes, depende de parâmetros do processo, como densidade de fluxo elétrico e tempo de contato (KIM *et al.*, 2011; PIYADASA *et al.*, 2017b; SCHOENBACH; ILL; FOX, 1996).

Alguns estudos também propõem o uso de ultrassom como estratégia promissora no combate à bioincrustação em superfícies (AL-JUBOORI; YUSAF; ARAVINTHAN, 2012; BOTT, 2000, 2001; BOTT; TIANQING, 2004; BROEKMAN *et al.*, 2010; HOTRUM *et al.*, 2015; MOTT *et al.*, 1998; MUTHUKUMARAN *et al.*, 2005). A tecnologia de ultrassom possui potencial para deter a deposição de biofilme devido a sua capacidade de gerar turbulência no sistema (vibração) (BOTT, 2000; BOTT; TIANQING, 2004; BROEKMAN *et al.*, 2010). Os principais fenômenos físicos decorrentes da aplicação do ultrassom em líquidos são: (i) o *streaming* acústico, efeito mecânico, que pode levar a uma diminuição na espessura da camada limite do fluido melhorando a transferência de calor e massa, e (ii) a cavitação acústica, formação de bolhas que podem induzir a micro transmissão (melhora na transferência de calor e massa) e podem gerar regiões pontuais de aumento de temperatura e pressão, passível de inativar microrganismos. Entretanto, o mecanismo de ação das ondas

ultrassônicas para impedir a formação de biofilme ainda não está claro e pesquisas precisam ser desenvolvidas para melhor entendimento (HOTRUM *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2017).

A luz ultravioleta (UV) também demonstra poder de inativação de microrganismos (CLOETE; BRÖZEL, 1992; HARRIS *et al.*, 1987). O espectro de luz UV consiste em quatro regiões com diferentes comprimentos de onda: vácuo UV (100-200 nm), UV-C (200-280 nm), UV-B (280-315 nm) e UV-A (315-400 nm), sendo que o UV-C e UV-B são os com maior potencial de inativação de células microbianas (AL-JUBOORI; YUSAF, 2012; KIM; PARK; HA, 2016; LUI *et al.*, 2014; PALEOLOGOU *et al.*, 2007; SCHWARTZ; HOFFMANN; OBST, 2003).

Estudo realizado em uma planta piloto de trocador de calor apresentou redução de biofilme depositado na superfície após o tratamento com UV (LÓPEZ-GALINDO; CASANUEVA; NEBOT, 2010). Em tubos simulando o transporte de água a utilização de UV reduziu o número de microrganismos viáveis e a formação de biofilme, e quando combinada com hipoclorito de sódio foi mais eficaz (RAND *et al.*, 2007). Estes estudos indicam a possibilidade da utilização da luz ultravioleta como método para controle de bioincrustação.

Por fim, a aplicação de campo magnético no controle de crescimento microbiano (PIATTI *et al.*, 2002; ZAIDI *et al.*, 2014) é também reportada como um tratamento antibioincrustação vantajoso, pois quando o campo é aplicado, dependendo da sua densidade de fluxo magnético, este pode afetar o crescimento e a adesão das células microbianas (LIPUS; AČKO; HAMLER, 2011; MERCIER *et al.*, 2016; XIAOKAI, 2008). Estudos realizados em trocadores de calor tubulares resfriados pela água do mar e em corpos de prova de aço inox expostos à água de rio demonstram queda do crescimento de biofilme na superfície quando aplicado campo eletromagnético pulsado (MERCIER *et al.*, 2016; TRUEBA *et al.*, 2015; TRUEBA; GARCÍA; OTERO, 2014).

O campo magnético como estratégia antibioincrustação é o foco desse trabalho, e será detalhado nos tópicos a seguir. Busca-se destacar alguns conceitos base, e trazer uma descrição dos trabalhos disponíveis na literatura que propõem seu uso como estratégia antibioincrustação e por fim, considerações a respeito do estado da arte.

### 2.3.3. Campo magnético

O campo magnético é uma região do espaço ao redor de um ímã devido à movimentação de cargas, gerando uma força magnética de atração ou repulsão. Todo material (gasoso, líquido ou sólido) possui uma característica magnética, ou seja, o magnetismo é uma propriedade do material e tem sua origem na estrutura molecular (HALLIDAY; RESNICK; WALKER, 2016).

De modo geral, os materiais podem ser classificados em três tipos de acordo com a sua magnetização, sendo eles: diamagnéticos, paramagnéticos e ferromagnéticos. Os materiais diamagnéticos apresentam magnetização negativa (contrária ao campo magnético externo), existe apenas na presença de um campo magnético externo e sua força é relativamente fraca. São exemplos desse tipo de material água, madeira, plástico e alguns metais como mercúrio, ouro e prata (HALLIDAY; RESNICK; WALKER, 2016).

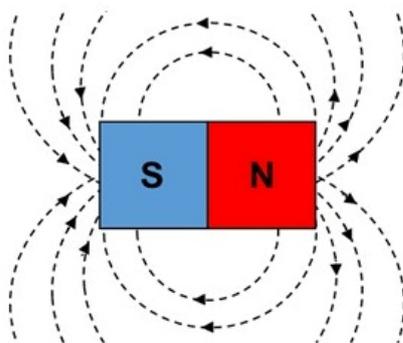
Os materiais paramagnéticos apresentam alinhamento dos momentos angulares quando estão na presença de um campo magnético e são atraídos por esse campo externo. A magnetização nesse tipo de material também existe apenas na presença de um campo magnético externo e são exemplos o alumínio, o sódio, o cálcio e o magnésio. Por sua vez, os ferromagnéticos são materiais com memória magnética, ou seja, se submetidos a um campo externo apresentam alinhamento dos momentos angulares e se comportam como ímãs e essa característica permanece mesmo após a remoção do campo magnético externo. Como exemplos desse tipo de material tem-se o ferro, o níquel e o cobalto (HALLIDAY; RESNICK; WALKER, 2016).

Um ímã permanente é uma peça composta por uma liga de minerais com capacidade de manter o magnetismo mesmo após a retirada de um campo magnético externo (material ferromagnético). A sua composição pode ser de alumínio, níquel, cobalto, estrôncio, ferro, bário, samário e neodímio, e a escolha do material depende da densidade de fluxo magnético desejada e do tipo de aplicação. Nesse sentido, os ímãs de neodímio são os mais poderosos, apresentando elevada força magnética com tamanho e massa reduzidos (HALLIDAY; RESNICK; WALKER, 2016).

O campo magnético é uma grandeza vetorial, ou seja, possui intensidade, direção e sentido, e por convenção é representado por linhas que saem do polo norte e entram no polo sul (Figura 4). Essas linhas são conhecidas como linhas de indução, são sempre fechadas, nunca se cruzam e quanto mais próximas estiverem, maior será

a densidade de fluxo magnético daquela região. Os ímãs sempre são formados por dois polos (norte e sul) que não podem ser separados, por isso são conhecidos como dipolos (HALLIDAY; RESNICK; WALKER, 2016).

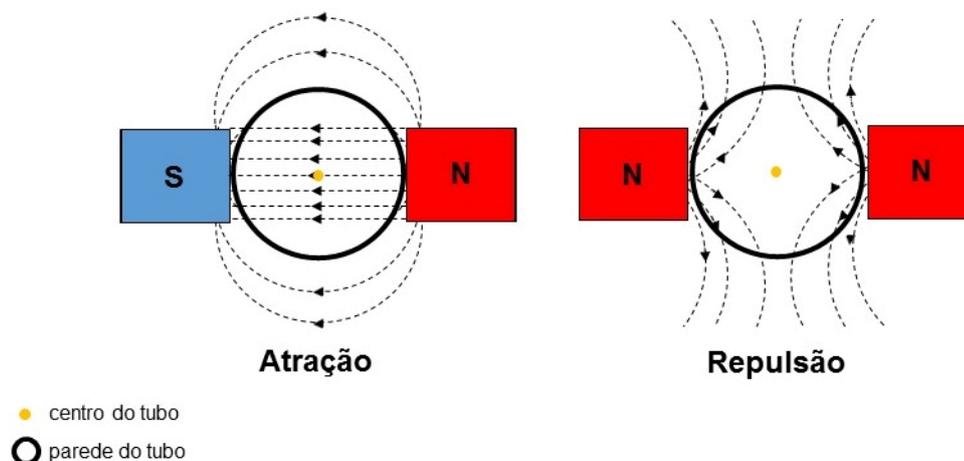
**Figura 4.** Representação das linhas de indução magnética



Fonte: Autor.

Devido à característica das linhas de indução, quando se aproxima dois polos iguais eles se repelem, e ao se aproximar dois polos diferentes eles se atraem. Dessa forma, ao acoplar duas barras magnéticas em um tubo há dois tipos comportamentos das linhas de indução magnética através da parede do tubo. Como mostra a Figura 5, se acoplar os ímãs no sentido de atração (polos diferentes) o fluxo magnético irá passar por todo o tubo (inclusive no centro), e se forem acoplados no sentido de repulsão (polos iguais) não haverá linhas de indução no centro (densidade de fluxo magnética nula) e a passagem permanece concentrada nas regiões próxima a parede do tubo. Vale lembrar que o comportamento das linhas de indução também afeta a densidade de fluxo magnético entre dois ímãs, ou seja, quanto menor a distância entre dois ímãs em atração maior será a densidade de fluxo e quanto maior a distância menor será a força (HALLIDAY; RESNICK; WALKER, 2016).

**Figura 5.** Esquema do comportamento das linhas de indução em um tubo colocado entre duas barras magnéticas.



Fonte: Adaptado de Lana (2013).

### 2.3.3.1. Campo magnético como estratégia antibioincrustação em sistemas de resfriamento

Segundo Zaidi *et al.* (2014), a primeira aplicação comercial de campo magnético para tratamento de água foi patenteada na Bélgica em 1958 por Theo Vemeiren. Porém, apenas 3 décadas depois surgiram as primeiras evidências da possível aplicação do campo magnético para o tratamento de águas em escala industrial. Segundo os autores, pesquisadores russos observaram que tubulações de uma caldeira apresentavam depósitos minerais aderidos em sua superfície reduzindo a eficiência do processo, em contrapartida às paredes de tubulações por onde circulava água magnetizada, que não apresentavam esses depósitos. Essas observações estão de acordo com vários estudos da literatura que usam o campo magnético na redução da incrustação salina em superfícies, consolidando o uso desse método no tratamento de águas industriais como estratégia anti-incrustação (HAN *et al.*, 2018; IMBROGNO *et al.*, 2018; LIPUS *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2021; PIYADASA *et al.*, 2017a; SILVA *et al.*, 2019; XU *et al.*, 2018; ZHAO; LIU; ZHAO, 2014).

Porém, poucos trabalhos têm se dedicado ao uso do campo magnético para prevenção de bioincrustação em sistemas de resfriamento. O uso dessa tecnologia é atraente, não apenas pela comprovada redução de incrustações salinas em tubulações de sistemas de resfriamento, mas também porque trabalhos já comprovaram que campos magnéticos podem alterar o crescimento de bactérias. Em

geral, estes estudos mostram que diferentes bactérias possuem diferentes níveis de susceptibilidade ao campo magnético. Quando esse nível é excedido, elas podem morrer ou ter seu crescimento reduzido (CELLINI *et al.*, 2008; GIORGI; MARCANTONIO; BERSANI, 2011; PIATTI *et al.*, 2002; RE; AGOSTINI; GIORGI, 2004; ZAIDI *et al.*, 2014). Dos trabalhos disponíveis na literatura sobre controle de crescimento de biofilme em superfície de sistema de resfriamento, utilizando *Web of Science* como base de dados, apenas 3% são referentes ao uso de campo magnético, os quais serão detalhados a seguir.

Trueba; García; Otero (2014) realizaram um estudo com objetivo de reduzir a quantidade de biofilme aderido em tubos de trocador de calor resfriados com água do mar através da aplicação de campo eletromagnético pulsado e recuperar a eficiência do processo de troca térmica. Para tal, o trabalho foi dividido em três etapas: (i) crescimento de biofilme nas tubulações da unidade piloto, (ii) eliminar o biofilme crescido utilizando campo eletromagnético pulsado com densidade de fluxo magnético de 15 mT, e (iii) avaliação da influência do campo nas propriedades físico-químicas da água do mar. Como resultados, observaram que o campo eletromagnético precipita íons dissolvidos na água, além disso altera a ligação intermolecular das SPE, causando o desprendimento do biofilme da superfície do tubo do trocador de calor.

Trueba *et al.* (2015) também investigaram o crescimento de biofilme em tubulações de um sistema em escala piloto de trocador de calor, resfriadas com água do mar, expostas continuamente a um campo eletromagnético pulsado com densidade de fluxo magnético de 15 mT. Os resultados mostraram que o campo eletromagnético acelera a nucleação dos íons de cálcio e a precipitação do carbonato de cálcio, e por consequência reduz a adesão de biofilme nas superfícies das tubulações.

Mercier *et al.* (2016) avaliaram o efeito do campo eletromagnético pulsado com densidade de fluxo magnético de 1 a 10 mT em um circuito de circulação de água em escala bancada alimentado com água de rio. Como resultado, observou-se que o emprego do campo reduziu a quantidade de biofilme e afetou a composição da comunidade planctônica e sésil. Segundo os autores, provavelmente o campo magnético afeta a solubilidade de partículas e hidratação das células microbianas afetando a formação de biofilme em superfícies metálicas.

Por fim, García e Trueba (2018) investigaram a influência do regime de escoamento turbulento em tubulações de um trocador de calor expostas também a

um campo eletromagnético pulsado com densidade de fluxo magnético de 15 mT. Os resultados mostraram que as tubulações expostas ao campo magnético e escoamento turbulento com maiores números de Reynolds tiveram menor adesão de biofilme nas superfícies quando comparado com o controle (sem aplicação de campo magnético).

### *2.3.3.2. Considerações a respeito do estado da arte*

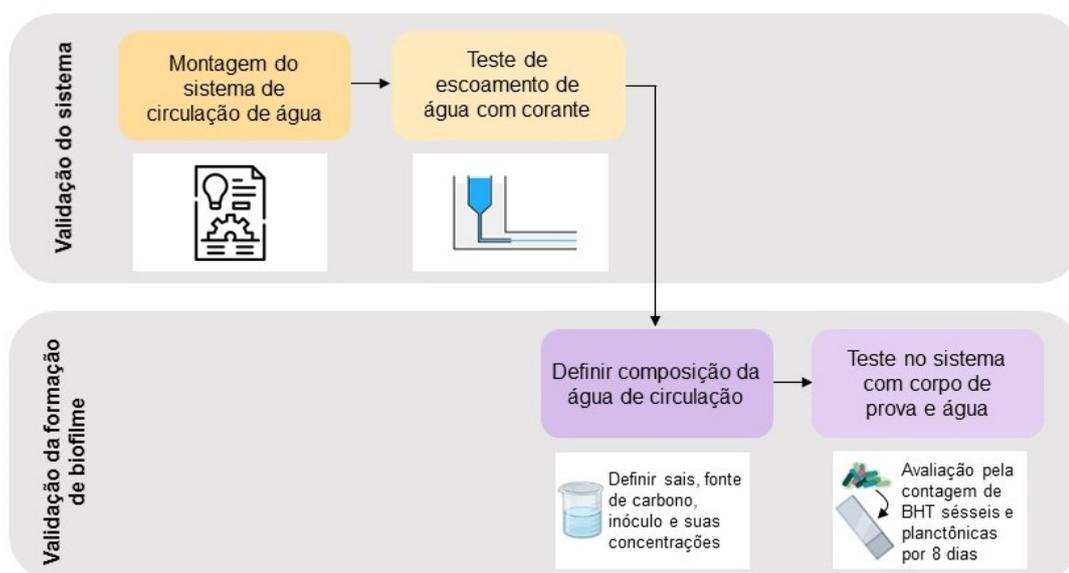
Os estudos mostram resultados promissores e o potencial do campo magnético como estratégia antibioincrustação na indústria. Entretanto, não foi encontrado nenhum estudo referente à sinergia dessa tecnologia com biocidas ou uso de ímãs permanentes, o qual tem vantagem sob eletroímãs por não ter a necessidade de instalações elétricas para gerar a corrente que alimenta a bobina, além do aquecimento do dispositivo, que algumas vezes necessita da instalação de outros dispositivos para arrefecimento do sistema.

Diante do exposto, estudos científicos são necessários para melhor entendimento e comprovação da ação do campo magnético na redução de biofilme em superfícies, confirmando ser uma alternativa limpa e eficaz ao uso de biocidas, e tornando viável seu uso em escala industrial. Assim, é fundamental investigar como o uso de campo magnético permanente afeta o desenvolvimento de biofilmes, avaliando variações em relação ao campo magnético e o efeito sinérgico com biocidas. Essas informações serão úteis para a potencial aplicação desta tecnologia em sistemas industriais de troca térmica.

### 3. VALIDAÇÃO DO SISTEMA DE CIRCULAÇÃO DE ÁGUA CONSTRUÍDO E DA FORMAÇÃO DE BIOFILME EM CORPOS DE PROVA

Este capítulo refere-se à primeira etapa do trabalho, a qual envolveu os testes preliminares para validação do funcionamento dos sistemas de circulação de água construídos e da formação do biofilme em corpos de provas acoplados nesses sistemas e expostos à água de circulação sintética. Esta etapa atende aos seguintes objetivos específicos da presente tese, de acordo com a seção 1.2: projetar, construir e validar o funcionamento de dois sistemas de circulação de água de bancada idênticos para corpos de prova planos, sendo um para operação sem e outro com ímãs permanentes acoplados; e validar a formação de biofilme nos corpos de prova de vidro e aço acoplados nos sistemas de circulação de água utilizando água de circulação sintética. A Figura 6 apresenta um fluxograma das atividades realizadas nesse capítulo e na sequência são apresentados os materiais e métodos e resultados obtidos nessa etapa do trabalho.

**Figura 6.** Fluxograma das atividades realizadas referente aos testes apresentados no Capítulo 3 desta tese.



BHT: bactérias heterotróficas totais

### 3.1. MATERIAIS E MÉTODOS

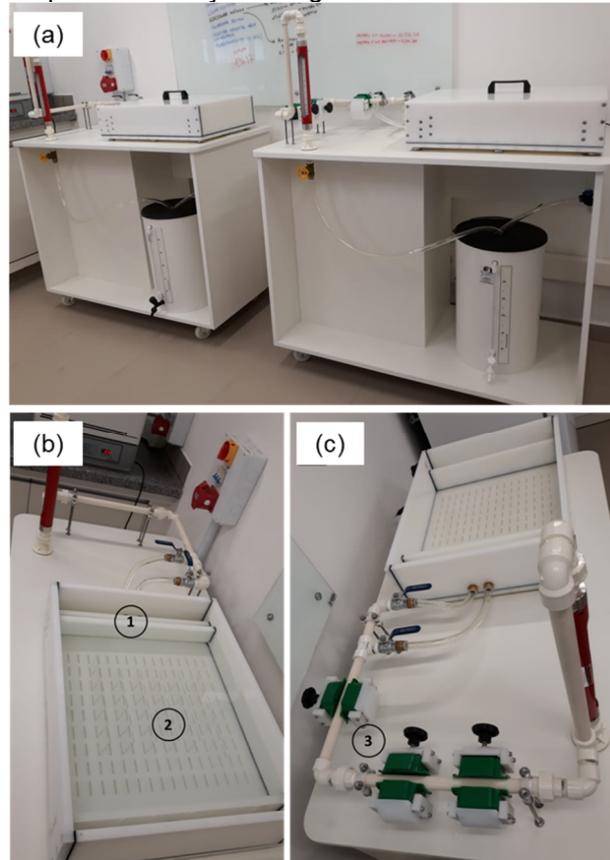
#### 3.1.1. Componentes dos sistemas de circulação de água

Com o objetivo de realizar os ensaios que simulam o crescimento de biofilme em superfície e avaliar o efeito do campo magnético foi necessário projetar e montar dois sistemas de circulação de água semifechado em escala de bancada, sendo que um funciona na ausência de ímãs (sistema controle) e o outro possui ímãs acoplados na tubulação (sistema magnético). O projeto foi baseado no circuito de água utilizado no trabalho de Mercier *et al.* (2016). O resultado é apresentado na Figura 7, na qual a Figura 7a mostra os dois sistemas de circulação de água de escala bancada montados e a Figura 7b e 7c mostra a vista superior do sistema controle e magnético, respectivamente.

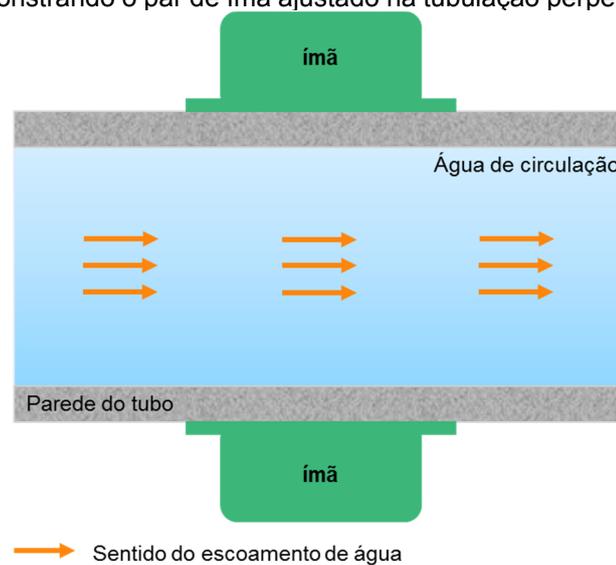
Os dois sistemas possuem a mesma configuração e são compostos por um reservatório de água com capacidade de 35 L, uma bomba submersa para circulação de água com capacidade máxima de vazão de 200 L/h (Sunsun HJ 1541), um rotâmetro, um tanque de circulação de água de polipropileno com capacidade interna de 13 L capaz de acondicionar 144 corpos de prova, uma resistência com termopar para manter constante a temperatura da água de circulação (submersa no reservatório de água), um oxigenador (Sunsun HP 1116) com duas saídas em cada tanque de corpos de prova com pedras de oxigenação acopladas, além de tubos, válvulas e conexões.

No sistema magnético, a tubulação de entrada do tanque de circulação de água (Figura 7c, número 3) foi exposta ao campo magnético permanente, gerado por 3 pares de ímãs permanentes de neodímio-ferro-boro ( $\text{Nd}_2\text{Fe}_{14}\text{B}$ ), ajustados na tubulação de polipropileno a uma distância de 30 cm da entrada do tanque, perpendicular ao escoamento de água (Figura 8).

**Figura 7.** (a) Sistemas de circulação de água em escala de bancada para avaliação do efeito do campo magnético sobre o crescimento de biofilme em corpos de prova, (b) vista superior do sistema controle, e (c) vista superior do sistema magnético, sendo que (1) tanque de polietileno de alta densidade, (2) espaço onde os corpos de prova são colocados e (3) conjuntos de ímãs permanentes acoplados à tubulação de entrada ao tanque de circulação de água.



**Figura 8.** Esquema demonstrando o par de ímã ajustado na tubulação perpendicular ao fluxo de água.



Fonte: Autor.

### 3.1.2. Corpos de prova

Para simular as superfícies de equipamentos expostas à água de resfriamento foram utilizados corpos de prova acondicionados no interior do tanque de circulação de água (Figura 7b, número 2). Os corpos de prova escolhidos foram lâminas de vidro com dimensões de 76 x 26 x 1,3 mm. As superfícies de equipamentos de sistema de resfriamento são geralmente metálicas, mas o vidro foi selecionado por ser um material inerte que não sofre corrosão, o que torna possível avaliar exclusivamente o efeito do campo magnético no crescimento de biofilme sobre a superfície. Tal escolha foi baseada no trabalho de Santos *et al.* (2015), que indicou uma adesão de biofilme em superfície de vidro similar à da observada em aço inoxidável, e que foi confirmada no presente trabalho com a realização de testes tanto com corpos de prova de vidro quanto com corpos de prova de inox 304 polido no sistema controle e no sistema magnético expostos a diferentes densidades magnéticas (0,45; 0,23; 0,1 e 0,05 T e na posição de repulsão). Os testes tiveram duração de 45 dias, e a avaliação foi realizada pela comparação da quantidade de bactérias heterotróficas totais (BHT) sésseis entre os dois materiais para cada sistema nos dias 14, 28 e 43 de experimento. Os resultados obtidos nessa etapa são apresentados na Figura 2A do Apêndice. No início de cada ensaio, os corpos de prova foram previamente lavados com detergente alcalino, enxaguados com água deionizada e imersos em solução aquosa de etanol 70% (v/v) por 15 min, secos em estufa a 50 °C por 1 h, para então serem colocados no tanque de circulação de água para realização dos testes.

### 3.1.3. Validação do escoamento dos sistemas de circulação de água

A configuração dos sistemas foi projetada com ênfase nos tanques de circulação de água (Figura 7b, número 1) de maneira que os corpos de prova permaneçam totalmente imersos, paralelos ao escoamento da água de circulação e sem pontos de obstrução, considerando que o escoamento de água se mantivesse homogêneo por toda a extensão do tanque (evitar pontos mortos, sem escoamento). Além disso, o sistema foi construído pensando em manter um escoamento laminar para favorecer o crescimento de biofilme na superfície, uma vez que o trabalho

realizado por García e Trueba (2018) sugeriu que há um aumento da espessura do biofilme formado com um menor número de Reynolds ( $N_{Re}$ ).

Para validar a execução do projeto e funcionamento dos sistemas montados de acordo com as necessidades operacionais citadas, um teste de escoamento utilizando uma solução de corante alimentício a uma vazão constante de  $50 \text{ L h}^{-1}$  foi realizado. Para tal, em ambos os sistemas os reservatórios foram preenchidos com 35 L de água, o corante foi adicionado à água, a bomba foi acionada e a vazão ajustada para  $50 \text{ L h}^{-1}$ . A entrada da solução com corante no tanque de circulação de água foi gravada com uma câmera digital.

#### **3.1.4. Composição da água de circulação**

Nesse trabalho, optou-se por utilizar uma água de circulação sintética, isenta de interferências químicas e físicas externas, mantendo a mesma característica para todos os testes e, assim, ter um melhor controle sobre o processo e facilitar o entendimento do efeito que o ímã pode causar na formação de biofilme. A água foi produzida de modo a ter características similares às de águas de resfriamento de sistemas reais. Assim, sua composição foi baseada no trabalho realizado por Veiga (2010), no qual simula uma composição média característica de água de resfriamento em sistema de circulação aberto.

A água de circulação sintética foi preparada a partir da adição de sais na água deionizada (Tabela 5). A matéria orgânica (fonte de carbono para microrganismos) adicionada foi o diesel estabilizado com 1% do dispersante dodecil sulfato de sódio (DSS), na concentração de  $160 \text{ mg L}^{-1}$ , uma vez que é comum esse tipo de água apresentar em sua composição óleos lubrificantes e dispersantes. Em relação aos microrganismos, a água foi contaminada com 3 inóculos bacterianos, formando assim uma cultura mista sintética de bactérias, com uma concentração inicial de  $5 \times 10^2 \text{ UFC mL}^{-1}$  de BHT planctônicas.

**Tabela 5.** Composição de sais utilizados no preparo da água de resfriamento sintética.

Sal	Concentração (mg L <sup>-1</sup> )
Cloreto de cálcio (CaCl <sub>2</sub> )	101
Cloreto de magnésio (MgCl <sub>2</sub> )	68
Fosfato dipotássico anidro (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	80
Cloreto de sódio (NaCl)	250

Fonte: Veiga (2010).

Para o preparo da solução de diesel estabilizado com 1% de DSS, primeiramente o DSS foi adicionado em 100 mL de água deionizada, agitado por 10 min a 500 rpm em agitador magnético (IKA® big squid 38 004 00b), então o diesel foi acrescentado e a solução agitada por 15 min a 1200 rpm.

Os 3 inóculos bacterianos utilizados na cultura mista sintética são compostos majoritariamente pelos gêneros *Enterobacteriaceae*, *Proteus*, *Salmonella* e *Vagococcus*. O perfil microbiológico de cada inóculo foi realizado pela empresa Neopropecta (Florianópolis/SC) com o método Diagnóstico Microbiológico Digital (DMD) que utiliza marcadores genéticos para o sequenciamento de RNA. O perfil microbiológico é apresentado na Figura 3A do Apêndice.

Em relação ao preparo do inóculo que compôs essa cultura mista sintética, os seguintes passos foram realizados:

- (i) antes do início de cada ensaio no sistema de circulação, a propagação de cada inóculo foi realizada. Assim, 500 µL de inóculo, previamente cultivado em caldo nutritivo (Kasvi) e congelado em glicerol, foram adicionados em 50 mL de caldo nutritivo (Kasvi) estéril (121 °C por 15 min), e colocados em incubadora (Solab, SL-223) a 37 °C (± 2 °C), 120 rpm por 24 h,
- (ii) após o período de incubação, foi realizado o espalhamento do inóculo em placa petri com meio de cultivo sólido padrão para contagem pelo método descrito em detalhes no item 3.1.6.
- (iii) conhecida a concentração celular após a propagação, o volume necessário de cada inóculo a ser adicionado no sistema foi determinado de modo que a concentração inicial da água sintética (35 L) fosse de 5x10<sup>2</sup> UFC mL<sup>-1</sup> de BHT planctônicas, baseado na contagem típica de uma torre de resfriamento real (VEIGA, 2010). De modo geral, ao fim da propagação, cada inóculo apresentava em média uma concentração de 1x10<sup>9</sup> UFC mL<sup>-1</sup> de BHT.

### 3.1.5. Validação da formação de biofilme nos sistemas de circulação de água

A validação da formação de biofilme nos corpos de prova foi baseada na contagem de bactérias heterotróficas totais (BHT) na água de circulação (BHT planctônicas) e no biofilme (BHT sésseis) aderido ao corpo de prova (método descrito no item 3.1.6).

Os testes foram realizados na ausência dos ímãs, vazão de 50 L h<sup>-1</sup>, pH 7,0 e 30 °C (temperatura média típica de águas de resfriamento), com duração de 8 dias e amostragens diárias. O início de cada ensaio foi convencionado como dia 0 e os testes foram realizados em duplicata.

Os procedimentos para dar início aos experimentos seguiram o protocolo descrito a seguir:

- (i) os corpos de prova, previamente higienizados e secos, foram inseridos no tanque de circulação de água,
- (ii) o reservatório de água foi preenchido com 35 L de água deionizada, em seguida os sais, a solução de diesel estabilizada com 1% de DSS e o inóculo foram adicionados,
- (iii) o oxigenador, a resistência (ajustada para manter a água a 30 °C) e a bomba do sistema foram ligados,
- (iv) a vazão foi ajustada para 50 L/h. Após 2 h de circulação, foram coletadas amostras de água no tanque de circulação e 2 corpos de provas para determinação da quantidade de BHT planctônicas e sésseis, respectivamente, e
- (v) as demais coletas de bactérias planctônicas e sésseis foram realizadas nos dias 1, 2, 3, 4, 7 e 8 de experimento.

### 3.1.6. Determinação do crescimento microbiano

A evolução do crescimento bacteriano na água e do biofilme aderido na superfície dos corpos de prova foi acompanhada pela quantificação de BHT presente em cada amostra utilizando contagem em placas. Os procedimentos utilizados para coleta das amostras e desprendimento do biofilme do corpo de prova foram baseados no trabalho de Santos *et al.* (2015).

Para a determinação das bactérias planctônicas, alíquotas de água foram coletadas em 7 pontos diferentes do tanque de circulação e armazenadas em tubos de ensaio. Para a quantificação das bactérias sésseis, os 2 corpos de prova foram coletados no tanque de circulação e lavados por meio de 3 imersões em solução aquosa salina (0,85% de NaCl), para remover células não aderidas. Após a lavagem, os corpos de prova foram transferidos para tubos de ensaio contendo 45 mL de solução aquosa salina (0,85% de NaCl). Em sequência, para remoção do biofilme aderido nos corpos de prova, os tubos foram devidamente fechados e acondicionados em um banho de ultrassom (40 kHz) por 3 ciclos de 2 min com intervalo de 1 min entre cada ciclo, e então agitados em vórtex por 30 s para homogeneizar a solução. Todo material e solução envolvidos na coleta foram previamente esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 min.

Para a contagem das BHT, 100 µL de amostra de água ou de suspensão de células desprendidas dos corpos de prova foram espalhadas em placas contendo meio padrão para contagem de células, o *plate count agar* (PCA) (Kasvi, K25.610040), e incubadas a 37 °C por 24 h em estufa bacteriológica (Solidsteel, SSB-40L). Ao término do período de incubação foi realizada a contagem das colônias crescidas em cada placa em um contador de colônias (Quimis, Q295B). Quando necessário, antes do espalhamento em placas, as amostras eram diluídas em série em água peptonada 0,1% estéril. A contagem de BHT para amostra de água (bactérias planctônicas) é dada em UFC.mL<sup>-1</sup> e para a solução de biofilme (bactérias sésseis) é dada em UFC.cm<sup>-2</sup> levando em consideração a área do corpo de prova exposta à água sintética de circulação (38 cm<sup>2</sup>), conforme descrito em Silva *et al.* (2017).

Os resultados de quantificação de BHT planctônicas e sésseis bem como os desvios-padrões apresentados na seção de resultados são uma média da duplicata de ensaios (replicata de ensaio). Ainda, o plaqueamento de cada amostra foi realizado em triplicata e a contagem das placas apresentaram erros menores que 5%.

### 3.1.7. Análise estatística

Os resultados foram apresentados em forma de média aritmética ± o desvio padrão de duplicatas. A análise dos dados experimentais coletados referente à

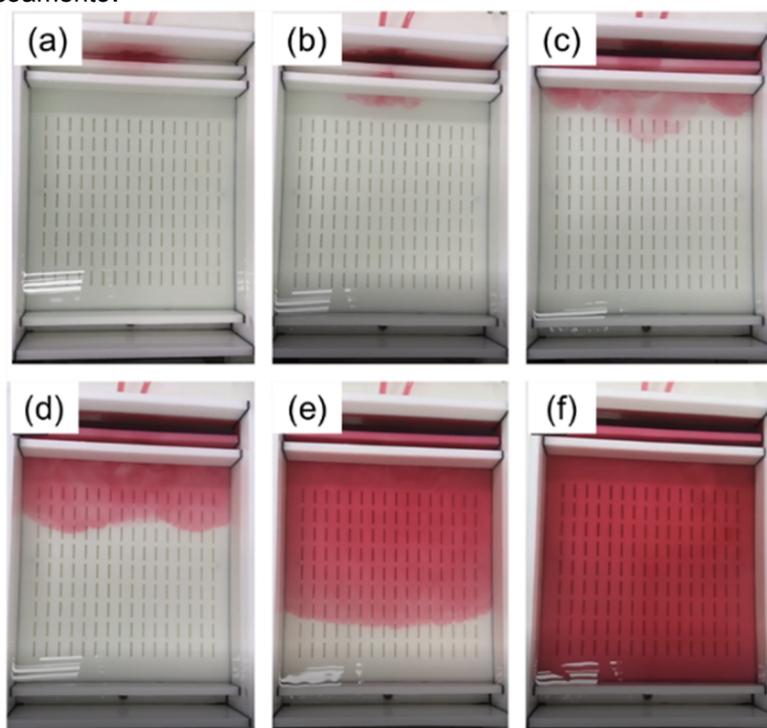
formação de biofilme em corpos de prova foi feita utilizando o teste de Tukey (significância de 5%) através do software Statistica 7 (StatSoft, EUA).

## 3.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

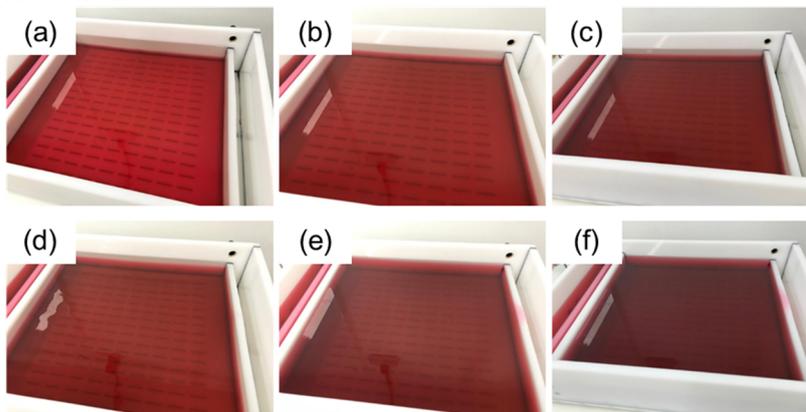
### 3.2.1. Validação do funcionamento dos sistemas de circulação de água

Como mencionado no item 3.1.1, a configuração do sistema de circulação de água foi projetada com a intenção de que no interior do tanque de prova o escoamento fosse homogêneo (evitar pontos mortos), tangencial aos corpos de provas e regime laminar. Assim, com os sistemas montados um teste de escoamento com corante foi realizado nos dois sistemas para verificar se as condições projetadas foram alcançadas. O curso da água foi gravado e as Figuras 9 e 10 mostram o escoamento da solução de corante no interior do tanque de circulação pela visão superior e lateral, respectivamente.

**Figura 9.** Vista superior do escoamento da solução de corante ao longo do tanque de circulação para validação do regime de escoamento laminar, sendo que (a), (b), (c), (d), (e) e (f) indicam a ordem cronológica do escoamento.



**Figura 10.** Vista lateral do escoamento da solução de corante ao longo do tanque de circulação para validação do regime de escoamento laminar, sendo que (a), (b), (c), (d), (e) e (f) indicam a ordem cronológica do escoamento.



As Figuras 9 e 10 mostram que o curso da solução de corante é homogêneo em toda área do tanque, não havendo caminhos preferenciais (Figura 9), e também ocorre em camadas (Figura 10), características típicas de um escoamento homogêneo e laminar, validando a configuração do tanque de corpos de prova.

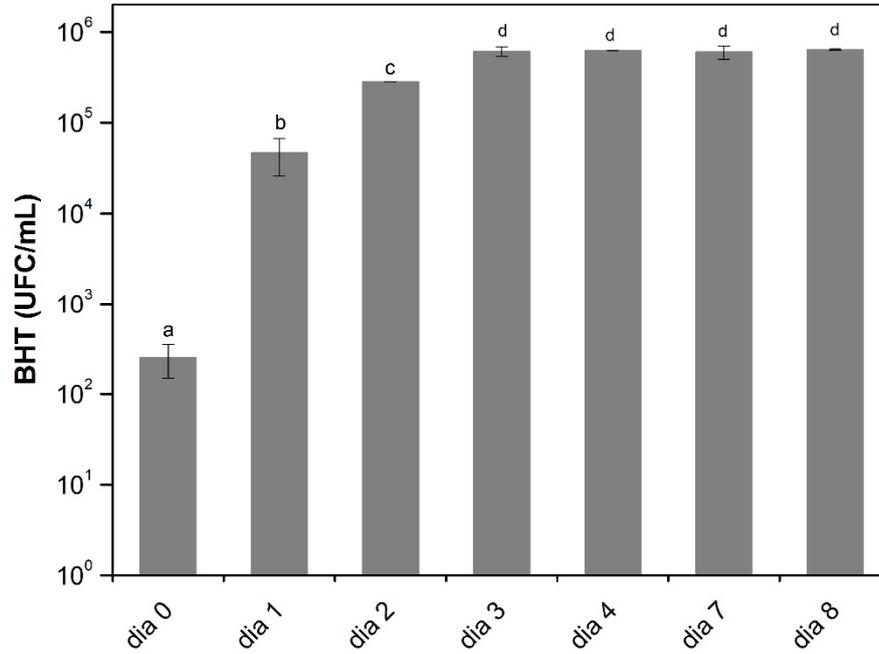
Destaca-se que a vazão de  $50 \text{ L h}^{-1}$  foi escolhida para realizar os testes dessa tese de modo que na superfície dos corpos de prova a velocidade de escoamento fosse  $0,0004 \text{ m s}^{-1}$ , tendo um  $N_{Re}$  de 61, prevalecendo um regime de escoamento laminar ( $N_{Re} < 5 \times 10^5$ ).

### **3.2.2. Validação da formação de biofilme em corpos de prova dispostos no sistema de circulação de água**

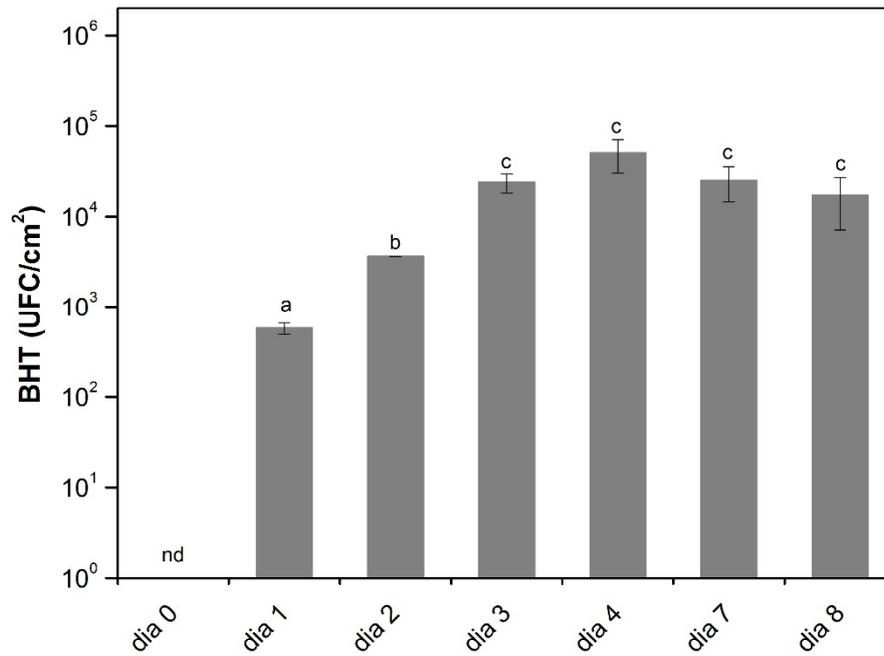
Nesse trabalho foi escolhido usar água de resfriamento sintética e corpos de prova que simulam superfícies de equipamentos de sistemas de resfriamento, por esta razão foi necessário validar a formação de biofilme nessas condições. O acompanhamento foi realizado pela contagem de BHT planctônicas e sésseis em placas e os resultados obtidos são mostrados na Figura 11.

**Figura 11.** Contagem de BHT utilizando como fonte de carbono  $160 \text{ mg L}^{-1}$  de diesel estabilizado com 1% DSS, como inóculo  $5 \times 10^2 \text{ UFC mL}^{-1}$  de cultura mistura, vazão de  $50 \text{ L h}^{-1}$ , temperatura de  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  e na ausência de ímã durante 8 dias. (a) BHT planctônicas, e (b) BHT sésseis. Letras diferentes são valores com diferença significativa ( $p < 0,05$ ). nd: não detectado.

(a)



(b)



Um aumento da concentração de BHT na água de circulação foi observado entre o dia 1 e 3 de experimento, estabilizando-se após este período (Figura 11a). Esse aumento foi de 3000 vezes comparando o dia 0 e o dia 8, indicando que não houve uma limitação no crescimento ou na manutenção celular por falta da disponibilidade de nutrientes às bactérias formadoras da cultura mista, presente na água de circulação. Além disso, a concentração de BHT planctônicas está de acordo com o estudo realizado por Veiga (2010), o qual trabalhou com água de resfriamento em sistema semifechado e foi base para determinar a composição da água de circulação utilizada nessa tese.

Assim como na água de circulação, a concentração de BHT nos corpos de prova aumentou entre o dia 1 e 3 de experimento, mantendo-se constante após esse período (Figura 11b). Nesse caso, a concentração de BHT sésséis também foi muito próxima à observada por Veiga (2010) em superfície de aço inox, chegando a  $2 \times 10^4$  UFC  $\text{cm}^{-2}$  de BHT sésséis no oitavo dia de teste, indicando a presença de microrganismos na superfície dos corpos de prova e uma possível formação de biofilme. Tais resultados validam a composição da água sintética, a configuração do sistema e o uso de corpos de prova para realizar os ensaios de avaliação do crescimento de biofilme em superfície e ação do ímã como estratégia antibioincrustação.

### 3.3. CONCLUSÕES PARCIAIS

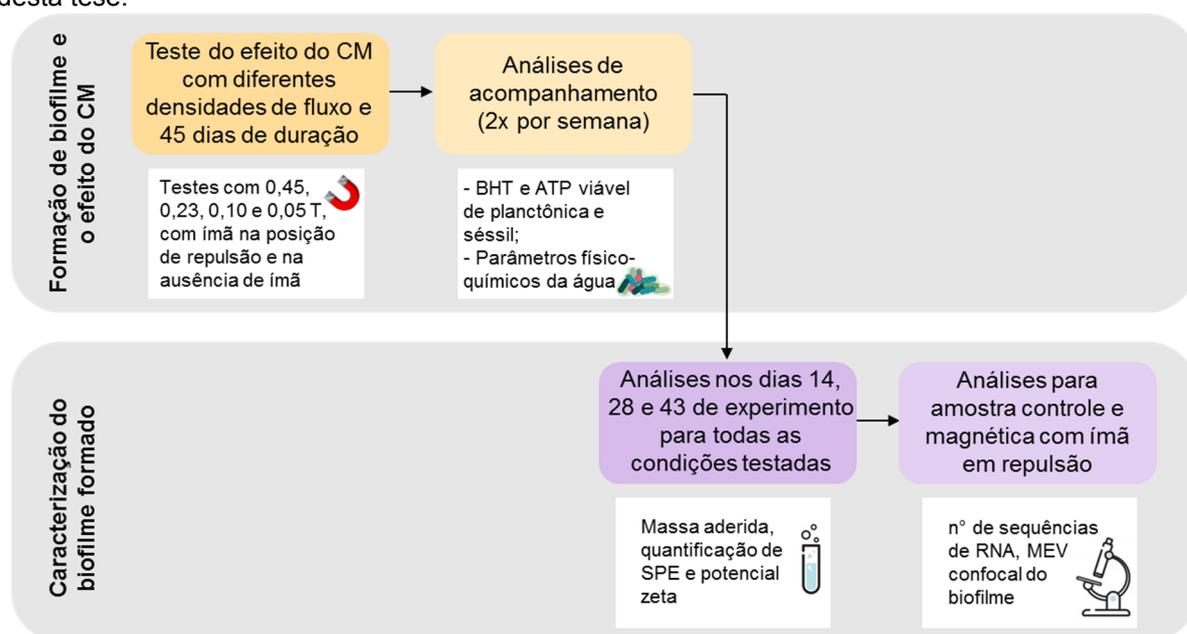
Os ensaios de validação do funcionamento dos sistemas de circulação de água em escala de bancada mostraram que as necessidades operacionais e configuração do sistema levantadas no projeto foram cumpridas, de modo que o tanque não apresentou pontos mortos e o escoamento da água foi homogêneo e de regime laminar. Além disso, os resultados dos ensaios de validação da formação de biofilme em corpos de prova dispostos no sistema de circulação de água sugerem que as condições operacionais, configuração do sistema e a composição da água sintética foram favoráveis para o crescimento e manutenção celular na água. Também foi observada a presença de bactérias nos corpos de prova com aumento gradual da sua concentração ao longo do ensaio, reproduzindo valores similares aos encontrados na literatura. Assim, os resultados se mostraram positivos, indicando que os sistemas

montados e a composição da água de circulação podem ser usados para realização dos ensaios para determinar a ação do ímã na formação de bioincrustação.

#### 4. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO CAMPO MAGNÉTICO PERMANENTE NO CRESCIMENTO DE BIOFILME

Este capítulo descreve o estudo do efeito do campo magnético gerado por ímãs permanentes no crescimento de biofilme em corpos de prova acoplados ao tanque de circulação de água. Esta etapa atende aos seguintes objetivos específicos da presente tese, de acordo com a seção 1.2: avaliar o efeito de diferentes densidades magnéticas (0,45, 0,23, 0,10 e 0,05 T) e posição dos ímãs permanentes (atração e repulsão) sobre o crescimento de biofilmes em corpos de prova de vidro instalados no sistema de circulação de água; caracterizar os biofilmes formados nos corpos de prova de vidro expostos ou não ao campo magnético permanente em relação ao teor de sólidos totais, quantificação de SPE; potencial zeta; quantificação do número de sequências de RNA, microscopia eletrônica de varredura, microscopia confocal de varredura a laser. A Figura 12 mostra o fluxograma das atividades realizadas nessa fase. Na sequência, são apresentados os materiais e métodos e resultados obtidos nessa etapa do trabalho, os quais foram submetidos ao pedido de patente da técnica antibioincrustação investigada (BR 10 2021 01196-4).

**Figura 12.** Fluxograma das atividades realizadas referentes aos testes apresentados no Capítulo 4 desta tese.



CM: campo magnético; BHT: bactérias heterotróficas totais; SPE: substâncias poliméricas extracelulares; MEV: microscopia eletrônica de varredura

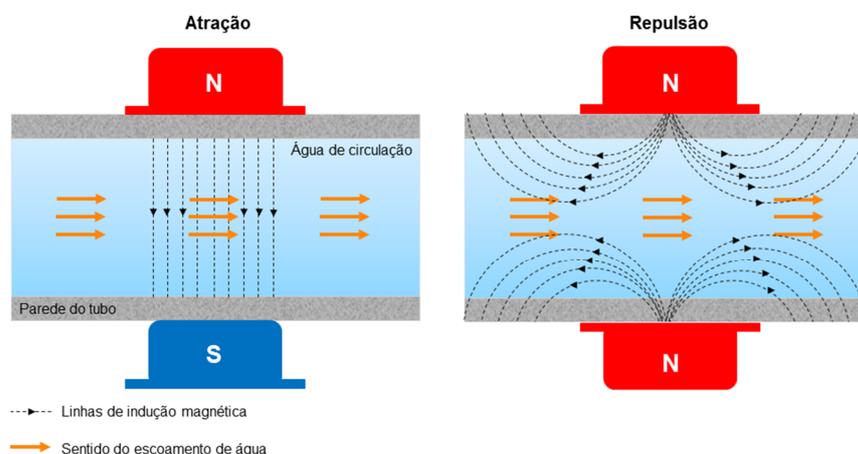
## 4.1. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1.1. Ensaio de formação do biofilme em sistema de circulação de água exposto ao campo magnético

Para a avaliação do efeito do campo magnético permanente no crescimento de biofilme em corpos de prova de vidro, os pares de ímãs foram acoplados na tubulação na posição de atração, variando as distâncias entre cada ímã em relação ao centro do tubo para testar diferentes densidades de fluxo magnético. Nesse caso, foram avaliadas as 4 densidades possíveis com a configuração do sistema e com os ímãs disponíveis, sendo elas: 0,45, 0,23, 0,10 e 0,05 T no centro do tubo, o qual possui 20 mm de diâmetro. Além disso, também foram avaliados os pares de ímãs na posição de repulsão (0 T no centro e 0,18 T na parede do tubo). A densidade de fluxo magnético foi medida diretamente na parede e no centro do tubo ao qual os ímãs foram ajustados utilizando um transdutor de campo magnético (TMAG-v2-T0, GlobalMag).

A decisão de avaliar diferentes densidades de fluxo magnético e o sentido do campo magnético do ímã acoplado ao sistema foi motivada pela diferença no comportamento das linhas de indução magnética. De modo geral, o fluxo magnético de dois ímãs acoplados no sentido de atração em um tubo passa no centro. Além disso, quanto menor a distância entre esses ímãs acoplados, maior será o número de linhas de indução magnética que irá atravessar o tubo, logo, maior a densidade de fluxo. Quanto maior essa distância menor será essa quantidade de linhas, ou seja, menor a densidade. Por outro lado, quando os ímãs são posicionados no sentido de repulsão em um tubo, não há passagem de linhas de indução no centro (ponto neutro) tendo a passagem concentrada na sua superfície. Para melhor entendimento, a Figura 13 exemplifica o comportamento das linhas de indução de um par de ímã acoplado em um tubo na posição de atração e repulsão.

**Figura 13.** Esquema do par de ímã ajustado na tubulação, demonstrando o comportamento das linhas de indução no tubo quando os ímãs estão na posição de atração e repulsão.



Fonte: Autor.

Nesta etapa, os dois sistemas funcionaram simultaneamente, sendo que um estava na ausência de campo magnético (controle) e o outro com os 3 pares de ímãs acoplados na tubulação de entrada do tanque de circulação de água. O início dos experimentos seguiu os procedimentos descritos no item 3.1.5. Os corpos de prova, previamente higienizados (procedimento descrito no item 3.1.2), foram inseridos no tanque de circulação de água de cada sistema nas mesmas posições. Cada ensaio teve duração de 45 dias, e nos dias 0, 14 e 28 de experimento foram adicionados  $160 \text{ mg L}^{-1}$  de diesel estabilizado com 1% de DSS.

A evolução do crescimento do biofilme nos sistemas e a avaliação do efeito do campo magnético na formação de biofilme foi acompanhada pela leitura dos parâmetros físico-químicos da água no tanque de circulação realizada com uma sonda multiparâmetros (Hanna Instruments HI98194), pela quantificação da concentração das BHT na água de circulação e no corpo de prova (segundo os procedimentos descritos no item 3.1.6), e pela quantidade de células viáveis utilizando o *Kit BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability* (procedimento descrito no item 4.1.2). As análises de acompanhamento foram realizadas 2 vezes por semana, nos dias 0, 1, 3, 7, 10, 14, 17, 21, 24, 28, 31, 35, 38 e 43 de experimento. Além disso, nos dias 14, 28 e 43 foram feitas também as análises de caracterização das células aderidas nos corpos de prova, as quais estão descritas no item 4.1.3. Ressalta-se que os corpos de provas

foram coletados na mesma posição em cada sistema, e os testes realizados em duplicata.

#### **4.1.2. Ensaio de viabilidade celular**

O ensaio de viabilidade celular foi realizado utilizando o reagente *BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability*, que é baseado no sinal luminescente proporcional à quantidade de ATP extraído de células viáveis. O protocolo foi realizado com base nas orientações do fabricante (Promega): 50 µL de reagente *BacTiter-Glo™* foram adicionados em 100 µL de amostra de água de circulação ou de suspensão de células desprendidas dos corpos de prova em placas opacas brancas de 96 poços, colocado no leitor de microplacas (GloMax® Discover, Promega), homogeneizado e após 5 min o sinal de luminescência foi lido em unidade relativa de luminescência (URL). Nesta análise, foi realizada a duplicata de cada amostra para cada teste realizado.

#### **4.1.3. Análises de caracterização**

As análises de caracterização dos corpos de prova com células aderidas e da suspensão de células desprendidas para todas as variáveis testadas foram: quantificação de massa total aderida no corpo de prova, quantificação de SPE e potencial zeta. As amostras do controle e as amostras expostas à ação do campo magnético permanente com os ímãs acoplados na posição de repulsão (melhor condição obtida nos testes utilizando ímãs) também foram caracterizadas com o sequenciamento de RNA, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia confocal de varredura a laser (MCVL).

#### 4.1.3.1. Massa seca aderida no corpo de prova

Antes de iniciar o experimento, os corpos de prova foram higienizados (item 3.1.2) e colocados em estufa a 105 °C por 2 h, sendo então foram colocados em dessecador por 1 h. Então, os corpos de prova foram identificados, pesados (massa inicial) e acoplados no tanque de circulação de água. Nos dias 14, 28 e 43 de experimento 3 corpos de prova de cada sistema foram coletados, lavados por imersão em água salina 0,85% e colocados em estufa a 105 °C por 2 h, sendo então colocados em dessecador por 1 h e pesados (massa final). A quantidade de massa seca aderida foi calculada com base na diferença da massa final e inicial do corpo de prova dividida pela sua área.

#### 4.1.3.2. Quantificação das SPE

A quantificação das SPE produzidas ao longo dos experimentos foi relacionada com a determinação da concentração de polissacarídeos totais. Primeiramente foi realizada a extração das SPE a partir da suspensão de células desprendidas do corpo de prova tendo como base o protocolo descrito por Yang *et al.* (2019). Uma alíquota de 7 mL da suspensão foi colocada em banho de ultrassom por 2 min, agitada a 150 rpm por 10 min, novamente colocada em banho de ultrassom por 2 min, e centrifugadas a 4856 xG por 15 min. O sobrenadante foi coletado e a determinação da concentração de polissacarídeos totais pelo método de Dubois (DUBOIS *et al.*, 1956) foi realizada, utilizando D-glicose como padrão. Para tal, em 1 mL do sobrenadante foi adicionado de 1 mL de solução fenol 5% em água e 5 mL de ácido sulfúrico P.A. (Neon), agitado em vórtex, incubado em estufa a 40 °C por 30 min, e realizada a leitura de absorvância com espectrofotômetro (Q898U2M5, Quimis) em 490 nm. A quantificação de polissacarídeos totais foi realizada com dois corpos de prova de cada sistema nos dias 14, 28 e 43 de experimento, e as medidas em espectrofotômetro foram de 3 alíquotas de cada corpo de prova.

#### 4.1.3.3. *Potencial zeta*

O potencial zeta da água de circulação e da suspensão de células desprendidas dos corpos de prova de cada ensaio foi determinado no equipamento MALVERN ZetaSizer Nano ZS (MALVERN INSTRUMENTS), em pH 7,0. Esta análise foi realizada no Laboratório Interdisciplinar para o Desenvolvimento de Nanoestruturas (LINDEN), da Universidade Federal de Santa Catarina. A análise foi realizada em duplicata nos dias 14, 28 e 43 de experimento.

#### 4.1.3.4. *Quantificação do número de sequência de RNA*

A quantificação do número de sequências de RNA presentes na suspensão de células desprendidas do corpo de prova foi realizada pela empresa Neopropecta (Florianópolis/SC) pelo método Diagnóstico Microbiológico Digital (DMD), o qual utiliza marcadores genéticos para quantificar o sequenciamento de RNA. Seguindo os procedimentos da empresa, 100 mL de suspensão de células desprendidas de corpos de prova acoplados no sistema controle e no sistema exposto ao campo magnético com os ímãs na posição de repulsão foram coletados em frascos fornecidos pela empresa, congelados a -18 °C e enviados para análise. As amostras analisadas correspondem aos dias 14, 28 e 43 de experimento.

#### 4.1.3.5. *Morfologia do biofilme*

A deposição das células bacterianas na superfície dos corpos de prova de vidro foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e por Microscopia confocal de varredura a laser (MCVL).

A análise de MEV foi realizada no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME), da Universidade Federal de Santa Catarina, utilizando um Microscópio Eletrônico de Varredura, modelo JEOL JSM-6701F. As amostras analisadas foram do sistema controle e do sistema exposto ao campo magnético com ímãs acoplados em repulsão no dia 43 de experimento.

Para realização desta análise o procedimento descrito por Mulinari *et al.* (2020) foi tomado como referência. Foram utilizados fragmentos de corpos de prova de vidro no tamanho 0,5x0,5 mm, aproximadamente. O fragmento, colado em uma lâmina de vidro, foi coletado no tanque de circulação, lavado por imersão em água salina 0,85% esterilizada, imerso em solução de glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) por 30 min, e enxaguado com tampão fosfato ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ). Então, os fragmentos com as células fixadas passaram por uma desidratação gradual pela imersão em 5 soluções de etanol (15, 30, 50, 70 e 100%), pelo período de 15 min em cada solução. Por fim, os sólidos foram secos a  $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 h e obtidas as imagens por MEV.

Assim como no MEV, para MCVL foi utilizado um fragmento de corpo de prova de vidro no tamanho 0,5x0,5 cm, aproximadamente, colado em uma lâmina de vidro. O fragmento foi coletado no tanque de circulação, lavado por imersão em água salina 0,85% esterilizada, corado com o *kit FilmTracer™ LIVE/DEAD Biofilm Viability* (Thermo Fisher Scientific), e então realizadas a coleta das imagens em um microscópio confocal de varredura a laser modelo DMI 6000 (Leica Microsystems), do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB), na Universidade Federal de Santa Catarina. A análise no microscópio confocal foi realizada para amostras do sistema controle e do sistema exposto ao campo magnético com ímãs acoplados em repulsão no dia 43 de experimento.

#### **4.1.4. Análise estatística**

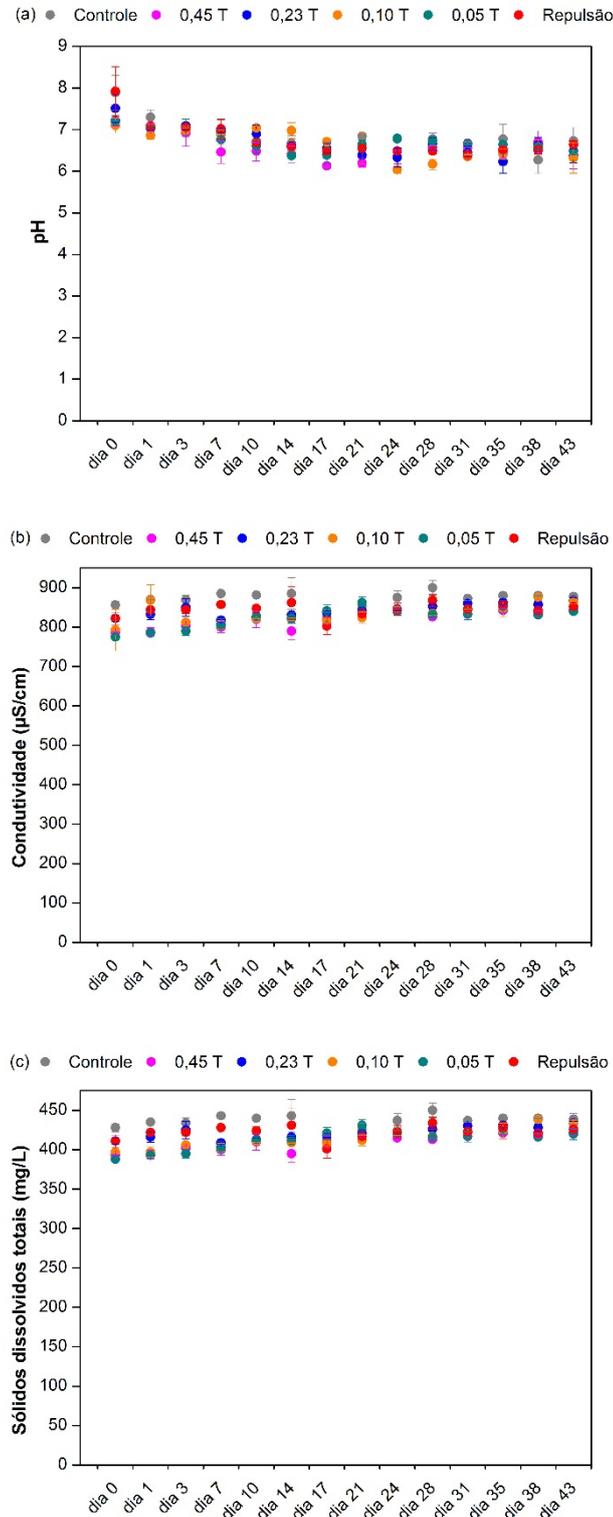
Os resultados foram apresentados em forma de média aritmética  $\pm$  o desvio padrão de duplicatas. A análise dos dados experimentais coletados referente à formação de biofilme em corpos de prova foi feita utilizando o teste de Tukey (significância de 5%) através do software Statistica 7 (StatSoft, EUA).

## 4.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

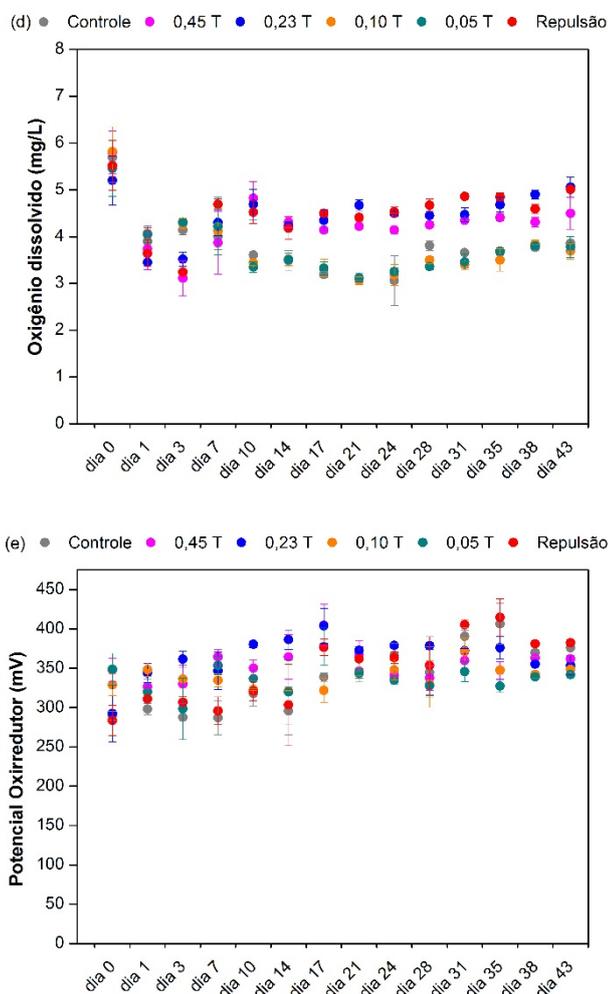
### **4.2.1. Efeito do campo magnético nos parâmetros físico-químicos da água sintética de circulação**

Os parâmetros físico-químicos da água de circulação foram acompanhados ao longo dos 45 dias de operação. A Figura 14 mostra a média das leituras do pH, condutividade, sólidos totais dissolvidos, oxigênio dissolvido e potencial oxirredutor para cada variável ao longo do tempo.

**Figura 14.** Parâmetros físico-químicos da água de circulação no tanque de corpos de prova do sistema controle, e dos sistemas magnéticos com densidade de fluxo 0,45; 0,23; 0,10; 0,05 T e com ímãs em posição de repulsão, utilizando como fonte de carbono diesel estabilizado com 1% de DSS, na concentração 160 mg/L, como inóculo cultura mista, com concentração inicial de  $5 \times 10^2$  UFC.mL<sup>-1</sup>, vazão de 50 L.h<sup>-1</sup> e temperatura de 30 °C. (a) pH, (b) condutividade, (c) sólidos dissolvidos totais, (d) oxigênio dissolvido, e (e) potencial oxirredutor.



**Continuação Figura 14.** Parâmetros físico-químicos da água de circulação no tanque de corpos de prova do sistema controle, e dos sistemas magnéticos com densidade de fluxo 0,45; 0,23; 0,10; 0,05 T e com ímãs em posição de repulsão, utilizando como fonte de carbono diesel estabilizado com 1% de DSS, na concentração 160 mg/L, como inóculo cultura mista, com concentração inicial de  $5 \times 10^2$  UFC.mL<sup>-1</sup>, vazão de 50 L.h<sup>-1</sup> e temperatura de 30 °C. (a) pH, (b) condutividade, (c) sólidos dissolvidos totais, (d) oxigênio dissolvido, e (e) potencial oxirredutor.



Em síntese, os valores de pH se mantiveram constantes (Figura 14a). A condutividade e os valores de sólidos dissolvidos também não apresentaram variações expressivas e estão dentro do esperado para as concentrações de sais adicionadas (Figuras 14b e 14c). Os valores de potencial oxirredutor permaneceram dentro da faixa que favorece a manutenção da respiração aeróbia, que é entre 300 a 700 mV (FAULWETTER et al., 2009) (Figura 14d). Por outro lado, a concentração de oxigênio dissolvido sofreu uma queda considerável nos dias iniciais, provavelmente atrelada à maior demanda de oxigênio devido ao crescimento celular (Figura 14e). Observa-se que o sistema controle e os sistemas magnéticos expostos às densidades de fluxo de 0,10 e 0,05 T apresentaram uma redução mais acentuada na concentração

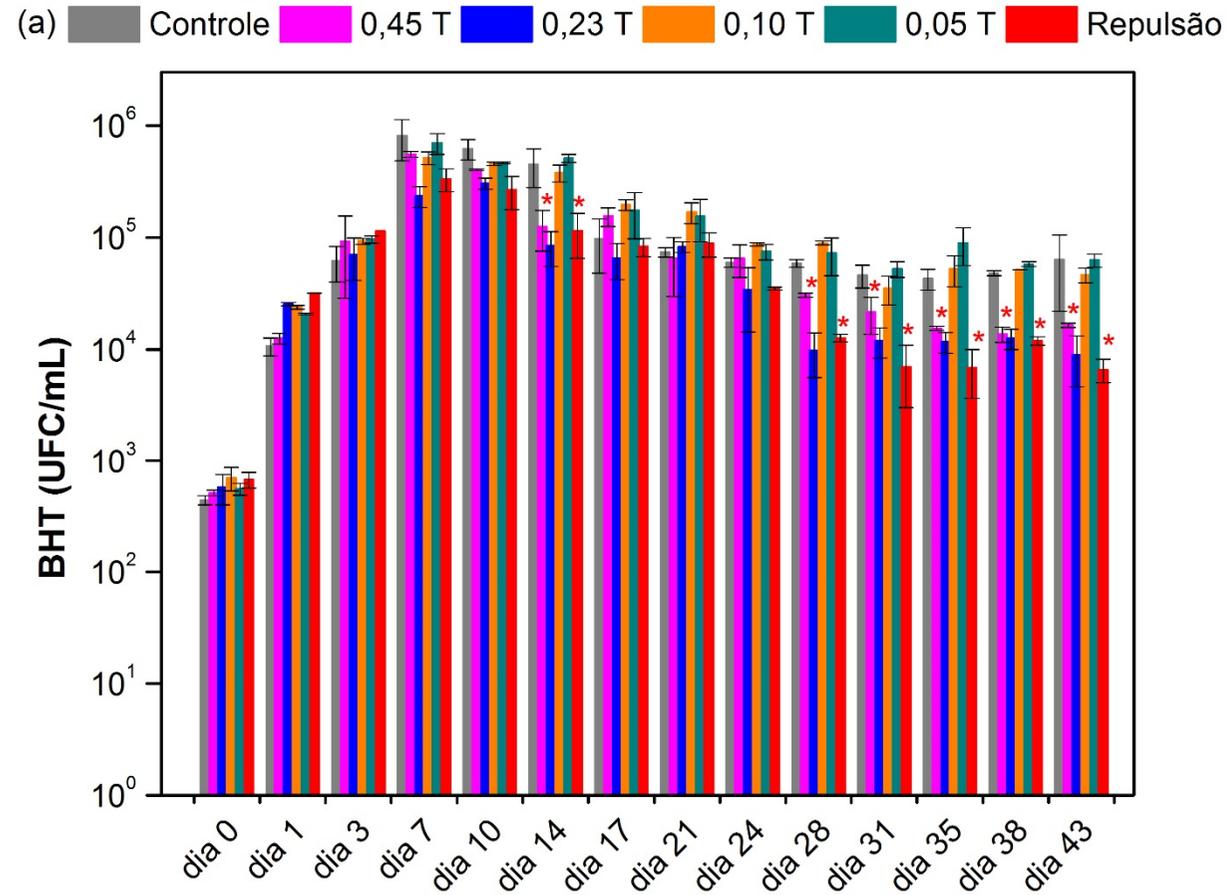
de oxigênio em relação aos outros sistemas, e foram os que tiveram a maior concentração de BHT na água de circulação (Figura 15a).

De modo geral, com exceção da concentração de oxigênio dissolvido, os parâmetros físico-químicos da água não apresentaram variações expressivas ao longo do tempo e não foram alterados nos sistemas expostos ao campo magnético com diferentes densidades de fluxo magnético quando comparados ao controle. No estudo realizado por Mercier *et al.* (2016), também não foi observada uma diferença nos parâmetros da água de circulação entre o sistema controle e o submetido à ação do campo magnético.

#### **4.2.2. Efeito do campo magnético nas BHT planctônicas e sésseis**

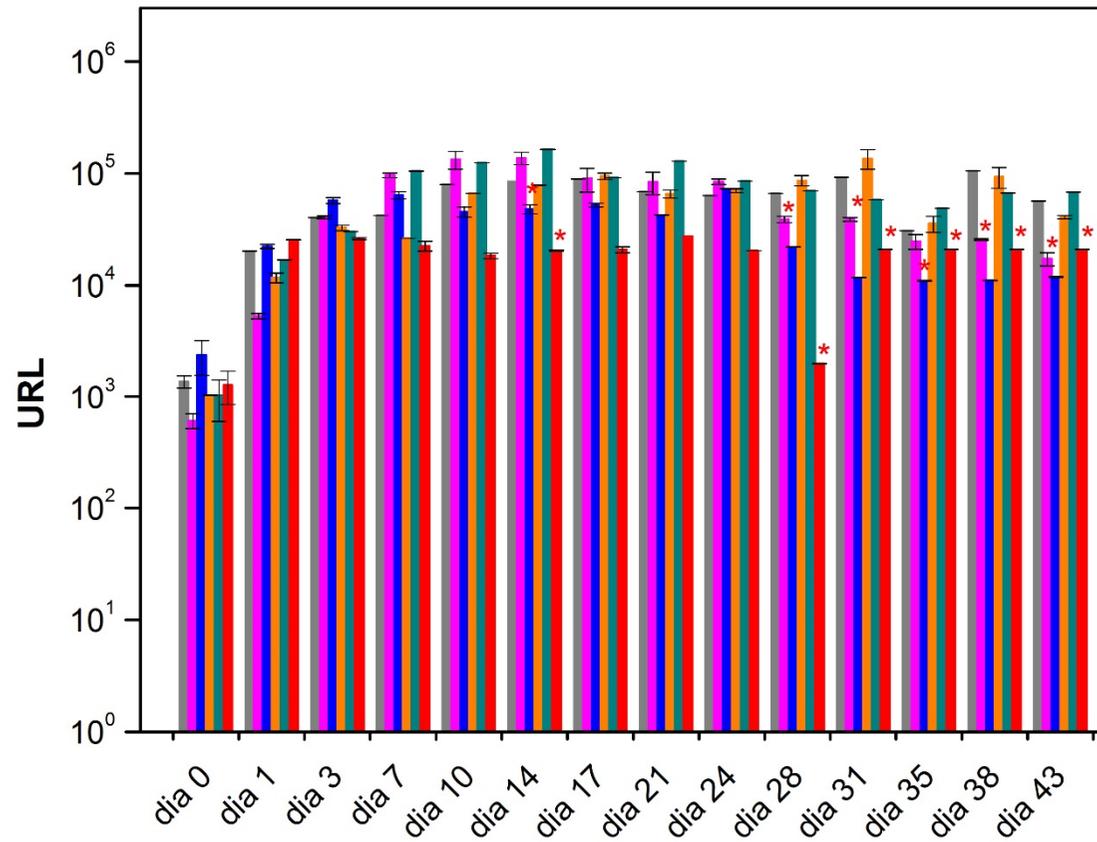
Como mencionado, a determinação da concentração das BHT planctônicas e sésseis por plaqueamento em meio PCA e de células viáveis medida em URL utilizando o *kit BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability* foram escolhidas como análises de acompanhamento para avaliar o crescimento celular na água de circulação e indicar a formação de biofilme nos corpos de prova de vidro. Assim, a Figura 15 mostra os resultados obtidos da concentração de BHT planctônicas e da URL da água de circulação para o sistema controle e para os sistemas magnéticos com densidade de fluxo 0,45; 0,23; 0,10 0,05 T, e com ímãs na posição de repulsão ao longo dos 45 dias de operação.

**Figura 15.** Quantidade de BHT na água de circulação do sistema controle, e dos sistemas magnéticos com densidade de fluxo 0,45; 0,23; 0,10; 0,05 T, com ímãs em posição de repulsão, utilizando como fonte de carbono diesel estabilizado com 1% de DSS, na concentração 160 mg/L (adição nos dias 0, 14 e 28), como inóculo cultura mista, com concentração inicial de  $5 \times 10^2$  UFC.mL<sup>-1</sup>, vazão de 50 L.h<sup>-1</sup> e temperatura de 30 °C. (a) BHT planctônicas, e (b) Unidade relativa de luminescência (URL). \* Valores com diferença significativa em comparação com a amostra controle para cada dia do experimento ( $p < 0,05$ ).



**Continuação Figura 15.** Quantidade de BHT na água de circulação do sistema controle, e dos sistemas magnéticos com densidade de fluxo 0,45; 0,23; 0,10; 0,05 T, com ímãs em posição de repulsão, utilizando como fonte de carbono diesel estabilizado com 1% de DSS, na concentração 160 mg/L (adição nos dias 0, 14 e 28), como inóculo cultura mista, com concentração inicial de  $5 \times 10^2$  UFC.mL<sup>-1</sup>, vazão de 50 L.h<sup>-1</sup> e temperatura de 30 °C. (a) BHT planctônicas, e (b) Unidade relativa de luminescência (URL). \* Valores com diferença significativa em comparação com a amostra controle para cada dia do experimento ( $p < 0,05$ ).

(b) ■ Controle ■ 0,45 T ■ 0,23 T ■ 0,10 T ■ 0,05 T ■ Repulsão



Na Figura 15a é possível observar o aumento da concentração de BHT planctônicas em todos os sistemas avaliados, o que é esperado, de acordo com os resultados obtidos nos testes preliminares (Figura 11a). Independentemente do sistema, foi percebida uma tendência na evolução da concentração de BHT planctônicas, uma vez que a máxima concentração foi atingida no dia 7 de experimento. Além disso, os maiores valores de concentração de BHT planctônicas foram obtidos nos sistemas controle e magnéticos expostos às menores densidades de fluxo (0,10 e 0,05 T), inclusive com valores similares.

Nota-se também que os sistemas expostos ao campo magnético permanente com densidade de fluxo de 0,45 e 0,23 T e com os ímãs em repulsão apresentam a fase de decaimento celular distinta do sistema controle. Em síntese, nos sistemas expostos aos 3 tratamentos é possível perceber o declínio celular nos dias 14, 24 e 28 de experimento, e no sistema controle o declínio é visto apenas no dia 17, e permanece constante até o dia 43. Estes resultados demonstram que o campo magnético permanente aparentemente acelera a fase de decaimento celular de bactérias expostas à densidade de fluxo magnético maior (0,45 e 0,23 T) e com ímãs em repulsão. Da mesma forma, na Figura 15b uma redução significativa no sinal de luminescência é notada nos sistemas com maiores densidades de fluxo e com ímãs em repulsão quando comparados aos sistemas controle e magnéticos expostos a densidades de fluxo de 0,10 e 0,05 T (apresentando uma redução média de 80% a partir do dia 10 de experimento), ou seja, foi detectado uma menor quantidade de ATP, indicando que há menos células viáveis nos sistemas magnéticos com maiores densidades de fluxo (0,23 e 0,45 T) e com ímãs em repulsão.

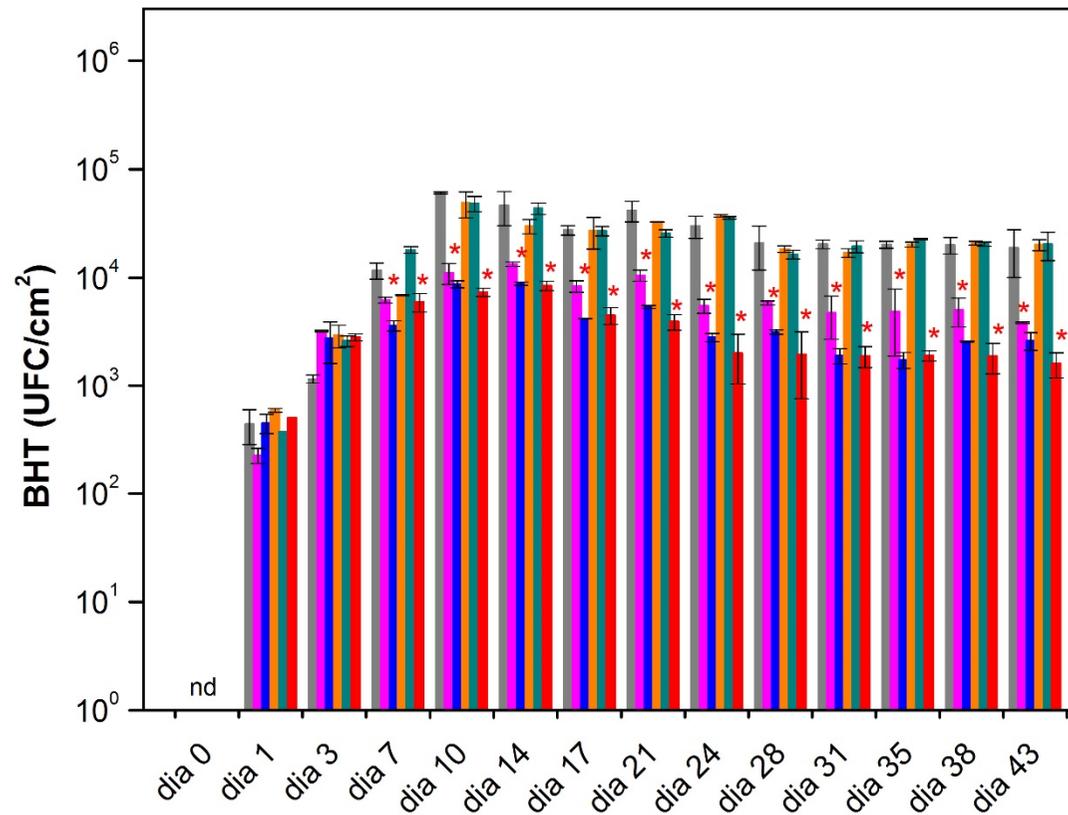
De acordo com estudos realizados por Masood (2017), células expostas a um campo magnético permanente podem apresentar alterações na propagação celular, possivelmente como consequência de modificações nas estruturas celulares da bactéria (como alteração na permeabilidade da membrana celular) e refletindo na velocidade do ciclo de crescimento celular, sendo que este efeito é cada vez mais evidente com maior tempo de exposição. Essa conclusão corrobora com os resultados da concentração de BHT planctônicas e o sinal de URL obtidos neste estudo (Figura 15).

Os resultados da concentração de BHT sésseis e do sinal de luminescência (URL) da suspensão de células desprendidas dos corpos de prova de vidro do sistema

controle e dos sistemas expostos ao campo magnético durante os 45 dias de experimento são mostrados na Figura 16.

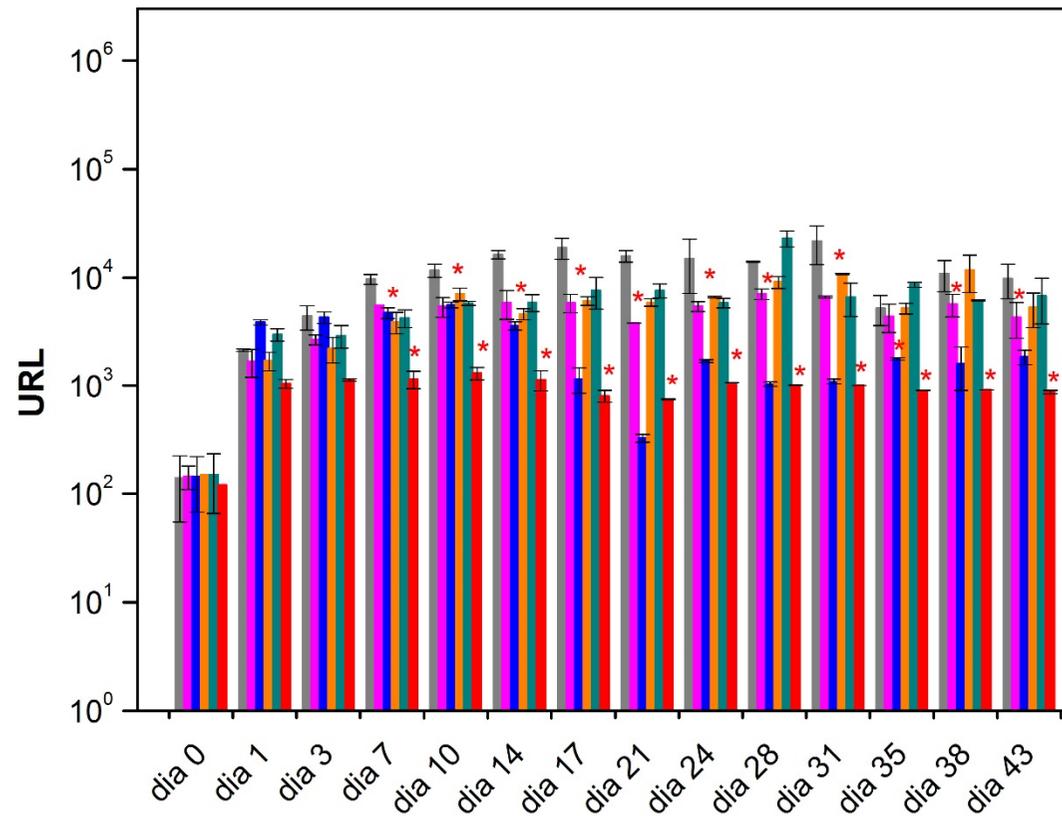
**Figura 16.** Quantidade de BHT aderidas aos corpos de prova de vidro do sistema controle, e dos sistemas magnéticos com densidade de fluxo 0,45; 0,23; 0,10; 0,05 T e com ímãs em posição de repulsão, utilizando como fonte de carbono diesel estabilizado com 1% de DSS, na concentração  $160 \text{ mg L}^{-1}$  (adição nos dias 0, 14 e 28), como inóculo cultura mista, com concentração inicial de  $5 \times 10^2 \text{ UFC.mL}^{-1}$ , vazão de  $50 \text{ L.h}^{-1}$  e temperatura de  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . (a) BHT sésséis, e (b) Unidade relativa de luminescência (URL). \* Valores com diferença significativa em comparação com a amostra controle para cada dia do experimento ( $p < 0,05$ ). nd: não detectado.

(a)  Controle  0,45 T  0,23 T  0,10 T  0,05 T  Repulsão



**Continuação Figura 16.** Quantidade de BHT aderidas aos corpos de prova de vidro do sistema controle, e dos sistemas magnéticos com densidade de fluxo 0,45; 0,23; 0,10; 0,05 T e com ímãs em posição de repulsão, utilizando como fonte de carbono diesel estabilizado com 1% de DSS, na concentração  $160 \text{ mg L}^{-1}$  (adição nos dias 0, 14 e 28), como inóculo cultura mista, com concentração inicial de  $5 \times 10^2 \text{ UFC.mL}^{-1}$ , vazão de  $50 \text{ L.h}^{-1}$  e temperatura de  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . (a) BHT sésséis, e (b) Unidade relativa de luminescência (URL). \* Valores com diferença significativa em comparação com a amostra controle para cada dia do experimento ( $p < 0,05$ ). nd: não detectado.

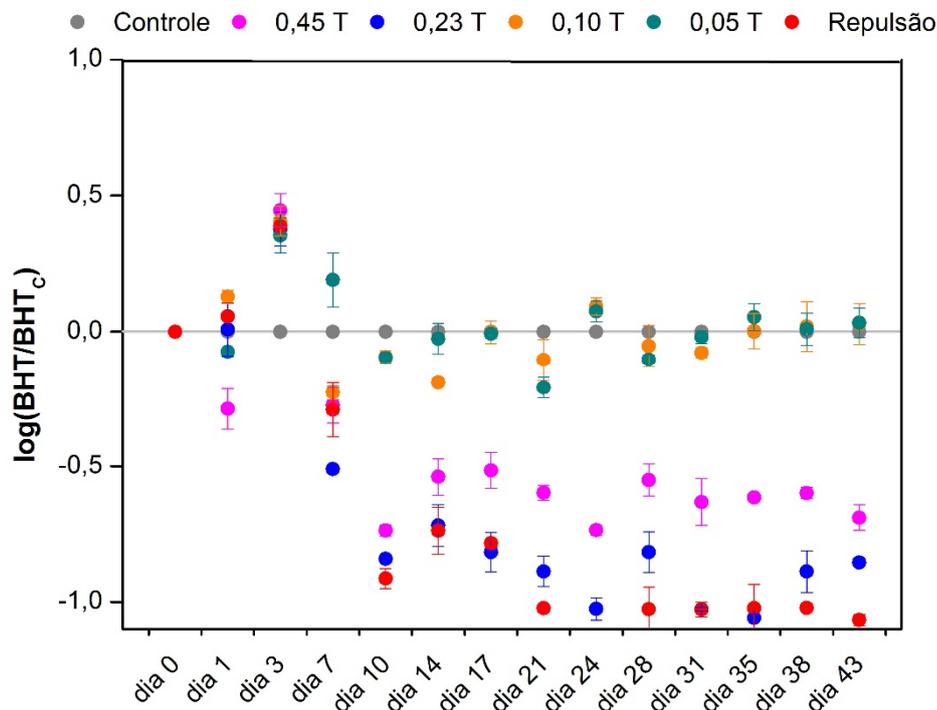
(b)  Controle  0,45 T  0,23 T  0,10 T  0,05 T  Repulsão



Os resultados da Figura 16a indicam uma rápida adesão de bactérias na superfície dos corpos de prova, uma vez que o dia 1 de experimento mostrou uma quantidade considerável de BHT sésseis, independentemente do sistema avaliado. Mercier *et al.* (2016) também observaram essa adesão rápida na superfície de corpos de prova de aço inox imersos em água de circulação proveniente de rio, expostos ou não à ação do campo magnético permanente. Nota-se também, ao se comparar a evolução da concentração de BHT sésseis ao longo do tempo, que os sistemas com campo magnético de 0,45 e 0,23 T, e com ímãs em repulsão apresentaram um aumento da concentração celular mais rápido, visto que no dia 3 atingiram praticamente a concentração máxima de BHT sésseis, enquanto os sistemas controle e magnéticos 0,10 e 0,05 T atingiram sua máxima concentração apenas no dia 10 de experimento, sendo um indicativo de uma possível ação do campo magnético sobre células bacterianas desde o período inicial a exposição.

Além disso, uma diferença significativa da concentração de BHT sésseis nos corpos de prova de vidro é observada, principalmente, a partir do dia 10 de experimento, nos sistemas expostos ao campo magnético com densidade de fluxo de 0,45 e 0,23 T e com ímãs em repulsão, quando comparados aos sistemas controle e magnéticos 0,10 e 0,05 T. A análise de viabilidade celular também mostra o mesmo comportamento das BHT sésseis (Figura 16b), ou seja, uma queda significativa no sinal de luminescência é percebida nos sistemas de maiores densidade de fluxo e com ímãs em repulsão, o que demonstra uma possível redução na quantidade de células viáveis presentes nos corpos de prova. Estas considerações corroboram a hipótese de que o campo magnético permanente afeta a fase de decaimento celular e sugerem que a formação de biofilme em superfícies pode ser afetada quando células microbianas são expostas a um campo magnético. Para melhor visualização das considerações citadas e do efeito do campo na quantidade de BHT sésseis em corpos de prova de vidro, a Figura 17 apresenta o log da razão entre BHT sésseis normalizada pela quantidade de BHT sésseis obtida no sistema controle para cada dia de experimento.

**Figura 17.** Log da razão entre BHT sésseis e BHT sésil do sistema controle para cada dia de experimento.



Analisando a Figura 17, percebe-se a clara distinção entre a concentração de BHT sésseis, de acordo com os sistemas expostos à diferentes densidades de fluxo magnético. A curva dos sistemas com maior densidade de fluxo (0,45 e 0,23 T) e com ímãs em repulsão apresentaram as maiores quedas na concentração de BHT sésseis em relação ao sistema controle, uma redução em torno de 1 casa logarítmica, indicando que há uma quantidade menor de biofilme aderida durante todos os dias de experimento. Por outro lado, as concentrações obtidas nos sistemas expostos ao campo magnético com densidade de 0,10 e 0,05 T foram muito próximas ou iguais ao sistema controle. Assim, pode-se inferir que, para estas condições operacionais testadas, o campo magnético permanente interfere na adesão celular nos corpos de prova acoplados no tanque de circulação de água, e que a densidade de fluxo e posição do ímã são fatores chaves para obtenção desse efeito.

Estudos que aplicam campo eletromagnético como estratégia para controle de bioincrustação em sistemas de resfriamento também apresentaram resultados positivos, com redução de biofilme aderido em superfícies. No trabalho realizado por Trueba; García; Otero (2014), um campo eletromagnético pulsado (0,015 T) foi aplicado em tubulações de um trocador de calor que já possuíam biofilme formado.

Como resultado, nas tubulações que sofreram a ação do campo magnético a resistência à transferência de massa foi reduzida em aproximadamente 50% em comparação com as tubulações controle. No estudo feito por Trueba *et al.* (2015), o campo eletromagnético pulsado (0,015 T) foi aplicado em tubulações de calor no início do processo (sem formação inicial de biofilme). Os resultados apontaram uma redução de 55% na resistência à transferência de calor nas tubulações expostas ao campo eletromagnético quando comparadas ao controle. Segundo esses autores, a ação do campo eletromagnético leva à nucleação, cristalização e deposição de íons dissolvidos na água do mar, afetando a ligação intermolecular das substâncias poliméricas extracelulares, prejudicando a matriz do biofilme e por consequência sua adesão em superfícies.

Mercier *et al.* (2016) também avaliaram o uso de campo eletromagnético pulsado (0,005 T) na redução de biofilme em sistema de resfriamento utilizando água de rio. Os resultados mostraram que o tratamento da água de rio com o campo eletromagnético reduziu em 1 log o número de células de aderidas. Os autores sugerem que o campo eletromagnético pode modificar a organização e a estrutura da membrana microbiana, com alterações na hidratação da membrana, propriedades físico-químicas da superfície e atividade celular, gerando uma condição diferente de crescimento celular e interferindo na adesão de células em superfície.

Em concordância com as hipóteses de Mercier *et al.* (2016) e Trueba *et al.* (2014) de como o campo magnético afeta as células, alguns estudos indicam que a maioria dos componentes celulares possuem característica diamagnéticas, ou seja, quando expostas a um campo magnético externo há um alinhamento das moléculas e formação de um campo oposto ao externo (LIU *et al.*, 2017; WAGNER *et al.*, 2016). Por este motivo, trabalhos sugerem que a ação do campo magnético em microrganismos tem relação com os seus componentes celulares diamagnéticos, mais especificamente, com a membrana celular, a qual é formada por fosfolipídios e proteínas (compostos diamagnéticos) (LIU *et al.*, 2017; ROSEN, 2003; WAGNER *et al.*, 2016). Os principais efeitos relatados são alterações na permeabilidade de íons através da membrana (como o transporte de íons  $\text{Ca}^{+2}$ ) e alterações no sinal de transdução, afetando o transporte de compostos intra- e extracelulares, modificando a função fisiológica normal de uma célula (BANDARA *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2017; MASOOD, 2017; ROSEN, 2003; TENG, 2005; WAGNER *et al.*, 2016).

Apesar dos poucos trabalhos que abordam o efeito do campo magnético em células microbianas e em biofilmes, e de que o mecanismo de ação do campo ainda não esteja totalmente identificado, é consenso entre os autores que o grau de sensibilidade de cada organismo depende de muitas variáveis como espécie, tempo de exposição, densidade de fluxo magnético, e ambiente de crescimento (BANDARA *et al.*, 2015). Neste trabalho, o campo magnético gerado por ímãs permanentes com menor densidade de fluxo (0,10 e 0,05 T), a princípio não causou sensibilidade suficiente para desencadear uma resposta celular específica a ponto de afetar a formação do biofilme. Por outro lado, o campo magnético gerado por ímãs permanentes com maior densidade de fluxo (0,45 e 0,23 T) e na posição de repulsão mostraram causar alguma alteração ao nível celular, uma vez que a concentração de BHT sésseis e o sinal de luminescência indicaram uma redução considerável quando a água de circulação foi exposta ao campo magnético.

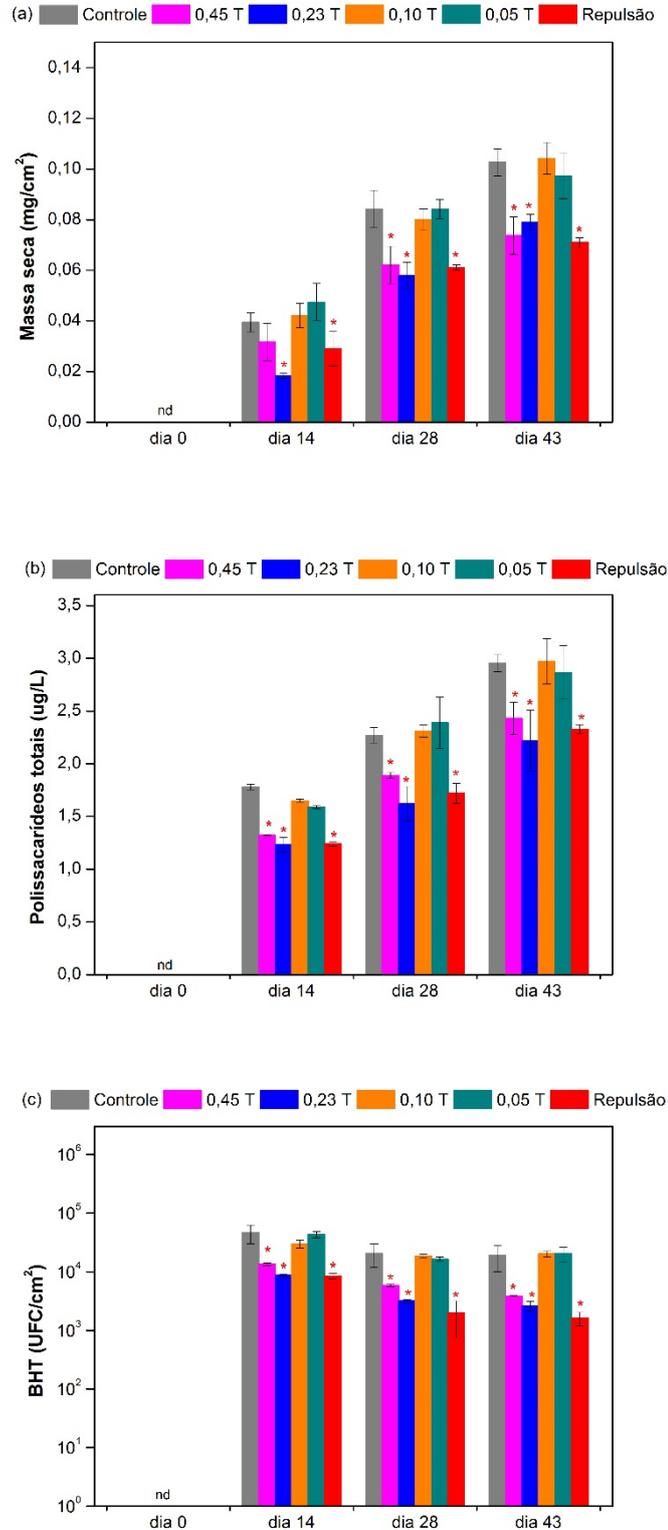
Tendo em vista os estudos anteriores com campo magnético pulsado e analisando os resultados obtidos nesta tese com campo magnético permanente, provavelmente no cenário avaliado os efeitos do campo magnético sobre os microrganismos não causam a morte celular, uma vez que a concentração de BHT planctônicas não foi afetada abruptamente (pois foi observado aumento na concentração celular desde o dia 1 de experimento tanto na ausência quanto na presença do campo magnético). Porém, um maior tempo de exposição ao campo magnético (a partir de 7 dias) pode ter causado alterações na estrutura celular refletindo na permeabilidade da membrana e/ou alterações metabólicas, o que pode estar associado a aceleração na fase de decaimento celular (visto o declínio mais rápido nas BHT planctônicas), dificultando a adesão das células na superfície dos corpos de prova (menor quantidade de BHT sésseis foi detectada). Em relação ao ímã na posição de repulsão, é interessante destacar que apesar das linhas de indução não atravessarem o centro do tubo (ponto neutro), elas estão concentradas na região próxima à parede (Figura 13), onde apresenta uma densidade de fluxo magnética em torno de 0,18 T, mostrando ser uma densidade capaz de afetar o funcionamento celular das bactérias.

Para um melhor entendimento sobre a ação do campo magnético na formação do biofilme e confirmar se realmente entre maiores e menores densidades de fluxo há diferença, análises de caracterizações foram realizadas no biofilme formado e os resultados são apresentados no item a seguir.

#### **4.2.3. Caracterização do biofilme formado em corpos de prova de vidro na ausência e presença de campo magnético permanente**

A determinação da quantidade de massa seca aderida nos corpos de prova ao longo de cada experimento é um método rápido e indireto para quantificar a incrustação em superfície. A quantificação foi realizada nos corpos de prova acoplados nos sistemas controle e magnéticos nos dias 14, 28 e 43 de experimento e os resultados são mostrados na Figura 18a.

**Figura 18.** (a) Massa seca aderida, (b) Concentração de polissacarídeos totais obtida das SPE extraídas do biofilme, e (c) BHT sésses dos corpos de prova do sistema controle, e dos sistemas magnéticos com densidade de fluxo 0,45; 0,23; 0,10; 0,05 T e com ímãs em posição de repulsão, nos dias 0, 14, 28 e 43 de experimento. \* Valores com diferença significativa em comparação com a amostra controle para cada dia do experimento ( $p < 0,05$ ). nd: não detectado.



Comparando os dias 14, 28 e 43, todos os sistemas apresentaram aumento da quantidade de massa aderida ao longo do experimento. Entretanto, apenas os sistemas expostos aos tratamentos com maiores densidades de fluxo magnético (0,45 e 0,23 T) e com o ímã na posição de repulsão mostraram redução significativa da quantidade de massa depositada na superfície dos corpos de prova em comparação com a amostra controle, tendo uma incrustação acumulada cerca de 30% menor no dia 43.

Cabe ressaltar que a formação da incrustação é complexa, sendo esta composta por matéria orgânica e inorgânica, ou seja, a massa seca aderida nos corpos de prova é referente tanto ao biofilme formado (microrganismos e SPE) quanto ao acúmulo de diesel e sais ao longo dos 45 dias de experimento, justificando o aumento gradual ao longo do tempo da quantidade de massa aderida apesar da quantidade de BHT sésseis permanecer semelhante entre os dias 14, 28 e 43, em cada sistema avaliado (Figura 18c). Além disso, a redução da massa aderida observada nos corpos de prova dos sistemas expostos aos tratamentos com 0,45 e 0,23 T e com ímãs em repulsão indica o controle da incrustação aplicando campo magnético nessas condições.

A menor quantidade de massa aderida pode ser reflexo do efeito do campo magnético na formação de biofilme nos corpos de prova, atrelado tanto ao número de células quanto à produção das SPE, uma vez que os sistemas que apresentaram a maior quantidade de BHT sésseis (controle, 0,05 e 0,10 T) apresentaram a maior quantidade de massa aderida e os sistemas que mostraram redução das BHT sésseis exibiram menor massa. A ação anti-incrustante de maiores densidades de fluxo magnético e do ímã em repulsão também pode ser um possível efeito na água de circulação, uma vez que foi perceptível a diferença visual da água no tanque de circulação comparando os sistemas expostos a essas condições de campo magnético (água apresentou coloração mais leitosa) ao sistema controle (água translúcida), como pode ser observado na Figura 4A do Apêndice.

A quantificação das SPE foi realizada pela determinação da concentração de polissacarídeos totais utilizando o método de Dubois e os resultados são mostrados na Figura 18b. Analogamente aos resultados de massa seca aderida, os sistemas expostos ao campo magnético com maiores densidades de fluxo (0,45 e 0,23 T) e com ímã na posição de repulsão também apresentaram uma redução significativa, em média 25%, na concentração de polissacarídeos totais nos dias 14, 28 e 43 de

experimento, ao comparar com o sistema controle. Tal resultado indica uma menor quantidade de SPE produzida nos sistemas expostos ao tratamento com 0,45 e 0,23 T e com o ímã em repulsão. Por outro lado, os tratamentos com densidades de fluxo magnético de 0,10 e 0,05 T não apresentaram diferença significativa em relação ao sistema controle. Um aumento gradual na concentração de polissacarídeos totais, ao comparar os dias 14, 28 e 43 de experimento, também pode ser observado, independente do sistema analisado. Esse aumento pode estar relacionado ao ciclo de formação do biofilme, ou seja, as bactérias aderidas tendem a produzir continuamente as SPE, estas acumulam no biofilme, e aumenta a sua concentração com o passar do tempo.

Ao analisar os resultados apresentados até momento neste trabalho, percebe-se que mesmo não tendo uma redução drástica na quantidade de BHT planctônicas, houve redução significativa tanto na quantidade de BHT sésseis quanto na quantidade das SPE nos sistemas tratados com 0,45 e 0,23 T e com ímã em repulsão quando comparados ao controle. Essas observações corroboram a hipótese de que o campo magnético permanente nas condições avaliadas provavelmente não causa a morte do microrganismo, mas é capaz de modificar a permeabilidade da sua membrana celular e/ou a produção de metabólitos, o que pode ter refletido na aceleração da fase de decaimento celular e alteração na produção das SPE, dificultando a adesão das células em superfície, representado pela redução na quantidade das BHT sésseis.

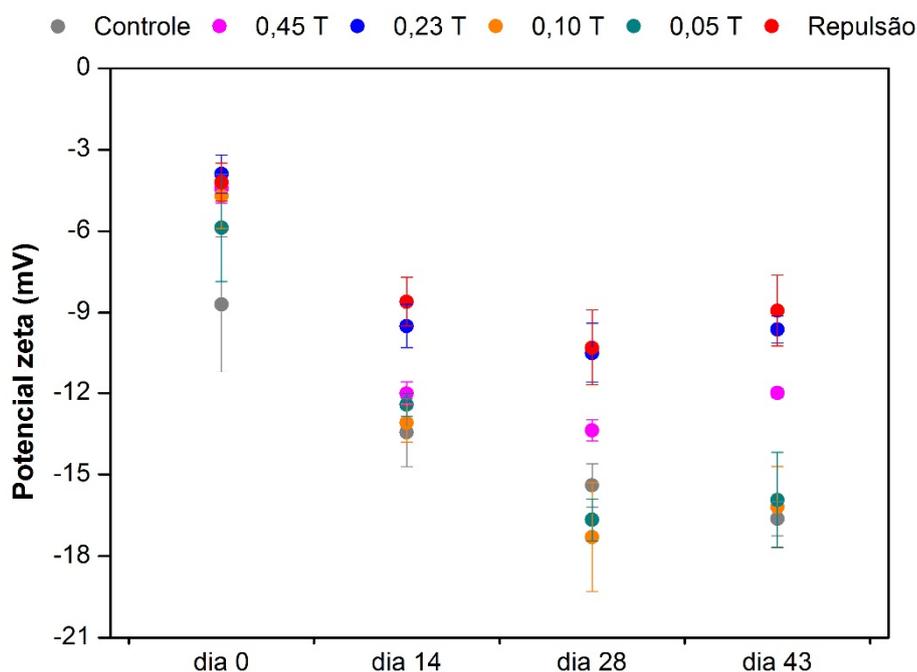
Convergindo com essa hipótese, Jung; Choi; Lee (2013) demonstraram que a produção de SPE é afetada pelas condições ambiente nas quais os microrganismos estão expostos e isso acaba alterando a capacidade de formação de biofilme e o número de células aderidas. No trabalho de Luo *et al.* (2020) foi identificado que algas expostas a uma maior densidade de fluxo magnético (no caso, desse estudo a partir de 0,15 T) por um período maior de exposição (16 dias) conduziram ao controle do crescimento celular. Segundo os autores, o campo magnético pode afetar a atividade enzimática e inibir a secreção das SPE pelas células, uma vez que estudos demonstraram a capacidade do campo magnético com alta densidade magnética ser capaz de alterar a conformação de enzimas, afetando as reações bioquímicas intracelulares. Tiggemann *et al.* (2018) avaliaram o efeito do campo magnético permanente (1,34 T) sobre a lisozima, e como resultado observaram que o tratamento magnético ocasionou um aumento na atividade enzimática quando comparada a lisozima nativa (não exposta ao campo magnético). De acordo com os autores, os

resultados sugerem que a exposição ao campo magnético causou mudanças na estrutura secundária e no tamanho das partículas da lisozima, facilitando o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima.

Dessa forma, os resultados obtidos nos trabalhos citados acima sustentam a hipótese de que a menor quantidade de BHT sésses, nos sistemas expostos ao campo magnético permanente (0,23 e 0,45 T e ímã em repulsão), está atrelada à possíveis alterações que esse tratamento gera na célula. A possível modificação na permeabilidade da membrana e na conformação de enzimas, ocasiona mudanças na atividade metabólica, o que reflete na aceleração da fase de decaimento celular e na produção de metabólitos, como as SPE, e dificulta a adesão das células em superfície.

O potencial zeta foi medido para avaliar possíveis mudanças nas cargas superficiais do biofilme formado nos corpos de prova, resultante da aplicação dos diferentes tratamentos com campo magnético permanente (Figura 19). A Figura 19 mostra que o campo magnético com densidades de fluxo 0,23 e 0,45 T e com ímã em repulsão alteraram de forma mais expressiva o potencial zeta da solução com o biofilme desprendido ( $\zeta = -8$  no dia 43 de experimento), e os sistemas controle, e com campo magnético de 0,10 e 0,05 T apresentaram um potencial mais negativo ( $\zeta = -17$  no dia 43 de experimento). Este efeito ainda não foi reportado na literatura e sugere que um conjunto de fatores podem ter influenciado nos resultados obtidos.

**Figura 19.** Potencial zeta do biofilme extraído em água salina 0,85% estéril dos corpos de prova do sistema controle, e dos sistemas magnéticos com densidade de fluxo 0,45; 0,23; 0,10; 0,05 T e com ímãs em posição de repulsão, nos dias 0, 14, 28 e 43 de experimento.



Como mencionado, o acúmulo de massa nos corpos de prova é a soma do acúmulo de matéria orgânica e inorgânica. O que pode ter influenciado na diferença de potencial zeta obtido entre os sistemas é a quantidade de BHT sésseis e concentração de SPE produzidas. De acordo com a literatura, as células bacterianas possuem carga superficial eletrostática negativa, devido aos lipopolissacarídeos localizados na membrana celular e as SPE também possuem cargas negativas e a sua produção reflete no aumento da carga superficial negativa no sistema analisado (HALDER *et al.*, 2015; LUO *et al.*, 2020; MENG *et al.*, 2006; WILSON *et al.*, 2001; ZAIDI; MUDA; SILLANPÄÄ, 2019). Como os sistemas expostos ao tratamento com campo magnético de 0,45 e 0,23 T e com ímã em repulsão tiveram a menor quantidade de BHT sésseis e menor concentração de polissacarídeos totais (indicando menor quantidade de SPE produzida), refletiu em um potencial zeta menos negativo em comparação aos sistemas expostos aos demais tratamentos. Outros autores também observaram que o aumento na concentração das SPE ocasionou aumento nas cargas superficiais negativas de biofilmes (CHOI *et al.*, 2002; MENG *et al.*, 2006; WILEN; JIN; LANT, 2003).

Outro fator que pode ter influenciado no resultado do potencial zeta é o acúmulo de diesel na superfície dos corpos de prova. Assim, foi realizado o acompanhamento

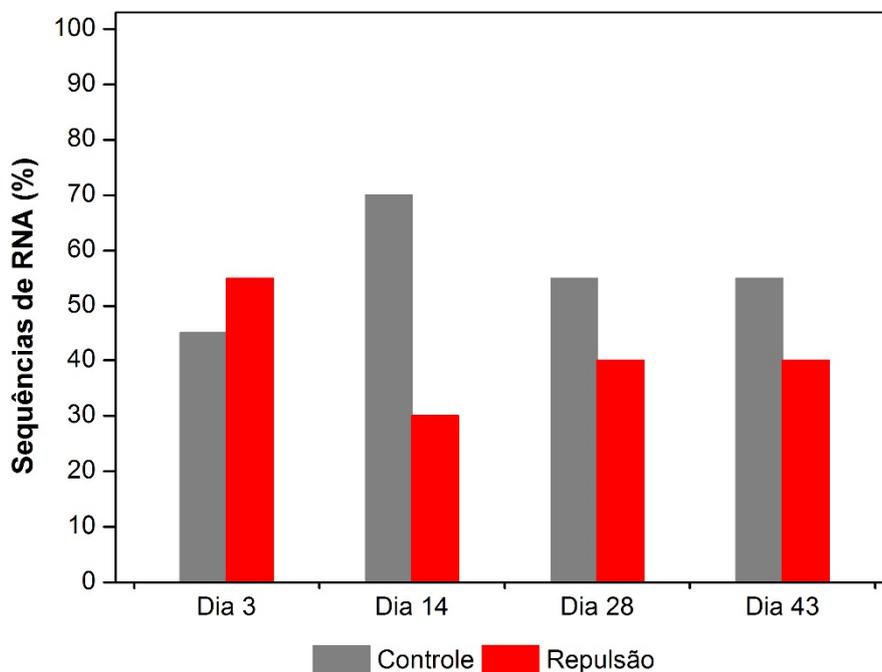
do potencial zeta ao longo de 45 dias da água sintética estéril. Como resultado, obteve-se um potencial zeta constante em torno de -19 (Figura 5A do Apêndice). Tendo em vista que os sistemas com maior quantidade de massa seca aderida (controle, 0,10 e 0,05 T) apresentaram potencial zeta mais negativos, sugere-se um maior acúmulo de diesel nas superfícies expostas a esses tratamentos.

De modo geral, pode-se afirmar que o campo magnético com densidades de fluxo de 0,10 e 0,05 T não influenciaram na formação do biofilme, e apresentam as mesmas condições e comportamentos que o sistema controle. Por outro lado, os sistemas que foram expostos ao campo magnético com 0,45 e 0,23 T e com ímã na posição de repulsão mostraram redução na quantidade de BHT sésseis e apresentaram comportamentos distintos ao controle nas análises de caracterização, indicando que são condições capazes de controlar a formação de biofilme em superfície. Além disso, ao comparar esses três tratamentos (0,45 T, 0,23 T e ímã em repulsão), os resultados obtidos para cada análise não tiveram diferença significativa entre os sistemas. Em outras palavras, a ação do campo magnético como método para reduzir a formação de biofilme é afetada pela densidade do fluxo magnético utilizado, mas independe da posição que o ímã é acoplado no sistema.

Diante do exposto, para confirmar a presença de biofilme na superfície dos corpos de prova e ter mais clareza da hipótese levantada em relação ao possível efeito que o campo magnético causa na formação de biofilmes, a quantificação do sequenciamento de RNA e análises de imagem foram realizadas. Como o ímã é produzido comercialmente para ser acoplado na tubulação na posição de repulsão, esse foi tratamento escolhido para realizar essas três análises de caracterizações.

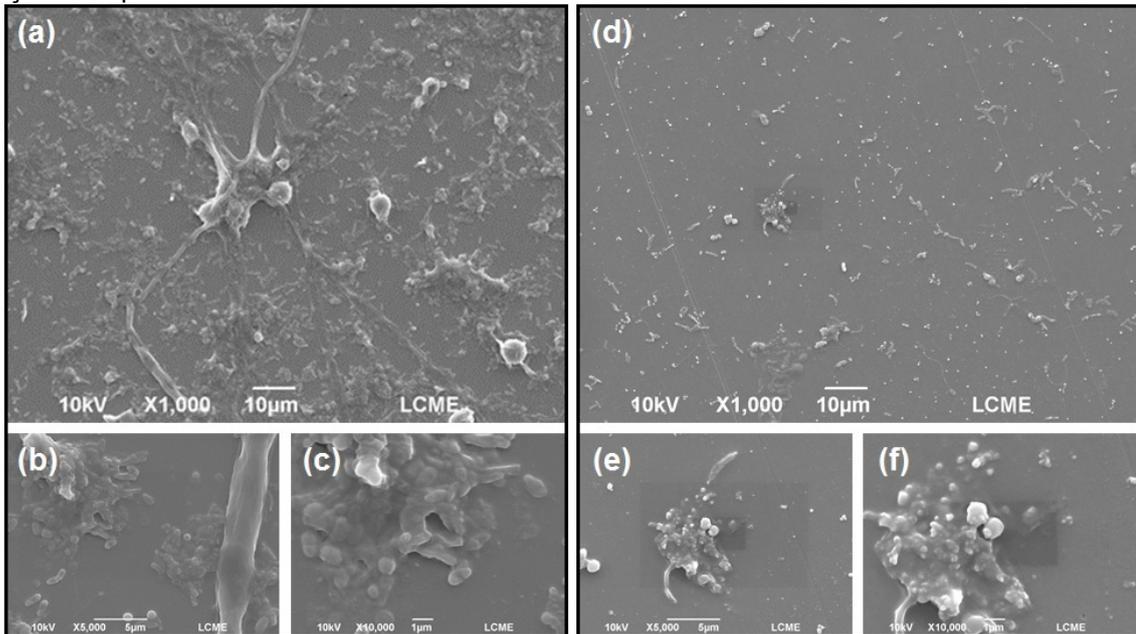
Para suportar os resultados de quantificação de BHT sésseis, foi realizada a quantificação do sequenciamento de RNA para amostras do sistema controle e do sistema magnético com ímã na posição de repulsão. A Figura 20 mostra que o percentual do número de sequências de RNA detectado no biofilme foi maior no sistema controle do que no magnético, sugerindo maior quantidade de células depositadas, vindo ao encontro com os resultados das BHT sésseis e luminescência apresentados nesse trabalho.

**Figura 20.** Percentual do número de seqüências de RNA detectado no biofilme extraído em água salina 0,85% estéril dos corpos de prova do sistema controle, e do sistema magnético ímãs em posição de repulsão, nos dias 3, 14, 28 e 43 de experimento.

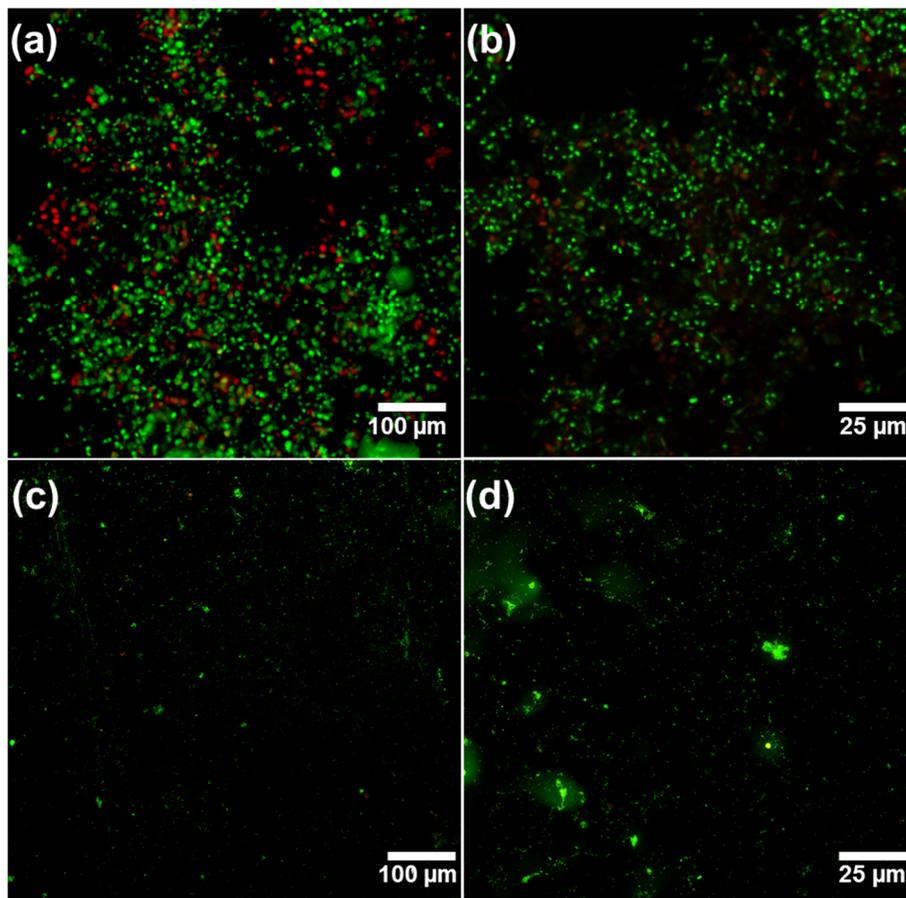


As Figuras 21 e 22 apresentam as imagens obtidas na MEV e na MCVL, respectivamente, referente à superfície dos corpos de prova acoplados no sistema controle e no sistema exposto ao campo magnético com ímã na posição de repulsão no dia 43 de experimento.

**Figura 21.** Micrografias obtidas por MEV dos biofilmes formados em corpos de provas de vidro no dia 43 de experimento. (a), (b) e (c) Sistema controle, e (d), (e) e (f) sistema magnético com ímãs em posição de repulsão.



**Figura 22.** Imagens da MCVL do biofilme formado em corpo de prova de vidro no dia 43 de experimento. (a) e (b) Sistema controle, e (c), e (d) sistema magnético com ímãs em posição de repulsão.



As micrografias obtidas por MEV corroboram os resultados obtidos na quantificação das BHT sésseis e nas análises de caracterização. O corpo de prova coletado no dia 43 (Figura 21a), correspondente ao sistema controle, mostrou a deposição de comunidades de microrganismos por toda a superfície, indicando a formação de biofilme com populações mais densas e distribuídas de maneira uniforme. Por outro lado, o corpo de prova coletado do sistema exposto ao campo magnético (Figura 21d), apesar de também apresentar células depositadas na sua superfície, apresenta uma quantidade razoavelmente inferior, com mais espaços livres e poucas comunidades, indicando que o campo magnético gerado por ímãs permanentes na posição de repulsão é capaz de reduzir a formação de biofilme em superfície.

Por fim, as imagens da MCVL utilizando o kit *live/dead* fornecem observações interessantes referente à deposição dos microrganismos na superfície dos corpos provas (Figura 22). A amostra do sistema controle (Figura 22a) apresentou mais pontos de fluorescência que do magnético (Figura 22b), ratificando as imagens obtidas na MEV. Além disso, percebe-se que o sistema controle apresenta pontos com coloração verde e vermelha, indicando a presença de células viáveis e inviáveis, respectivamente. Esse comportamento é comum do ciclo de formação do biofilme, principalmente quando atinge a fase de biofilme maduro (Figura 1), no qual as bactérias mais internas ao biofilme sofrem com a escassez de nutriente e oxigênio disponível ocasionando a morte celular.

Por outro lado, na amostra exposta ao campo magnético é possível perceber apenas pontos verdes (Figura 22c e 22d), sinalizando a presença apenas de células viáveis aderidas aos corpos de prova. Essa observação corrobora a hipótese de que o campo magnético permanente pode causar alterações na permeabilidade da membrana e conformação de compostos celulares (como enzimas), afetando o metabolismo e a produção de metabólitos, ainda no estado planctônico, de modo a dificultar sua adesão na superfície do corpo de prova, seja pelo estresse celular e/ou modificação na quantidade das SPE.

As Figuras 21 e 22 também mostram que o sistema controle apresentou a formação de um biofilme mais denso. Por outro lado, no sistema magnético as bactérias estão espalhadas e com pouca aglomeração, similar às fases iniciais do ciclo de formação do biofilme (Figura 1). Tal consideração reforça o efeito do campo magnético permanente no biofilme formado.

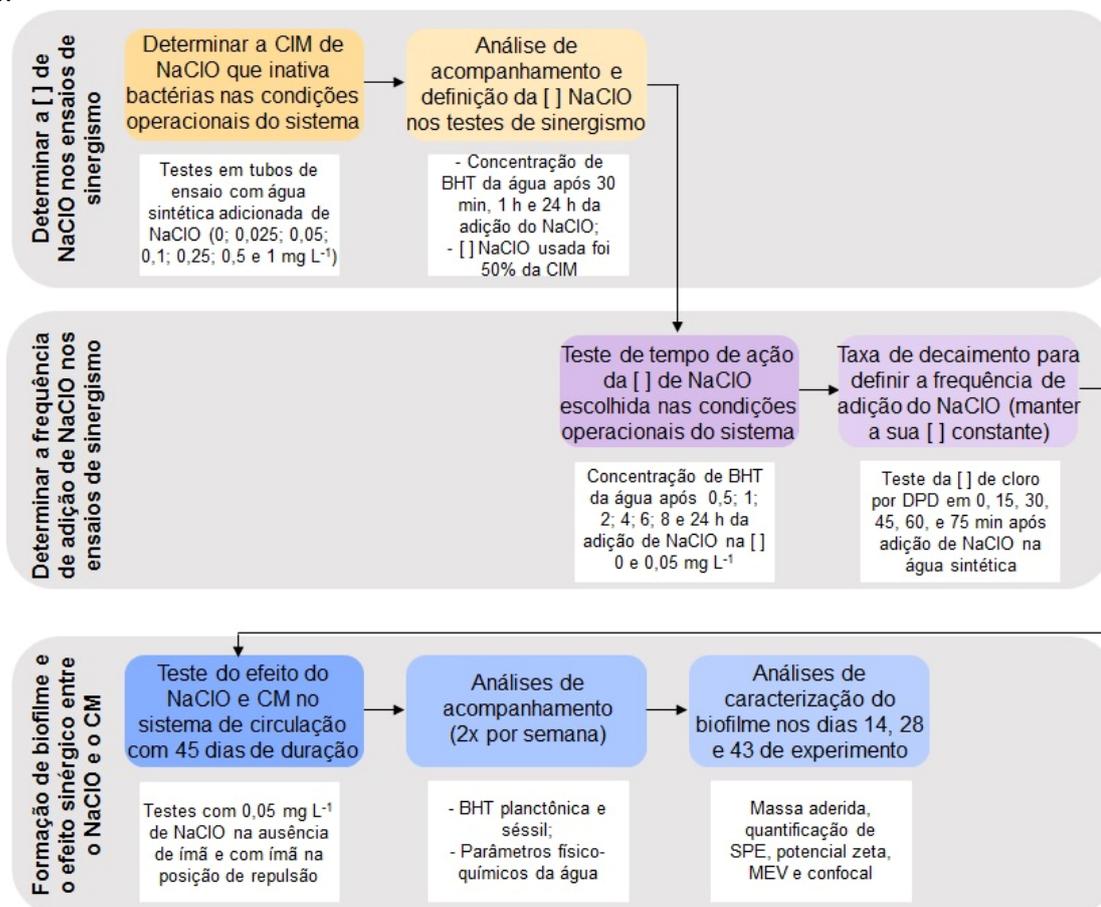
### 4.3. CONCLUSÕES PARCIAIS

Os resultados obtidos nesse capítulo mostraram que o uso de campo magnético permanente é capaz de controlar a formação de biofilme em superfícies que se assemelham às superfícies metálicas de sistemas de resfriamento. Entretanto, sua ação positiva no controle de bioincrustação depende da densidade de fluxo magnético utilizada. Os resultados mostraram que a aplicação do campo magnético permanente com densidades de fluxo 0,45 e 0,23 T e com ímãs na posição de repulsão resultaram em uma redução de 1 log na quantidade de BHT sésseis quando comparados ao sistema controle, que não foi exposto ao campo magnético. Os resultados também sugerem que o campo magnético não causa a morte celular e seu efeito positivo na redução do biofilme pode estar relacionado a uma possível modificação na membrana celular e/ou no metabolismo, acelerando a fase de decaimento celular das bactérias planctônicas e modificando a produção de metabólitos, como as SPE. Diante do exposto, o campo magnético permanente se mostrou uma alternativa promissora como método antibioincrustante em sistemas industriais.

## **5. AVALIAÇÃO DO USO DE HIPOCLORITO DE SÓDIO ASSOCIADO AO CAMPO MAGNÉTICO PERMANENTE NO CRESCIMENTO DE BIOFILME**

Este capítulo refere-se à investigação do efeito sinérgico entre o hipoclorito de sódio e o campo magnético gerado por ímãs permanentes na formação de biofilme em corpos de prova de vidro acoplados em tanque de circulação de água. Esta etapa atende aos seguintes objetivos específicos da presente tese, de acordo com a seção 1.2: estudar o efeito do hipoclorito de sódio sobre o crescimento de biofilme em corpos de prova de vidro instalados no sistema em escala de bancada na ausência e presença de campo magnético; caracterizar os biofilmes formados nos corpos de prova expostos ao hipoclorito de sódio na ausência e presença do campo magnético permanente em relação ao teor de sólidos totais, quantificação de SPE; potencial zeta, microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal de varredura a laser. A Figura 23 mostra o fluxograma de atividades realizadas nesse capítulo. Em seguida, os materiais e métodos e resultados obtidos nessa etapa do trabalho são apresentados. Esses dados foram utilizados para escrever um artigo o qual será submetido à revista da área.

**Figura 23.** Fluxograma das atividades realizadas referente aos testes apresentados no Capítulo 4 desta tese.



[ ]: concentração; NaClO: hipoclorito de sódio; CIM: concentração inibitória mínima; DPD: N,N-dietil-p-fenilenediamina; CM: campo magnético; BHT: bactérias heterotróficas totais; SPE: substâncias poliméricas extracelulares; MEV: microscopia eletrônica de varredura.

## 5.1. MATERIAIS E MÉTODOS

O uso de hipoclorito de sódio (NaClO) continua sendo a principal ferramenta para combater biofilmes em superfícies, assim como em equipamentos de sistemas de resfriamento (FLEMMING, 2020). Nesse sentido, no presente trabalho foi escolhido o NaClO como biocida para investigar o efeito sinérgico do uso deste com o campo magnético gerado por ímãs permanentes. Para tal, o trabalho foi dividido em três etapas:

- (1) determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do NaClO, em relação a cloro livre, na água de circulação sintética (composta por sais, diesel estabilizado com DSS e cultura mista de bactérias) e na mesma condição operacional (temperatura) dos ensaios no sistema de

circulação de água. Foi definido que a concentração de NaClO utilizada nos ensaios de formação de biofilme em corpos de prova de vidro seria 50% da CIM;

- (2) determinar o tempo de ação da concentração de NaClO definida na etapa 1 em relação à concentração das BHT presente na água sintética, e testes de decaimento da concentração de cloro livre residual, com a intuito de determinar a vazão de NaClO a ser adicionada na água de circulação para manter a concentração de cloro livre constante ao longo do tempo;
- (3) realizar os ensaios de formação de biofilme em corpos de prova de vidro acoplados no tanque de circulação de água para avaliar o efeito do NaClO na ausência e presença de ímãs permanentes.

Os métodos utilizados para a consecução das etapas 1, 2 e 3 estão descritos nos tópicos a seguir.

#### **5.1.1. Determinação da concentração inibitória mínima**

Os testes para determinação da CIM foram realizados com hipoclorito de sódio 12% (Casa dos Químicos Comércio de Produtos Químicos Ltda) e as concentrações de 0; 0,025; 0,050; 0,100; 0,250, 0,500 e 1,000 mg L<sup>-1</sup> de NaClO foram testadas. O trabalho realizado por Rathi; Satheesh (2012) foi utilizado como referência para determinar a CIM e os seguintes procedimentos foram realizados:

- (a) 20 mL de água sintética foram colocados em tubos de ensaios esterilizados, e os inóculos 1, 2 e 3, foram adicionados de modo a ter  $6 \times 10^3$  UFC mL<sup>-1</sup>, concentração média observada no dia 3 de experimento, que foi o dia escolhido para adicionar o NaClO na água de circulação dos sistemas em escala de bancada. Optou-se por adicionar o NaClO somente no dia 3 de experimento para que as células bacterianas se adaptassem ao meio e apresentassem crescimento celular;
- (b) no tubo com água sintética e com os inóculos foi adicionado NaClO a fim de atingir a concentração desejada (0; 0,025; 0,050; 0,100; 0,250; 0,500 ou

- 1,000 mg L<sup>-1</sup>) e realizada agitação por 30 s em vórtex para homogeneização da solução;
- (c) os tubos com água sintética, inóculo e NaClO foram colocados em shaker a 30 °C e 120 rpm (condições operacionais semelhantes ao ensaio de formação de biofilme em sistemas de circulação de água);
  - (d) após 0,5; 1 e 24 h da adição do NaClO no tubo, 100 µL de amostra foram coletados para determinar a concentração de BHT na água a partir do plaqueamento em meio PCA (item 3.1.6).

A CIM é considerada a menor concentração de NaClO capaz de causar a morte celular, ou seja, a partir dessa concentração não há crescimento celular. Assim, nesse estudo, a condição com 50% da CIM de NaClO foi fixada para realização dos ensaios de formação de biofilme nos sistemas de circulação de água em escala de bancada, com a intenção de que seja possível verificar a ação do NaClO sem inibir completamente a atividade metabólica das bactérias. Nesta primeira etapa, os ensaios foram realizados em duplicata e os plaqueamentos em triplicata. A amostra com 0 mg L<sup>-1</sup> de cloro livre foi a amostra sem adição de NaClO, usada como controle.

### **5.1.2. Tempo de ação e de decaimento do cloro residual livre**

Definida a concentração de NaClO que seria utilizada nos ensaios de formação de biofilme no sistema de circulação de água em escala de bancada (realizando os ensaios de CIM), então foi investigado como e com qual frequência deveria ser adicionado o NaClO para que a concentração de cloro livre se mantivesse constante ao longo dos experimentos. Para tal, ensaios de tempo de ação e decaimento do cloro livre na água sintética ao longo do tempo foram realizados.

Assim, primeiro foi determinado o tempo de ação que o NaClO na concentração escolhida teria nas bactérias presentes na água sintética. Os ensaios seguiram os mesmos procedimentos descritos no item 5.1.1, sendo que a concentração testada foi 0 (controle) e 0,05 mg L<sup>-1</sup> de cloro livre, e a coleta de amostra foi realizada em 0,5; 1; 2; 4; 6; 8 e 24 h após adição de NaClO na água sintética. O acompanhamento da ação do biocida nas células foi realizado pela concentração de BHT na água ao longo do

tempo por meio do plaqueamento em meio PCA (item 3.1.4). Os testes também foram realizados em duplicata e os plaqueamentos em triplicata.

Determinado o tempo de ação, a curva de decaimento do cloro residual livre foi determinada utilizando um kit colorimétrico rápido (Cloro total DPD, Permachem® Reagentes, Hach) baseado no método DPD (N,N-dietil-p-fenilenodiamina). Para realizar esta análise, 500 mL de água sintética com 0,05 mg L de cloro livre foram colocados em agitação a 30 °C e 120 rpm, no tempo 0, 15, 30, 45, 60 e 75 min após a adição do NaClO 20 mL de amostra foram coletados, adicionado o kit colorimétrico e feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro (Q898U2M5, Quimis) em 515 nm para determinação da concentração de cloro residual livre ao longo do tempo, utilizando como padrão NaClO. Os testes de decaimento foram realizados em triplicata.

### **5.1.3. Avaliação do efeito sinérgico do hipoclorito de sódio e do campo magnético permanente na formação de biofilme em corpos de prova de vidro**

Para avaliação do efeito sinérgico do hipoclorito de sódio com o campo magnético permanente no crescimento de biofilme em corpos de prova de vidro, os dois sistemas operaram simultaneamente. Destaca-se que, em ambos os sistemas foi adicionado NaClO na água de circulação, porém um estava na ausência de campo magnético (controle adicionado de biocida) e o outro com os 3 pares de ímãs acoplados na posição de repulsão na tubulação de entrada do tanque de circulação de água (sistema magnético adicionado de biocida).

O início, condução e tempo de duração dos experimentos seguiu os mesmos procedimentos do Capítulo 4 (item 4.1.1). Em relação ao NaClO, sua adição foi feita a partir do dia 5 de experimento com uma bomba dosadora peristáltica (Milan) para manter a concentração de 0,050 mg L<sup>-1</sup> de cloro livre constante durante todo o experimento (lembrando que a concentração de cloro livre foi determinada a partir dos ensaios de CIM).

Assim como no Capítulo 4, a evolução do crescimento do biofilme nos sistemas e a avaliação do efeito do NaClO e da sua associação com o campo magnético na formação de biofilme em corpos de prova de vidro foi acompanhada pela leitura dos parâmetros físico-químicos da água no tanque de circulação, e pela quantificação da

concentração das BHT na água de circulação e no corpo de prova (seguindo os procedimentos descritos no item 3.1.4). As análises de acompanhamento foram realizadas 2 vezes na semana, nos dias 0, 1, 3, 7, 10, 14, 17, 21, 24, 28, 31, 35, 38 e 43 de experimento. Além disso, nos dias 14, 28 e 43 foram feitas também as análises de caracterização das células aderidas nos corpos de prova, as quais estão descritas no item 5.1.4. Ressalta-se que os corpos de prova eram coletados na mesma posição em cada sistema, e os testes foram realizados em duplicata.

#### **5.1.4. Análises de caracterização**

Nesta etapa do trabalho, as análises de caracterização dos corpos de prova com células aderidas e da suspensão de células desprendidas foram: quantificação de massa aderida, quantificação de SPE, potencial zeta, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia confocal de varredura a laser (MCVL). Todas estas análises seguiram os mesmos procedimentos descritos no item 4.1.3.

#### **5.1.5. Análise estatística**

Os resultados foram apresentados em forma de média aritmética  $\pm$  o desvio padrão de duplicatas. A análise dos dados experimentais coletados referente à formação de biofilme em corpos de prova foi feita utilizando o teste de Tukey (significância de 5%) através do software Statistica 7 (StatSoft, EUA).

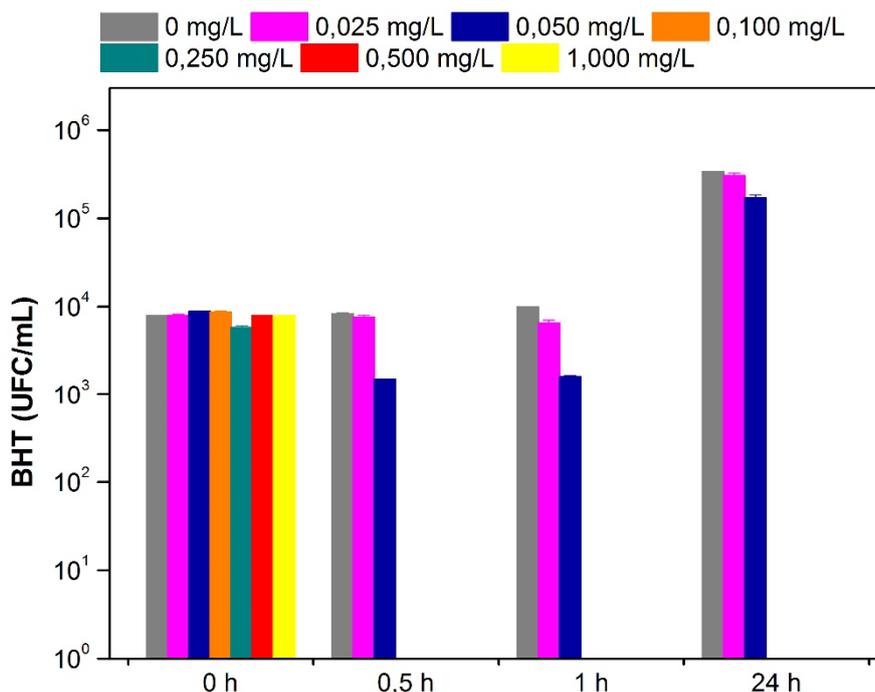
### **5.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **5.2.1. Concentração inibitória mínima**

Sete concentrações de NaClO, variando de 0 a 1 mg L<sup>-1</sup>, foram testadas para identificar qual sua concentração inibitória mínima (CIM), reproduzindo as mesmas condições operacionais dos ensaios de formação de biofilme no sistema de circulação

de água (água sintética,  $6 \times 10^3$  UFC mL<sup>-1</sup> de BHT e 30 °C), por meio da quantificação das BHT planctônicas durante 24 h. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 24.

**Figura 24.** Quantidade de bactérias presentes na água sintética, utilizando como fonte de carbono diesel estabilizado com 1% de DSS, na concentração 160 mg L<sup>-1</sup>, como inóculo cultura mista, com concentração inicial de  $6 \times 10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup>, e temperatura de 30 °C, em 0; 0,5; 1 e 24 h após a adição de NaClO com concentrações de: 0; 0,025; 0,050; 0,100; 0,250; 0,500 e 1,000 mg L<sup>-1</sup>.



Para as condições avaliadas, percebe-se que usando NaClO como biocida foi necessário utilizar concentrações iguais ou superiores a 0,100 mg L<sup>-1</sup> de cloro livre para ter inibição do crescimento celular a partir dos 30 min iniciais de experimento, ou seja, esta é considerada a CIM. Também é interessante destacar que a concentração de 0,025 mg L<sup>-1</sup> de cloro livre não causou nenhum efeito no crescimento celular, mantendo valores de concentração de BHT planctônicas semelhantes ao da amostra controle (0 mg L<sup>-1</sup>). Por outro lado, a concentração de 0,050 mg L<sup>-1</sup> de cloro livre reduziu em 80% a quantidade de BHT planctônica em comparação com a amostra controle nos primeiros 30 min de experimento.

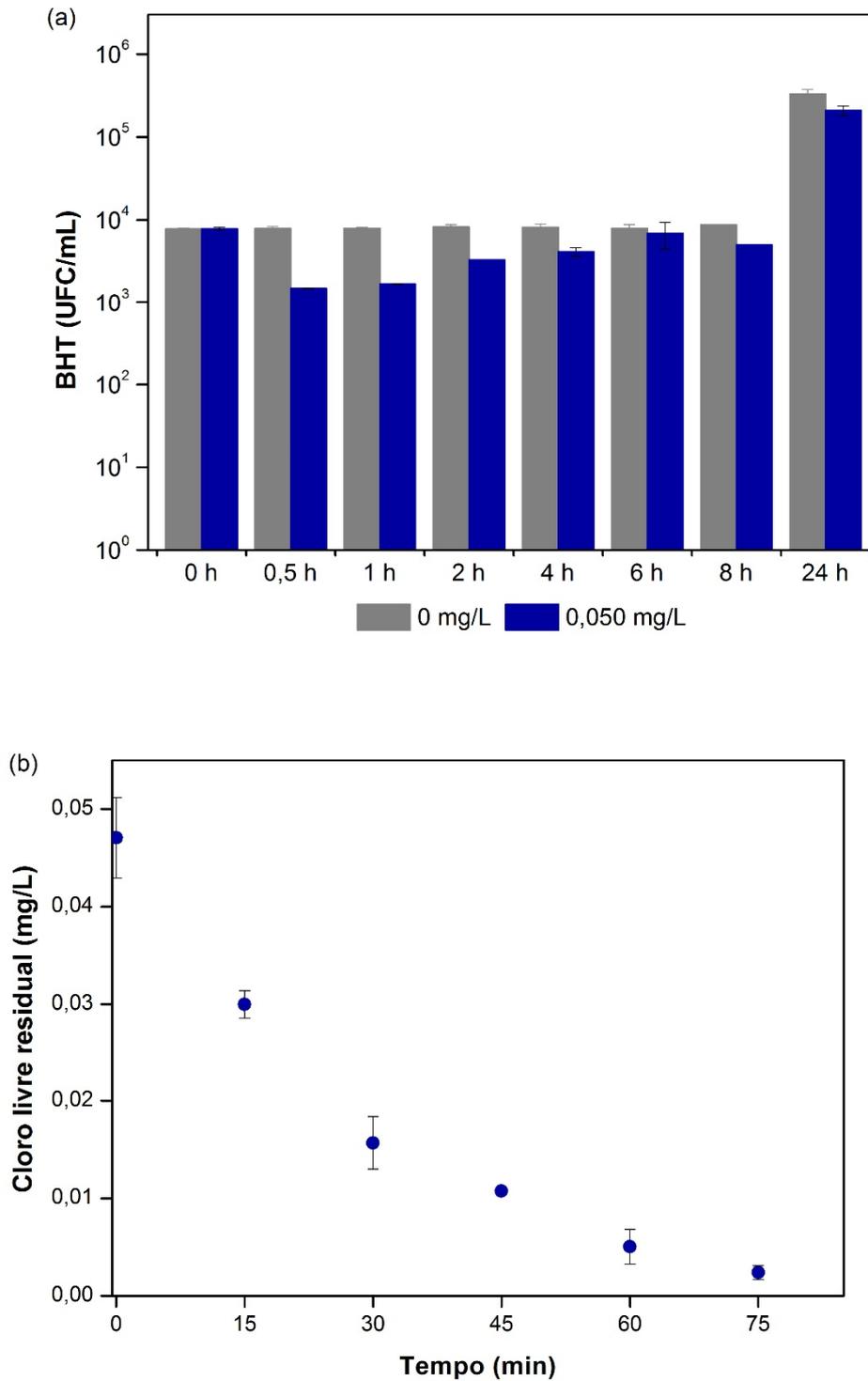
De acordo com a literatura, as concentrações de NaClO utilizadas para prevenção à formação de biofilmes em superfícies de equipamentos industriais variam entre 0,1 e 2 mg/L de cloro livre (AL-BLOUSHI *et al.*, 2017, 2018a; EGUÍA *et al.*, 1998;

SIMON *et al.*, 2014; SWARAJ *et al.*, 2013). Se for possível reduzir essas concentrações de NaClO mantendo um efeito positivo na redução de biofilme quando associado ao campo magnético seria uma vantagem, uma vez que utilizar uma quantidade menor de produto químico irá refletir em menores custos operacionais e minimizar possíveis impactos ambientais. Desta forma, a concentração de 0,050 mg L<sup>-1</sup> de cloro livre (50% da CIM) foi escolhida para a realização dos ensaios de avaliação do uso combinado de NaClO e campo magnético permanente no controle de formação de biofilme, uma vez que reduziu o crescimento celular sem inibir totalmente.

### **5.2.2. Tempo de ação e decaimento da concentração de cloro residual livre**

A concentração de cloro residual livre tende a decair com o passar do tempo devido à formação de compostos organoclorados, e os efeitos de volatilização e autodegradação do cloro, de modo a perder efetividade da ação biocida (VEIGA, 2010). Assim, o tempo de ação do cloro residual livre utilizando 0,050 mg L<sup>-1</sup> de cloro livre em relação às BHT planctônicas e a curva de decaimento da concentração de cloro residual livre ao longo do tempo, mantendo as condições operacionais dos sistemas de circulação de água, foram avaliados e os resultados são apresentados na Figura 25.

**Figura 25.** (a) Quantidade de bactérias presentes na água sintética, utilizando como fonte de carbono diesel estabilizado com 1% de DSS, na concentração 160 mg/L, inóculo composto por cultura mista, com concentração inicial de  $6 \times 10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup>, e temperatura de 30 °C, em 0; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8 e 24 h após a adição de NaClO com concentrações de 0 e 0,05 mg/L. (b) Tempo de decaimento da concentração de cloro livre residual na água sintética.



Pela Figura 25a é possível observar que utilizando  $0,05 \text{ mg L}^{-1}$  de cloro livre uma redução significativa na concentração das BHT planctônicas se manteve até a primeira hora de experimento, representando uma queda de 80% em comparação com a controle. Para as condições avaliadas esse resultado sugere que 1 h é o tempo de ação do biocida e após esse período seria necessária uma nova adição para manter o controle de crescimento. A Figura 25b mostra o decaimento da concentração de cloro residual livre ao longo do tempo, para o mesmo ensaio, e os resultados confirmam que o tempo de ação dura em média 1 h, visto que após 75 min ocorreu decaimento em torno de 95% da concentração de cloro livre residual. O trabalho realizado por Veiga (2010), que foi referência para definir a composição da água sintética utilizada nessa tese, também apresentou comportamento semelhante no decaimento de cloro residual livre. Essas informações foram fundamentais para monitorar as condições operacionais, e determinar a vazão de solução de NaClO a ser adicionada em cada sistema de circulação de água com a finalidade de manter uma concentração próxima a  $0,050 \text{ mg L}^{-1}$  de cloro livre na água sintética ao longo dos experimentos de formação de biofilme.

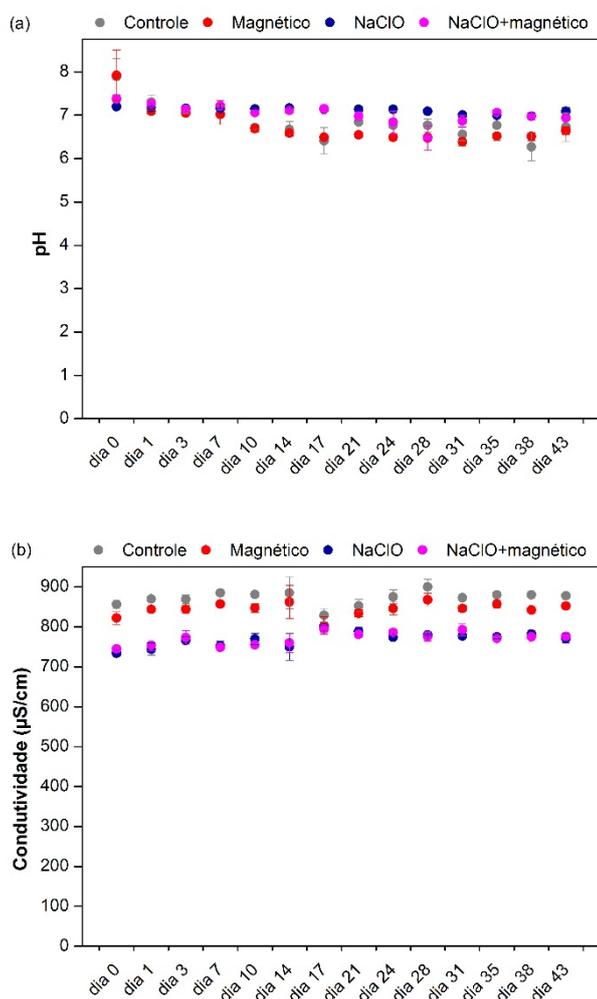
### **5.2.3. Avaliação do efeito da associação de NaClO e campo magnético no controle da bioincrustação**

Como mencionado na seção de Materiais e Métodos (item 5.1.3), os ensaios para avaliar o efeito do uso associado de biocida (NaClO) e campo magnético permanente no controle da formação de biofilme em superfície tiveram 45 dias de duração e o NaClO foi adicionado a partir do quinto dia de experimento. Durante este período, o acompanhamento da concentração de cloro residual livre na água de circulação foi realizado a partir de coletas de amostra no tanque de circulação dos dois sistemas (com NaClO na presença e ausência de campo magnético), utilizando o kit colorimétrico rápido baseado no método DPD (o mesmo para determinar o decaimento da concentração de cloro residual livre). A Figura 6A do Apêndice apresenta as fotos desse acompanhamento nos dias 5, 7, 14, 28 e 43 de experimento e os resultados da concentração de cloro livre na água sintética, a qual se manteve com valor médio de  $0,054 \pm 0,004 \text{ mg L}^{-1}$  de cloro livre.

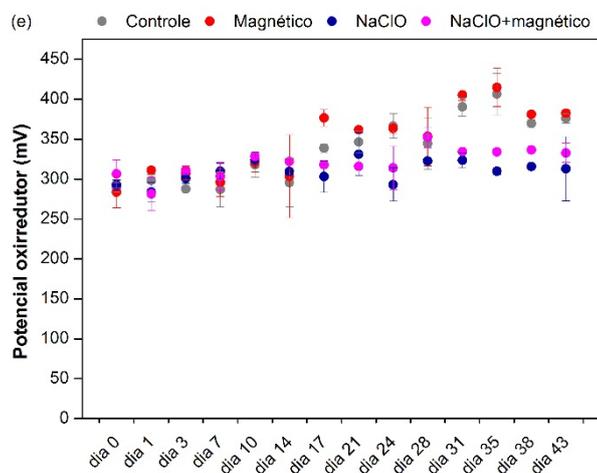
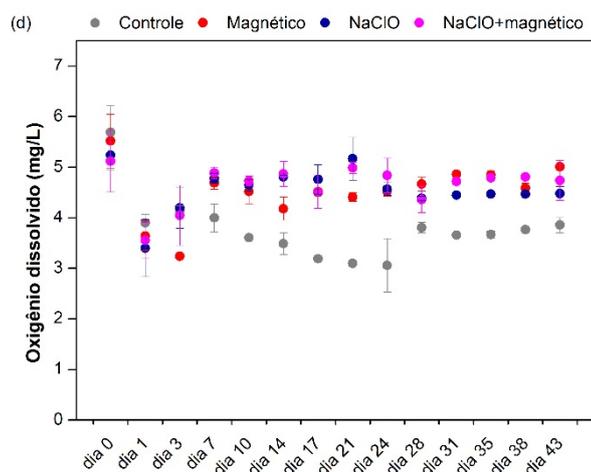
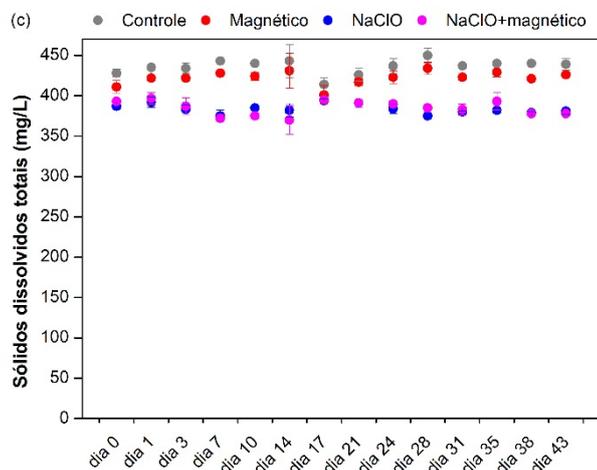
### 5.2.3.1. Parâmetros físico-químicos da água

Os valores dos parâmetros físico-químicos da água sintética de circulação com adição de NaClO, na presença e ausência do campo magnético permanente, foram acompanhados ao longo dos 45 dias de experimento e são mostrados na Figura 26.

**Figura 26.** Parâmetros físico-químicos da água de circulação no tanque de corpos de prova do sistema controle, magnético, NaClO e NaClO com campo magnético, utilizando como fonte de carbono diesel estabilizado com 1% de DSS, na concentração 160 mg/L (adição nos dias 0, 14 e 28), como inóculo cultura mista, com concentração inicial de  $5 \times 10^2$  UFC.mL<sup>-1</sup>, vazão de 50 L.h<sup>-1</sup> e temperatura de 30 °C. (a) pH, (b) condutividade, (c) sólidos dissolvidos totais, (d) oxigênio dissolvido, e (e) potencial oxirredutor.



**Continuação Figura 26.** Parâmetros físico-químicos da água de circulação no tanque de corpos de prova do sistema controle, magnético, NaClO e NaClO com campo magnético, utilizando como fonte de carbono diesel estabilizado com 1% de DSS, na concentração 160 mg/L (adição nos dias 0, 14 e 28), como inóculo cultura mista, com concentração inicial de  $5 \times 10^2$  UFC.mL<sup>-1</sup>, vazão de 50 L.h<sup>-1</sup> e temperatura de 30 °C. (a) pH, (b) condutividade, (c) sólidos dissolvidos totais, (d) oxigênio dissolvido, e (e) potencial oxirredutor.



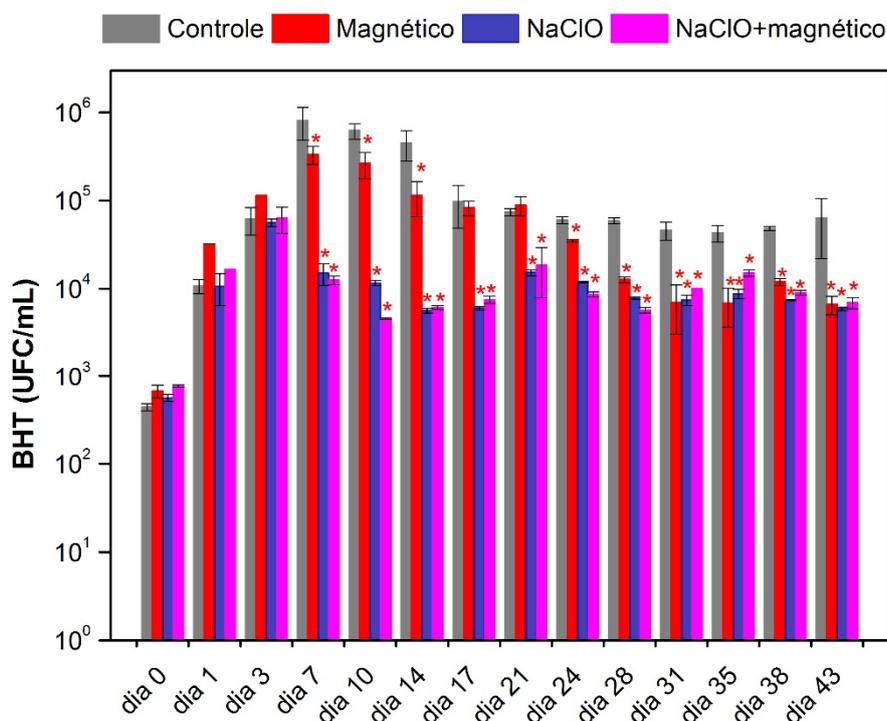
A partir da Figura 26 pode-se observar que a adição do NaClO, na concentração de 0,05 mg L<sup>-1</sup>, não alterou expressivamente os valores de pH, condutividade, sólidos dissolvidos totais e potencial oxirredutor. Todos os parâmetros citados apresentaram valores próximos ao esperado para as condições trabalhadas e semelhantes no decorrer do experimento, independentemente do sistema ter a presença ou ausência de biocida e/ou campo magnético, mantendo as características da água sintética.

Por outro lado, a concentração de oxigênio dissolvido no sistema controle (ausência de NaClO e campo magnético) apresentou uma queda representativa, a partir do dia 7, em relação aos demais sistemas. Provavelmente, essa queda mais acentuada está relacionada ao crescimento celular na água de circulação, pois foi o sistema que apresentou a maior concentração de BHT planctônicas (Figura 27), o que reflete em uma maior demanda de oxigênio.

#### *5.2.3.2. Concentração de BHT planctônicas e sésseis*

A concentração de BHT presentes na água de circulação (planctônicas) e depositadas nos corpos de prova (sésseis), determinada por meio de plaqueamento em meio PCA, foi utilizada como parâmetro de acompanhamento dos ensaios e formação do biofilme. A Figura 27 apresenta os resultados obtidos para as BHT planctônicas nos sistemas: (i) controle (ausência de NaClO e campo magnético), (ii) magnético (ausência de NaClO e presença de campo magnético), (iii) NaClO (presença de NaClO e ausência de campo magnético), e (iv) NaClO+magnético (presença de NaClO e campo magnético).

**Figura 27.** Quantidade BHT planctônicas presentes na água de circulação do sistema controle, magnético, NaClO e NaClO com campo magnético, utilizando como fonte de carbono diesel estabilizado com 1% de DSS, na concentração 160 mg/L (adição nos dias 0, 14 e 28), como inóculo cultura mista, com concentração inicial de  $5 \times 10^2$  UFC.mL<sup>-1</sup>, vazão de 50 L.h<sup>-1</sup> e temperatura de 30 °C. \* Valores com diferença significativa em comparação com a amostra controle para cada dia do experimento ( $p < 0,05$ ).



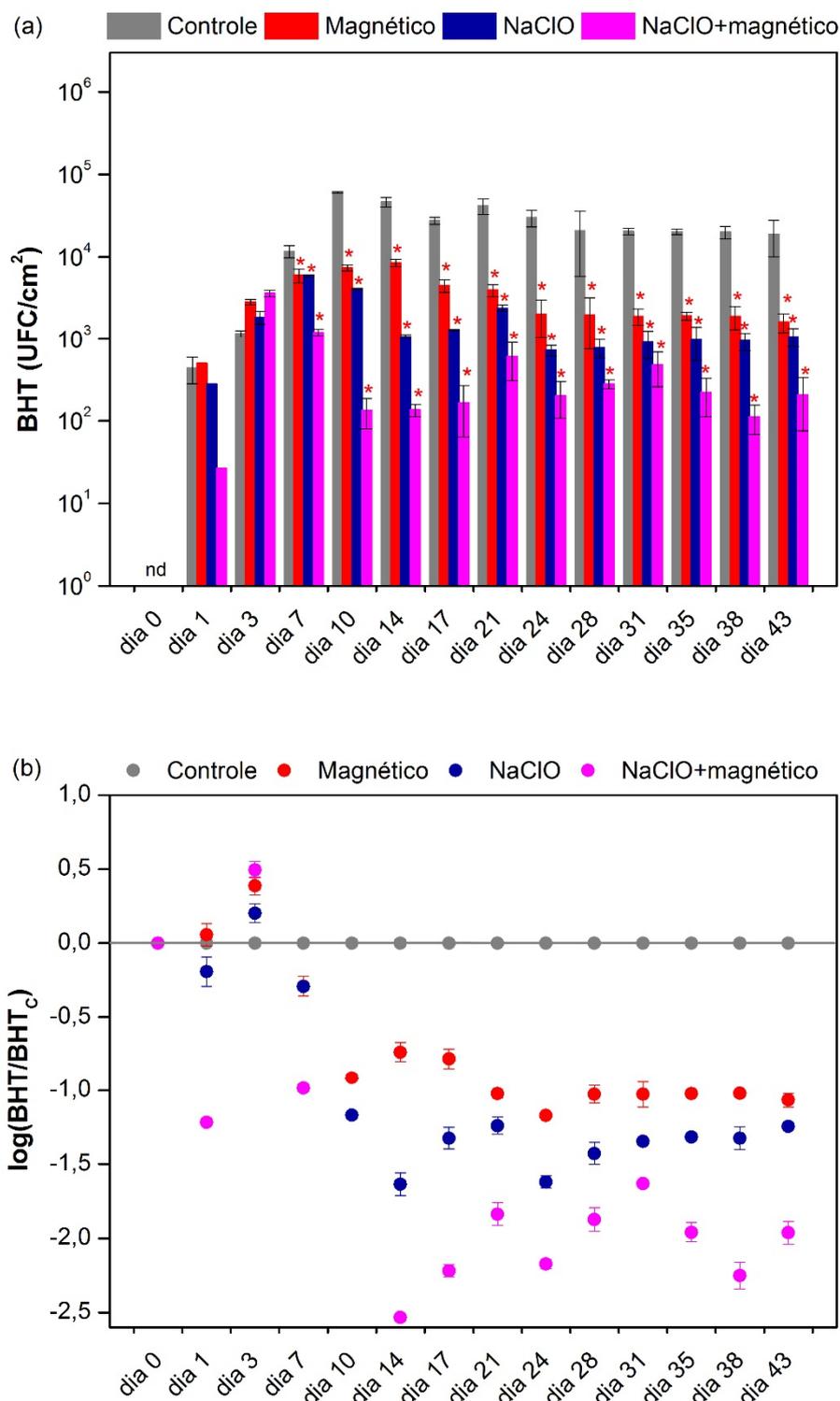
Após adição do NaClO na água sintética de circulação, observou-se uma queda expressiva na quantidade de BHT planctônicas tanto na presença quanto na ausência de campo magnético, chegando a uma redução aproximada de 95% quando comparado com o sistema controle (resultados a partir do dia 7). Tal resultado mostra que a manutenção da concentração de 0,050 mg L<sup>-1</sup> de cloro livre até o final do experimento nos dois sistemas avaliados foi capaz de reduzir o crescimento microbiano, provavelmente devido à morte celular.

O uso apenas do campo magnético não causou um efeito expressivo na quantidade de BHT planctônicas no início do experimento, a ação biocida do NaClO, por sua vez, prevaleceu sobre as bactérias em seu estado livre a partir do momento de sua adição. O NaClO é o biocida mais utilizado nos sistemas industriais para desinfecção de água. Sua ação biocida está diretamente ligada ao ácido hipocloroso (HOCl), agente oxidativo poderoso, capaz de se difundir pela parede celular do microrganismo, reagindo com proteínas e desativando enzimas, causando a morte celular. Trabalhos da literatura avaliaram seu uso no tratamento de águas de sistemas

de resfriamento, e os resultados foram semelhantes ao obtidos nesse estudo, chegando a reduções em torno de 99% da concentração de microrganismos presentes na água (AL-BLOUSHI *et al.*, 2018b; SIMON *et al.*, 2014).

Os resultados da concentração de BHT sésseis e os valores do log da razão entre as BHT sésseis de cada sistema e as BHT sésseis do sistema controle em cada dia de análise são apresentados na Figura 28. Destaca-se que, a partir do dia 10 de experimento, a adição do NaClO na água de circulação potencializou a queda da concentração de BHT sésseis desprendidas dos corpos de prova, independentemente da presença do campo magnético, sugerindo redução do biofilme formado na superfície dos corpos de prova.

**Figura 28.** Quantidade de bactérias aderidas aos corpos de prova de vidro do sistema controle, magnético, NaClO e NaClO com campo magnético, utilizando como fonte de carbono diesel estabilizado com 1% de DSS, na concentração 160 mg/L (adição nos dias 0, 14 e 28), como inóculo cultura mista, com concentração inicial de  $5 \times 10^2$  UFC.mL<sup>-1</sup>, vazão de 50 L.h<sup>-1</sup> e temperatura de 30 °C. (a) BHT sésseis, e (b) log da razão entre BHT sésseis e BHT sésil do sistema controle para cada dia de experimento. \* Valores com diferença significativa em comparação com a amostra controle para cada dia do experimento ( $p < 0,05$ ). nd: não detectado.



Pela Figura 28a é possível observar que a adição de NaClO na água de circulação resulta em uma redução média de 1,5 log em relação as BHT sésseis do sistema controle, e quando essa adição está associada ao campo magnético permanente os resultados mostram uma queda em torno de 2 log das BHT sésseis quando comparadas com o controle. Pela Figura 28b é evidente o efeito positivo no controle de células aderidas nos corpos de prova para todos os tratamentos realizados. Tais resultados demonstram que todos os tratamentos avaliados são capazes de reduzir o número de células aderidas, porém o uso associado do biocida com o campo magnético permanente mostrou intensificar significativamente a ação de controle da formação do biofilme. Em síntese, comparando com os outros tratamentos, o uso combinado dos dois métodos (NaClO e campo magnético permanente) resultou em uma grande queda nas bactérias em estado livre e em uma maior redução na quantidade de bactérias sésseis, a partir do 10º dia de experimento, principalmente.

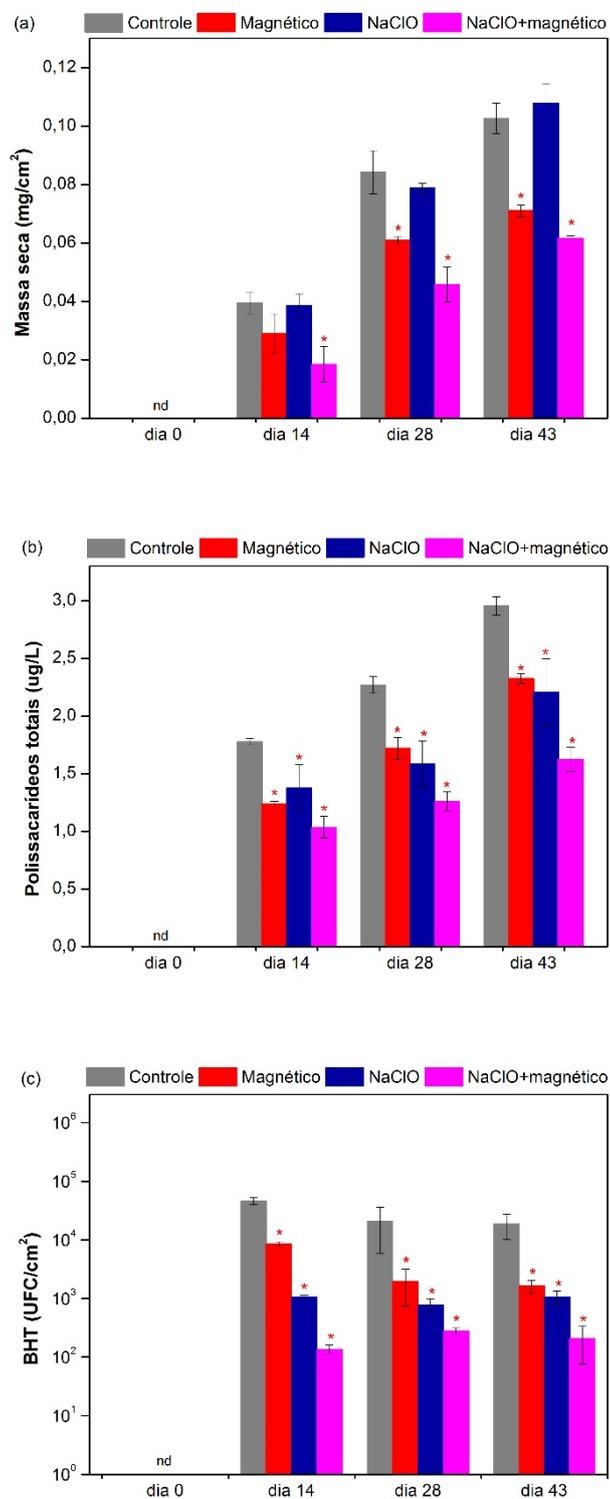
Analisando as Figuras 27 e 28, percebe-se que ao adicionar o NaClO na água, as bactérias planctônicas são as primeiras a sofrerem a ação biocida, com redução acentuada dos seus valores, o que pode ter interferido de modo direto na quantidade de células viáveis capazes de aderir na superfície. Além disso, trabalhos demonstraram que o campo magnético gerado por ímãs permanentes é capaz de modificar o metabolismo e/ou a estrutura da membrana celular, reflexo das propriedades diamagnéticas dos componentes biológicos, não causando a morte celular, mas afetando a produção de compostos metabólitos (como as SPE, proteínas e enzimas) e controlando o crescimento de células (BANDARA *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2017; MASOOD, 2017; ROSEN, 2003; TENG, 2005; WAGNER *et al.*, 2016). Apesar de não ter nenhum trabalho semelhante na literatura que tenha investigado a associação desses dois métodos, as observações realizadas sugerem que a potencialização na queda das BHT sésseis obtida pelo uso conjunto de biocida e campo magnético permanente foi resultado da ação combinada do biocida sobre a viabilidade celular das bactérias planctônicas e por possíveis alterações causadas pelo campo magnético na permeabilidade da membrana e no metabolismo das células viáveis restantes, dificultando a adesão dessas células na superfície dos corpos de prova, indicado pela diminuição acentuada na quantidade de células sésseis em comparação com o controle e ao longo dos ensaios.

A redução de 2 casas logarítmicas na concentração de células sésseis devido à associação dos dois métodos é um excelente resultado, pois indica que com o campo magnético é possível utilizar uma menor concentração de NaClO mantendo a eficácia no controle da formação de biofilme, sendo vantajoso tanto em termos de custo operacional quanto em relação aos danos ambientais. Para confirmar a potencialização do efeito associado entre NaClO e o campo magnético permanente e dar embasamento à hipótese sugerida, análises de caracterização do biofilme formado na superfície dos corpos de prova expostos aos diferentes tratamentos foram realizadas e os resultados obtidos são apresentados no próximo tópico desse capítulo.

#### *5.2.3.3. Caracterização do biofilme formado*

A Figura 29 apresenta os resultados de massa aderida nos corpos de prova e da concentração de polissacarídeos totais da amostra de biofilme desprendido dos corpos de prova. Todas essas análises foram realizadas nos dias 14, 28 e 43 de experimento para cada sistema avaliado.

**Figura 29.** (a) Massa aderida, (b) Concentração de polissacarídeos totais obtida das SPE extraídas do biofilme, e (c) BHT sésséis dos corpos de prova do sistema controle, magnético, NaClO e NaClO com campo magnético, nos dias 0, 14, 28 e 43 de experimento. \* Valores com diferença significativa em comparação com a amostra controle para cada dia do experimento ( $p < 0,05$ ). nd: não detectado.



A quantificação da massa seca aderida em corpos de prova é uma análise rápida e pode fornecer indicativos de uma possível ação dos tratamentos aplicados

nos sistemas na incrustação de superfícies. Comparando com o controle, os dois sistemas expostos ao campo magnético permanente foram os que apresentaram uma diferença expressiva na quantidade de massa aderida, tendo uma redução em torno de 30% no dia 43 para os dois sistemas (Figura 29a).

A incrustação em superfícies não é relacionada apenas à matéria orgânica de natureza biológica, mas também pelo acúmulo de materiais de diversas naturezas. A queda expressiva observada apenas nos sistemas expostos ao campo magnético sugere que a incrustação está atrelada provavelmente a um maior acúmulo de diesel na superfície, do que a quantidade de célula aderida, uma vez que o sistema com NaClO apresentou uma quantidade semelhante de BHT sésseis em relação ao sistema exposto ao campo magnético (Figura 29c). Além disso, a adição do NaClO não se mostrou um fator chave para reduzir a incrustação.

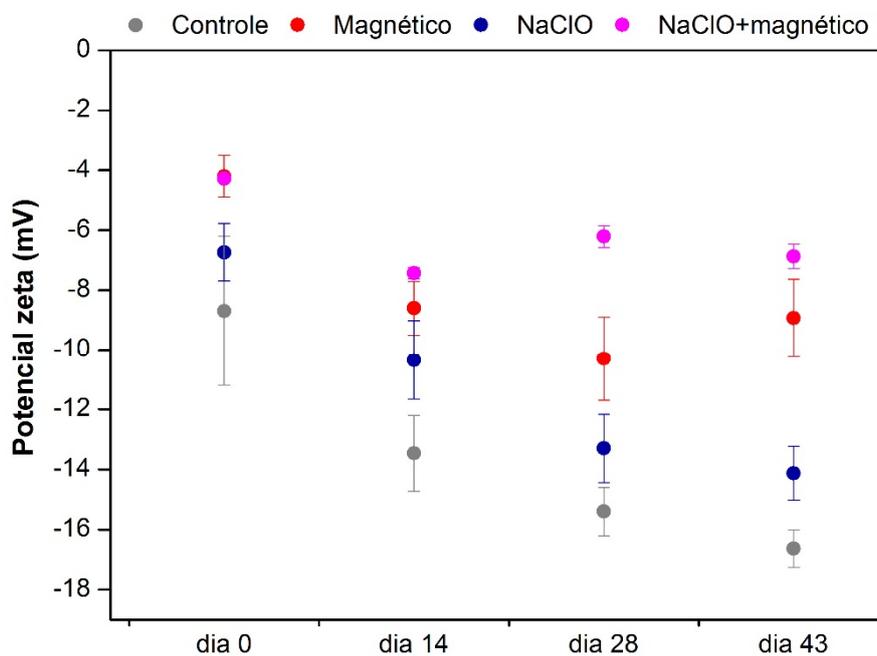
De modo geral, é consenso na literatura que campos magnéticos alteram conformações de moléculas e reduzem principalmente a incrustação inorgânica (HAN *et al.*, 2018; IMBROGNO *et al.*, 2018; LIPUS *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2021; SILVA *et al.*, 2019; TIGGEMANN *et al.*, 2018). Os resultados nesse trabalho sugerem que o campo magnético também pode ter gerado algum efeito sobre os componentes e características da água sintética (Figura 4A do Apêndice), auxiliando na redução da massa aderida em corpos de prova, independente do material biológico presente no meio.

A determinação da concentração de SPE presente no biofilme formado é importante em ensaios de controle de formação de biofilme. Nesse estudo a quantificação de SPE foi realizada de modo indireto por meio da determinação da concentração de polissacarídeos totais extraídos da solução com células desprendidas dos corpos de prova. Os resultados da Figura 29b demonstram que a associação do NaClO com o campo magnético potencializou a redução da concentração de polissacarídeos totais, passando de 25 para 45% de queda, comparado ao sistema controle, entre os dias 14 e 43 de experimento. Essa redução significativa e o resultado de contagem de BHT sésseis indicam uma menor quantidade de células aderidas na superfície dos corpos de prova. Essas observações corroboram a hipótese de que a ação do NaClO com o campo magnético permanente potencializa o efeito de controle de formação de biofilme em superfícies, podendo ser reflexo tanto do efeito que o NaClO causa na viabilidade das células livres quanto de possíveis modificações em componentes celulares e no metabolismo das células

viáveis remanescentes pelo campo magnético, afetando os compostos metabólitos produzidos, como as SPE, o que dificulta a formação de biofilme em superfície..

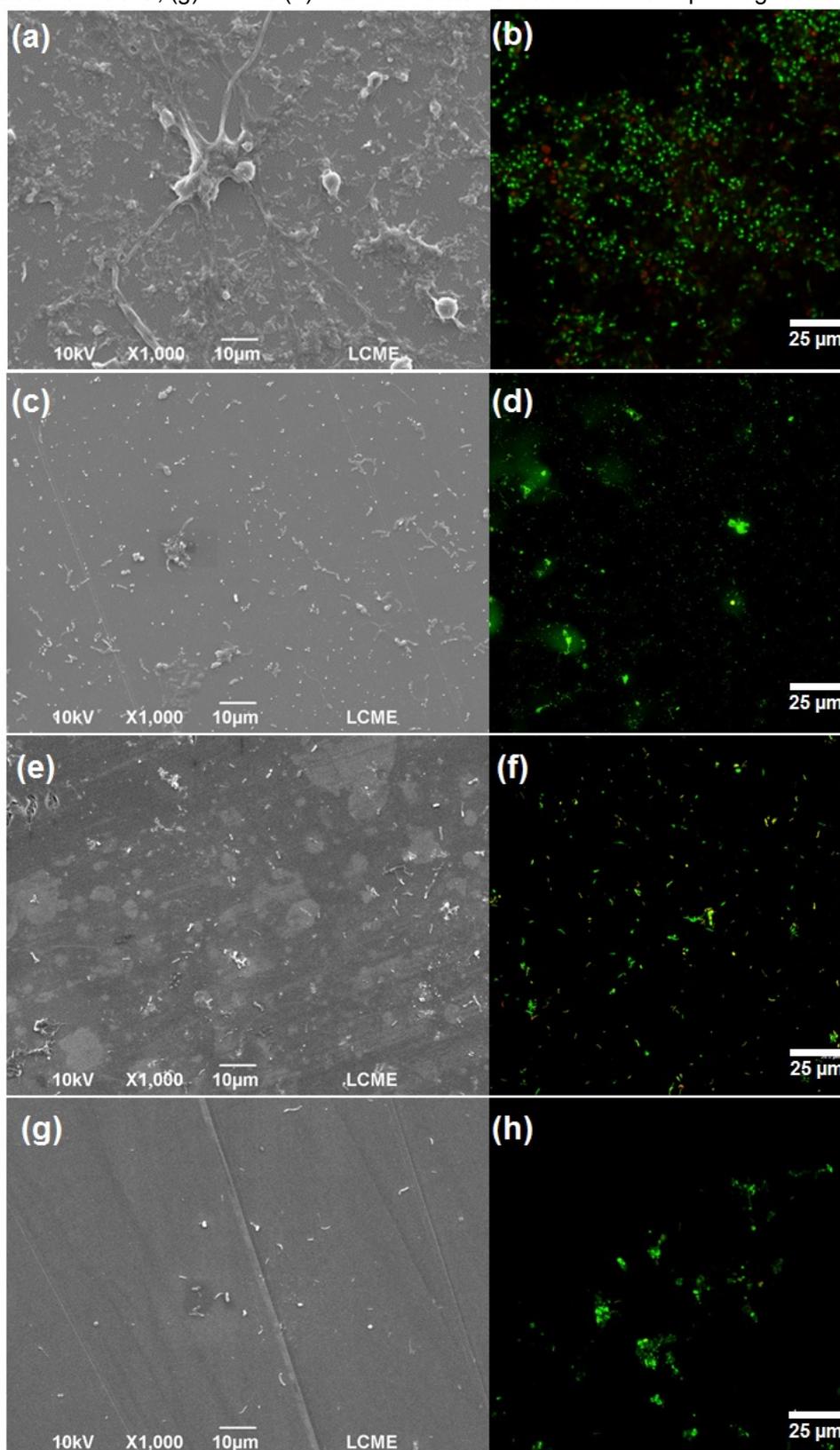
O potencial zeta da solução com biofilme desprendido foi afetado significativamente com o uso de diferentes tratamentos (Figura 30). Percebe-se que os sistemas que não estão expostos ao campo magnético permanente (controle e NaClO) apresentam mais cargas superficiais negativas. Alguns fatores podem ter contribuído para esse resultado considerando que a incrustação nos corpos de prova é resultado da deposição de células e diesel. O potencial zeta da solução de diesel é mais negativo (Figura 5A do Apêndice) atrelado ao fato que os sistemas com ausência de campo magnético apresentaram maior quantidade de massa aderida (Figura 29a), esses resultados sugerem uma maior deposição de diesel nos corpos de prova dos sistemas controle e com adição de NaClO na ausência de campo magnético, contribuindo para cargas superficiais mais negativas. Além disso, é interessante destacar que a quantidade de bactérias e de SPE produzida também podem interferir no valor de potencial zeta, uma vez que possuem cargas superficiais negativas, contribuindo para um potencial zeta mais negativo (HALDER *et al.*, 2015; LUO *et al.*, 2020; WILSON *et al.*, 2001; ZAIDI; MUDA; SILLANPÄÄ, 2019). Esse resultado também corrobora a hipótese da alteração na permeabilidade da membrana e no metabolismo celular na presença do campo magnético, afetando a produção dos metabólitos, como as SPE, uma vez que os dois sistemas expostos ao campo magnético apresentaram as menores quantidades de cargas negativas, sugerindo que essas modificações podem causar alterações tanto no tipo de substâncias excretadas pelas células, quanto na quantidade produzida.

**Figura 30.** Potencial zeta do biofilme extraído em água salina 0,85% estéril dos corpos de prova do sistema controle, magnético, NaClO e NaClO com campo magnético, nos dias 0, 14, 28 e 43 de experimento.



Para visualizar a distribuição de células na superfície dos corpos de prova e sustentar as hipóteses levantadas neste trabalho, análises de MEV e microscopia confocal foram realizadas para todos os sistemas avaliados no dia 43 de experimento. As imagens obtidas podem ser observadas na Figura 31.

**Figura 31.** Imagens do biofilme formado em corpos de prova de cada sistema no dia 43 de experimento. (a) MEV e (b) MCVL do sistema controle, (c) MEV e (d) MCVL do sistema magnético, (e) MEV e (f) MCVL do sistema NaClO, (g) MEV e (h) MCVL do sistema NaClO com campo magnético.



As micrografias do MEV mostram que todos os tratamentos realizados para o controle da formação de biofilme em superfície foram positivos (Figuras 31a, c, e, g). Porém, nos corpos de provas do sistema onde foi associado o uso de campo magnético permanente e o NaClO praticamente não houve adesão de células, o que corrobora os resultados obtidos na quantificação das BHT sésses e nas análises de caracterização, indicando que a associação dos dois métodos potencializou o efeito no controle da bioincrustação em superfícies.

Por fim, pela microscopia confocal utilizando o *kit live/dead* foi possível obter imagens fluorescentes das células depositadas (Figuras 31b, d, f, h). Assim como no MEV, as amostras expostas ao tratamento para controle da bioincrustação apresentaram menos pontos fluorescentes em comparação com a amostra controle, sendo que a amostra exposta ao NaClO e campo magnético permanente praticamente não apresentou pontos fluorescentes. A amostra controle apresentou pontos com coloração verde (células viáveis) e com coloração vermelha (células não viáveis), comportamento esperado em um biofilme mais denso e principalmente maduro, uma vez que as células localizadas no interior da estrutura do biofilme possuem menos disponibilidade de nutriente e oxigênio dissolvido, causando a morte celular. Por outro lado, as amostras expostas aos tratamentos, inclusive dos sistemas adicionados de NaClO, apresentaram apenas pontos com coloração verde, indicando a presença apenas de células viáveis no biofilme formado. Tal comportamento pode ser consequência de um biofilme com baixa quantidade de bactéria e praticamente sem aglomeração celular (Figura 31).

Essas observações também corroboram a hipótese de que o campo magnético é capaz de alterar estruturas celulares, afetando o crescimento celular e a produção de metabólitos, e assim dificulta a adesão das células na superfície dos corpos de prova. Em relação ao NaClO, apesar de ser um biocida altamente oxidativo, segundo Wagner; Brumelis; Gehr (2002), quando a água de resfriamento é tratada com uma baixa concentração de biocida, a taxa de decaimento é mais alta e o efeito principal se dá sobre as bactérias planctônicas. Some-se a isso o fato de que a adesão de células em superfícies envolve a formação das SPE, as quais funcionam como barreira protetora e dificultam a difusão do biocida para as células microbianas que formam o biofilme, e isso pode ter contribuído para não se ter observado células não viáveis no biofilme formado na presença de NaClO.

De acordo com as observações realizadas, todos os resultados corroboram a potencialização do uso conjunto de NaClO com o campo magnético permanente nas condições avaliadas para controle da bioincrustação em corpos de prova. Essa intensificação no efeito pode ser justificada pela ação do NaClO na viabilidade celular das bactérias planctônicas, reduzindo a concentração na água e pela ação do campo magnético que pode alterar estruturas celulares, como a permeabilidade da membrana, e o metabolismo, de modo a interferir na produção de metabólitos, como as SPE.

### 5.3. CONCLUSÕES PARCIAIS

A associação do campo magnético permanente com o NaClO potencializou o efeito de controle da formação de biofilme em superfícies que simulam superfícies de equipamentos de sistema de resfriamento. Os resultados demonstraram que, nas condições testadas, quando se utiliza um método isoladamente a redução na quantidade de BHT sésséis foi em média 80% e quando as duas técnicas são utilizadas em conjunto obteve-se uma queda de 2 log, em comparação com o sistema controle (ausência de NaClO e campo magnético). De acordo com as observações realizadas, sugere-se que a maior redução no número de células aderidas foi possível devido à ação do biocida sobre as bactérias planctônicas e a modificação na permeabilidade da membrana e o metabolismo das bactérias expostas ao campo magnético permanente. Diante do exposto, o uso associado de NaClO e campo magnético permanente se mostrou uma alternativa promissora para o controle da bioincrustação em superfícies de sistemas de resfriamento industriais.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

### 6.1. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos ao longo deste trabalho mostraram que a aplicação dos campos magnéticos permanentes em posição de atração com densidade de fluxo magnético de 0,45 ou 0,23 T, ou com ímã na posição de repulsão (com densidade de fluxo magnético de 0,18 T na parede da tubulação) resultou em uma redução de 1 log na quantidade de BHT sésseis quando comparado ao sistema controle, nas condições avaliadas. Os resultados das análises de caracterização sugerem que o campo magnético pode ter alterado estruturas celulares, como a permeabilidade da membrana, e a produção de compostos metabólitos, o que pode ter refletido nas SPE, dificultando a adesão das células na superfície dos corpos de prova.

Ao utilizar o campo magnético permanente em conjunto com a adição de NaClO na água de circulação, mesmo que em baixa concentração, o efeito na redução das BHT sésseis foi potencializado, passando de 1 para 2 log a redução de células aderidas nos corpos de prova em relação ao sistema controle. Esse resultado indica a ação imediata que o NaClO gerou nas bactérias planctônicas (reduzindo a viabilidade celular) somada às possíveis alterações que o campo magnético permanente pode causar em estruturas celulares, refletindo na produção de metabólitos, dificultando a adesão de células em superfícies.

Por fim, o campo magnético gerado por ímãs permanentes se mostrou uma técnica eficaz na redução de bactérias sésseis e, além de ser considerado um método no controle de incrustação salina, também pode ser considerado uma alternativa promissora na redução de bioincrustação em sistemas de resfriamento industriais.

### 6.2. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

- I. Avaliar a ação do campo magnético permanente na ampliação de escala e com regime de escoamento turbulento;
- II. Estudar o efeito do campo magnético permanente na corrosão de superfícies metálicas;

- III. Investigar a ação do campo magnético com água de circulação real;
- IV. Investigar o efeito ao aumentar o número de pares de ímãs na redução de biofilmes;
- V. Estudar o efeito do campo magnético permanente com o uso de dispersantes e outros biocidas para a redução de biofilmes em superfícies.

## REFERÊNCIAS

- ABOU-GHAZALA, Amr; SCHOENBACH, Karl H. Biofouling prevention with pulsed electric fields. **IEEE Transactions on Plasma Science**, [S. l.], v. 28, n. 1, p. 115–121, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1109/27.842878>
- AL-BLOUSHI, Mohammed *et al.* Effect of organic on chemical oxidation for biofouling control in pilot-scale seawater cooling towers. **Journal of Water Process Engineering**, [S. l.], v. 20, n. September, p. 1–7, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2017.09.002>
- AL-BLOUSHI, Mohammed *et al.* Performance assessment of oxidants as a biocide for biofouling control in industrial seawater cooling towers. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, [S. l.], v. 59, p. 127–133, 2018 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2017.10.015>
- AL-BLOUSHI, Mohammed *et al.* Performance assessment of oxidants as a biocide for biofouling control in industrial seawater cooling towers. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, [S. l.], v. 59, p. 127–133, 2018 b.
- AL-JUBOORI, Raed A.; YUSAF, Talal. Biofouling in RO system: Mechanisms, monitoring and controlling. **Desalination**, [S. l.], v. 302, p. 1–23, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.desal.2012.06.016>
- AL-JUBOORI, Raed A.; YUSAF, Talal; ARAVINTHAN, Vasanthadevi. Investigating the efficiency of thermosonication for controlling biofouling in batch membrane systems. **Desalination**, [S. l.], v. 286, p. 349–357, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.desal.2011.11.049>
- ANNOUS, B.Assam A.; FRATAMICO, Pina M.; SMITH, James L. Quorum Sensing in Biofilms : Why Bacteria Behave the Way They Do. **Journaul of Food Science**, [S. l.], v. 74, n. 1, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.01022.x>
- BAHADORI, A. Cooling tower and cooling water circuits. **Essentials of Oil and Gas Utilities**, [S. l.], 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803088-2/00005-5>
- BALAMURUGAN, P.; PRASHANTH, K.; RAO, T. S. Control of fouling bacteria in freshwater used for the firewater system of a power plant by chemical biocides - An in vitro study. **Indian Journal of Geo-Marine Sciences**, [S. l.], v. 43, n. 11, p. 2085–2093, 2014.
- BANDARA, N. H. M. H. *et al.* Magnetic fields supress *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and enhance ciprofloxacin activity. **Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm**, [S. l.], v. 31, p. 443–457, 2015. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/08927014.2015.1055326>
- BAUDRION, F.; PÉRICHAUD, A.; VACELET, E. Influence of concentration and structure of quaternary ammonium salts on their antifouling efficiency tested against a community of marine bacteria. **Biofouling**, [S. l.], v. 14, n. 4, p. 317–331, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/08927010009378424>
- BLANCHET, Elodie *et al.* Quorum Sensing and Quorum Quenching in the Mediterranean Seagrass *Posidonia oceanica* Microbiota. **Frontiers in Marine Science**, [S. l.], v. 4, n. July, p. 1–10, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00218>
- BOTT, T. R. Techniques for reducing the amount of biocide necessary to counteract the effects of biofilm growth in cooling water systems. **Applied Thermal Engineering**, [S. l.], v. 18, p. 1059–1066, 1998.
- BOTT, T. R. Biofouling control with ultrasound. **Heat Transfer Engineering**, [S. l.], v. 21, n. 3, p. 43–49, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/014576300270898>
- BOTT, T. R. Potential physical methods for the control of biofouling in water systems. **Chemical Engineering Research and Design**, [S. l.], v. 79, n. 4, p. 484–490, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1205/026387601750282427>
- BOTT, T. R.; TIANQING, Liu. Ultrasound enhancement of biocide efficiency. **Ultrasonics Sonochemistry**, [S. l.], v. 11, n. 5, p. 323–326, 2004. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(03\)00159-7](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(03)00159-7)
- BROEKMAN, S. *et al.* Ultrasonic treatment for microbiological control of water systems. **Ultrasonics Sonochemistry**, [S. l.], v. 17, n. 6, p. 1041–1048, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2009.11.011>

- BUCS, Sz S. *et al.* Impact of organic nutrient load on biomass accumulation, feed channel pressure drop increase and permeate flux decline in membrane systems. **Water Research**, [S. l.], v. 67, n. 0, p. 227–242, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.09.005>
- CAO, Shan *et al.* Progress of marine biofouling and antifouling technologies. **Chinese Science Bulletin**, [S. l.], v. 56, n. 7, p. 598–612, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11434-010-4158-4>
- CELLINI, Luigina *et al.* Bacterial Response to the Exposure of 50 Hz Electromagnetic Fields. **Bioelectromagnetics**, [S. l.], v. 311, n. December 2006, p. 302–311, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bem.20391>
- CHOI, Jung-goo *et al.* The behavior of membrane fouling initiation on the crossflow membrane bioreactor system. **Journal of Membrane Science**, [S. l.], v. 203, p. 103–113, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0376-7388\(01\)00790-6](https://doi.org/10.1016/S0376-7388(01)00790-6)
- CLOETE, T. E.; JACOBS, L.; BROZEL, V. S. The chemical control of biofouling in industrial water systems. **Biodegradation**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 23–37, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1023/A:1008216209206>
- CLOETE, T.Eugen.; BRÖZEL, Volker S. Practical aspects of biofouling control in industrial water systems. **International Biodeterioration & Biodegradation**, [S. l.], v. 29, n. 3, p. 299–341, 1992. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0964-8305\(92\)90050-X](https://doi.org/10.1016/0964-8305(92)90050-X)
- CÓLLIER, P. J. *et al.* Chemical reactivity of some isothiazolone biocides. **The Journal of Applied Bacteriology**, [S. l.], v. 69, n. 4, p. 578–584, 1990. Disponível em: <https://doi.org/2292521>
- COSTERTON, J. *et al.* Microbial biofilms. **Annu Rev Microbiol**, [S. l.], v. 49, p. 711–745, 1995. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-3-642-31331-8\\_32](https://doi.org/10.1007/978-3-642-31331-8_32)
- COSTERTON, J. W.; STEWART, Philip S.; GREENBERG, E. P. Bacterial Biofilms : A Common Cause of Persistent Infections. **Science**, [S. l.], v. 284, n. May, p. 1318–1322, 1999.
- DAVIES, David G.; MARQUES, Cláudia N. H. A Fatty Acid Messenger Is Responsible for Inducing Dispersion in Microbial Biofilms. **Journal of Bacteriology**, [S. l.], v. 191, n. 5, p. 1393–1403, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JB.01214-08>
- DOBRETSOV, Sergey; ABED, Raeid M. M.; TEPLITSKI, Max. Mini-review : Inhibition of biofouling by marine microorganisms. **Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm**, [S. l.], v. 29, p. 423–441, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/08927014.2013.776042>
- DONLAN, Rodney M. Biofilms : Microbial Life on Surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, [S. l.], v. 8, n. 9, p. 881–890, 2002.
- DONLAN, Rodney M.; COSTERTON, J. William. Biofilms : Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 15, n. 2, p. 167–193, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167>
- DUBOIS, Michel *et al.* Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. [S. l.], v. 28, p. 350–356, 1956.
- EGUÍA, E. *et al.* Elimination of biofouling in heat exchangers-condensers by different chemical methods. **Transactions on the Built Environment**, [S. l.], v. 36, 1998.
- EGUÍA, E. *et al.* Minimization of the environmental impact produced by the biofouling treatment in tubular steel surfaces made of stainless steel AISI316L by means of different chlorine techniques. **Maritime Engineering and Ports II**, [S. l.], 2000.
- EGUÍA, Emilio *et al.* Optimisation of biocide dose as a function of residual biocide in a heat exchanger pilot plant effluent. **Biofouling**, [S. l.], v. 23, n. 4, p. 231–247, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/08927010701306740>
- EGUÍA, Emilio *et al.* Biofilm control in tubular heat exchangers refrigerated by seawater using flow inversion physical treatment. **International Biodeterioration and Biodegradation**, [S. l.], v. 62, n. 2, p. 79–87, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2007.12.004>
- FAULWETTER, Jennifer L. *et al.* Microbial processes influencing performance of treatment wetlands : A review. **Ecological Engineering**, [S. l.], v. 35, p. 987–1004, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2008.12.030>

FILHO, S. A.; LOPES, J. R. N. **Cooling Water Systems : An Overview**. [S. l.: s. n.]. E-book. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63228-9.00019-X>

FLEMMING, C. Biofouling in water systems – cases , causes and countermeasures. **Appl Microbial Biotechnol**, [S. l.], v. 59, p. 629–640, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1066-9>

FLEMMING, H. C. *et al.* **Marine and Industrial Biofouling**. [S. l.: s. n.]. E-book.

FLEMMING, Hans-curt. Biofouling and me : My Stockholm syndrome with biofilms. **Water Research**, [S. l.], v. 173, 2020. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115576>

GARCÍA, Sergio; TRUEBA, Alfredo. Influence of the Reynolds number on the thermal effectiveness of tubular heat exchanger subjected to electromagnetic field-based antifouling treatment in an open once-through seawater cooling system. **Applied Thermal Engineering**, [S. l.], v. 140, n. May, p. 531–541, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.applthermaleng.2018.05.069>

GAW, Sheng Long *et al.* Electrochemical Approach for Effective Antifouling and Antimicrobial Surfaces. **ACS Applied Materials and Interfaces**, [S. l.], v. 9, n. 31, p. 26503–26509, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsami.7b03761>

GIORGI, Gianfranco; MARCANTONIO, Pamela; BERSANI, Ferdinando. Effect of extremely low frequency magnetic field exposure on DNA transposition in relation to frequency , wave shape and exposure time. **Int. J. Radiat. Biol.**, [S. l.], v. 87, n. 6, p. 601–608, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/09553002.2011.570855>

GU, Huan; REN, Dacheng. Materials and surface engineering to control bacterial adhesion and biofilm formation : A review of recent advances. **Front. Chem. Sci. Eng.**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 20–33, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11705-014-1412-3>

HALDER, Suman *et al.* Alteration of Zeta potential and membrane permeability in bacteria: a study with cationic agents. **Springer Plus**, [S. l.], 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1476-7>

HALLIDAY, David; RESNICK, Robert; WALKER, Jearl. **Fundamentos de física, volume 3: eletromagnetismo**. 10. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2016. E-book.

HAN, Yong *et al.* Influence of alternating electromagnetic field and ultrasonic on calcium carbonate crystallization in the presence of magnesium ions. **Journal of Crystal Growth**, [S. l.], v. 499, n. July, p. 67–76, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2018.07.037>

HAQUE, Niamul; KWON, Sunghyun. Effect of ultra-sonication and its use with sodium hypochlorite as antifouling method against *Mytilus edulis* larvae and mussel. **Environmental Geochemistry and Health**, [S. l.], v. 40, n. 1, p. 209–215, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10653-016-9894-1>

HARRIS, George D. *et al.* Ultraviolet inactivation of selected bacteria and viruses with photoreactivation of the bacteria. **Water Research**, [S. l.], v. 21, n. 6, p. 687–692, 1987. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(87\)90080-7](https://doi.org/10.1016/0043-1354(87)90080-7)

HARRISON, Steven L.; BARBOSA-CÁNOVAS, Gustavo V; SWANSON, Barry G. Saccharomyces cerevisiae Structural Changes Induced by Pulsed Electric Field Treatment. **LWT - Food Science and Technology**, [S. l.], v. 30, p. 236–240, 1997. Disponível em: <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1006/fstl.1996.0171>

HERZBERG, Moshe; ELIMELECH, Menachem. Biofouling of reverse osmosis membranes : Role of biofilm-enhanced osmotic pressure. **Journal of Membrane Science**, [S. l.], v. 295, p. 11–20, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2007.02.024>

HERZBERG, Moshe; KANG, Seoktae; ELIMELECH, Menachem. Role of Extracellular Polymeric Substances ( EPS ) in Biofouling of Reverse Osmosis Membranes. **Environ. Sci. Technol.**, [S. l.], v. 43, n. 12, p. 4393–4398, 2009.

HONG, Seok Hoon *et al.* Effect of Electric Currents on Bacterial Detachment and Inactivation. **Biotechnol. Bioeng.**, [S. l.], v. 100, n. 2, p. 379–386, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bit.21760>

HORI, Katsutoshi; MATSUMOTO, Shinya. Bacterial adhesion: From mechanism to control. **Biochemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 48, p. 424–434, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.11.014>

- HOTRUM, Natalie E. *et al.* Pilot scale ultrasound enabled plate heat exchanger - Its design and potential to prevent biofouling. **Journal of Food Engineering**, [S. l.], v. 153, p. 81–88, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.11.026>
- HUANG, Chi Yu *et al.* Impact of disinfectant and nutrient concentration on growth and biofilm formation for a *Pseudomonas* strain and the mixed cultures from a fine papermachine system. **International Biodeterioration and Biodegradation**, [S. l.], v. 63, n. 8, p. 998–1007, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2009.07.004>
- HÜLSHEGER, H.; POTEL, J.; NIEMANN, E. G. Electric field effects on bacteria and yeast cells. **Radiation and Environmental Biophysics**, [S. l.], v. 22, n. 2, p. 149–162, 1983. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF01338893>
- IMBROGNO, Alessandra *et al.* Organic fouling control through magnetic ion exchange - nano filtration ( MIEX - NF ) in water treatment. **Journal of Membrane Science**, [S. l.], v. 549, n. August 2017, p. 474–485, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2017.12.041>
- JAIN, Anand; MARSILI, Enrico. The Biofilm Returns : Microbial Life at the Interface. *In: Microbial and Microbial Technology*. [S. l.: s. n.]. p. 59–85. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7931-5>
- JIA, Ru *et al.* Enhanced biocide treatments with D-amino acid mixtures against a biofilm consortium from a water cooling tower. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 8, n. AUG, p. 1–11, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01538>
- JUNG, Jin-ho; CHOI, Na-young; LEE, Sun-young. Biofilm formation and exopolysaccharide (EPS) production by *Cronobacter sakazakii* depending on environmental conditions. **Food Microbiology**, [S. l.], v. 34, n. 1, p. 70–80, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.11.008>
- KANG, Seoktae *et al.* Antibacterial Effects of Carbon Nanotubes : Size Does Matter. **Langmuir**, [S. l.], n. 15, p. 6409–6413, 2008.
- KAUR, K.; BOTT, T. R.; LEADBEATER, B. S. C. Effects of Ozone As A Biocide in An Experimental Cooling Water System. **Ozone: Science & Engineering**, [S. l.], v. 14, n. 6, p. 517–530, 1992. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/01919512.1992.10555725>
- KIM, Jun Young *et al.* High voltage impulse electric fields: Disinfection kinetics and its effect on membrane bio-fouling. **Desalination**, [S. l.], v. 283, p. 111–116, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.desal.2011.03.039>
- KIM, Minhui; PARK, Shin Young; HA, Sang Do. Synergistic effect of a combination of ultraviolet-C irradiation and sodium hypochlorite to reduce *Listeria monocytogenes* biofilms on stainless steel and eggshell surfaces. **Food Control**, [S. l.], v. 70, p. 103–109, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.05.003>
- KÖSE-MUTLU, Börte *et al.* Quorum quenching for effective control of biofouling in membrane bioreactor: A comprehensive review of approaches, applications, and challenges. **Environ. Eng. Res.**, [S. l.], v. 24, n. 4, p. 543–558, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.4491/eer.2018.380>
- LANA, Carlos Roberto. **Eletromagnetismo - Ímãs e indução eletromagnética**. [s. l.], 2013. Disponível em: <https://educacao.uol.com.br/disciplinas/fisica/eletromagnetismo-1-imas-einducao-%0Aeletromagnetica.htm>. Acesso em: 10 abr. 2020.
- LAOPAIBOON, Lakkana; PHUKOETPHIM, Niphaphat; LAOPAIBOON, Pattana. **Effect of glutaraldehyde biocide on laboratory-scale rotating biological contactors and biocide efficacy**. [s. l.], 2006. Disponível em: <http://www.ejbiotechnology.info/index.php/ejbiotechnology/article/view/v9n4-10/324#41>. Acesso em: 11 ago. 2018.
- LINLEY, Ezra *et al.* Use of hydrogen peroxide as a biocide: New consideration of its mechanisms of biocidal action. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S. l.], v. 67, n. 7, p. 1589–1596, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jac/dks129>
- LIPUS, L. Ç. *et al.* Permanent magnets for water-scale prevention. **Advances in Production Engineering & Management**, [S. l.], v. 10, n. 4, 2015.
- LIPUS, L. C.; AČKO, B.; HAMLER, A. Electromagnets for high-flow water processing. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, [S. l.], v. 50, n. 9, p. 952–958, 2011.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cep.2011.07.004>

LIU, Fang *et al.* Effect of oxidizing and non-oxidizing biocides on biofilm at different substrate levels in the model recirculating cooling water system. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 27, n. 12, p. 2989–2997, 2011 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0783-6>

LIU, Yang *et al.* Disinfection of bacterial biofilms in pilot-scale cooling tower systems. **Biofouling**, [S. l.], v. 27, n. 4, p. 393–402, 2011 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/08927014.2011.577525>

LIU, Zeyuan *et al.* Effect of magnetic field on calcium - silica fouling and interactions in brackish water distribution systems. **Science of the Total Environment**, [S. l.], v. 798, p. 148900, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148900>

LIU, Zhian *et al.* The Sterilization Effect of Solenoid Magnetic Field Direction on Heterotrophic Bacteria in Circulating Cooling Water. **Procedia Engineering**, [S. l.], v. 174, p. 1296–1302, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2017.01.274>

LÓPEZ-GALINDO, Cristina; CASANUEVA, José F.; NEBOT, Enrique. Efficacy of different antifouling treatments for seawater cooling systems. **Biofouling**, [S. l.], v. 26, n. 8, p. 923–930, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/08927014.2010.531464>

LUDENSKY, Michael. Control and monitoring of biofilms in industrial applications. **International Biodeterioration & Biodegradation**, [S. l.], v. 51, p. 255–263, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(03\)00038-6](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(03)00038-6)

LUI, Gough Yumu *et al.* Photovoltaic powered ultraviolet and visible light-emitting diodes for sustainable point-of-use disinfection of drinking waters. **Science of the Total Environment**, [S. l.], v. 493, p. 185–196, 2014.

LUO, Xin *et al.* Effects of static magnetic field on *Chlorella vulgaris*: growth and extracellular polysaccharide (EPS) production. **Journal of Applied Phycology**, [S. l.], v. 32, p. 2819–2828, 2020. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10811-020-02164-7>

ŁUSIAK-SZELACHOWSKA, Marzanna; WEBER-DABROWSKA, Beata; GÓRSKI, Andrzej. Bacteriophages and Lysins in Biofilm Control. **Virologia Sinica**, [S. l.], v. 12250, p. 125–133, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12250-019-00192-3>

LV, Yan *et al.* Nanofiltration membranes via co-deposition of polydopamine / polyethylenimine followed by cross-linking. **Journal of Membrane Science**, [S. l.], v. 476, p. 50–58, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2014.11.024>

MA, Wen *et al.* Bacteriophage-based strategies for biofouling control in ultrafiltration : In situ biofouling mitigation , biocidal additives and biofilm cleanser. **Journal of Colloid And Interface Science**, [S. l.], v. 523, p. 254–265, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.03.105>

MALAEB, Lilian *et al.* Do biological-based strategies hold promise to biofouling control in MBRs? **Water Research**, [S. l.], v. 47, n. 15, p. 5447–5463, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.06.033>

MARQUES, Thaís Tamyé; SHIROMA, Letícia Sayuri; DE JESUS, Dosil Pereira. Determination of tetrakis(hydroxymethyl)phosphonium sulfate in commercial formulations and cooling water by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. **Journal of Separation Science**, [S. l.], v. 38, n. 5, p. 852–857, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jssc.201401288>

MARX, Gretchen; MOODY, Abigail; BERMÚDEZ-AGUIRRE, Daniela. A comparative study on the structure of *Saccharomyces cerevisiae* under nonthermal technologies: High hydrostatic pressure, pulsed electric fields and thermo-sonication. **International Journal of Food Microbiology**, [S. l.], v. 151, n. 3, p. 327–337, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.027>

MASOOD, Samina. Effect of Weak Magnetic Field on Bacterial Growth. **Biophysical Reviews and Letters**, [S. l.], v. 12, n. 4, p. 177–186, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1142/S1793048017500102>

MATIN, Asif *et al.* Biofouling in reverse osmosis membranes for seawater desalination : Phenomena and prevention. **Desalination**, [S. l.], v. 281, p. 1–16, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.desal.2011.06.063>

MATTILA-SANDHOLM, Tiina; WIRTANEN, Gun. Biofilm formation in the industry : A review. **Food Reviws International**, [S. l.], v. 8, n. 4, p. 573–603, 1992.

- MAYACK, Lynn A. *et al.* Comparative effectiveness of chlorine and chlorine dioxide biocide regimes for biofouling control. **Water Research**, [S. l.], v. 18, n. 5, p. 593–599, 1984. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(84\)90209-4](https://doi.org/10.1016/0043-1354(84)90209-4)
- MCDONNELL, Gerald; RUSSELL, A. Denver. Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 147–179, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- MENG, Fangang *et al.* Effect of filamentous bacteria on membrane fouling in submerged membrane bioreactor. **Journal of Membrane Science**, [S. l.], v. 272, p. 161–168, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2005.07.041>
- MERCIER, Anne *et al.* Characterization of biofilm formation in natural water subjected to low-frequency electromagnetic fields. **Biofouling**, [S. l.], v. 32, n. 3, p. 287–299, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/08927014.2015.1137896>
- MILLER, Richard D.; ANNE KOEBEL, D. Legionella prevalence in cooling towers: Association with specific biocide treatments. **ASHRAE Transactions**, [S. l.], v. 112 PART 1, p. 700–708, 2006.
- MOTT, I. E. C. *et al.* The removal of bacterial biofilm from water-filled tubes using axially propagated ultrasound. **Journal of Applied Microbiology**, [S. l.], v. 84, n. 4, p. 509–514, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00373.x>
- MULINARI, Jéssica *et al.* Enhanced textile wastewater treatment by a novel biofilm carrier with adsorbed nutrients. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [S. l.], v. 24, n. December 2019, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101527>
- MUTHUKUMARAN, S. *et al.* Mechanisms for the ultrasonic enhancement of dairy whey ultrafiltration. **Journal of Membrane Science**, [S. l.], v. 258, n. 1–2, p. 106–114, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2005.03.001>
- O'TOOLE, George; KAPLAN, Heidi B.; KOLTER, Roberto. Biofilm Formation as Microbial Development. **Annu. Rev. Microbiol.**, [S. l.], p. 49–79, 2000.
- PALEOLOGOU, Andreas *et al.* Disinfection of water and wastewater by TiO<sub>2</sub> photocatalysis, sonolysis and UV-C irradiation. **Catalysis Today**, [S. l.], v. 129, n. 1–2 SPEC. ISS., p. 136–142, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2007.06.059>
- PALMER, Jon; FLINT, Steve; BROOKS, John. Bacterial cell attachment , the beginning of a biofilm. **J Ind Microbiol Biotechnol**, [S. l.], p. 577–588, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10295-007-0234-4>
- PANDIT, Soumya *et al.* Influence of Electric Fields on Biofouling of Carbonaceous Electrodes. **Environ. Sci. Technol.**, [S. l.], 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b06339>
- PAPAIANNI, Marina *et al.* Bacteriophages Promote Metabolic Changes in Bacteria Biofilm. **Microorganisms**, [S. l.], v. 8, p. 1–10, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040480>
- PATEL, Ina *et al.* Microbial Biofilms : Microbes in Social Mode. **International Journal of Agricultural and Food Research**, [S. l.], v. 3, n. 2, p. 34–49, 2014.
- PIATTI, Elena *et al.* Antibacterial effect of a magnetic field on *Serratia marcescens* and related virulence to *Hordeum vulgare* and *Rubus fruticosus* callus cells. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 132, n. 2, p. 359–365, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(02\)00065-9](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(02)00065-9)
- PICHARDO-ROMERO, Daniela *et al.* Current Advances in Biofouling Mitigation in Membranes for Water Treatment: An Overview. **Processes**, [S. l.], v. 8, p. 1–22, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pr8020182>
- PIYADASA, Chathuri *et al.* Antimicrobial effects of pulsed electromagnetic fields from commercially available water treatment devices – controlled studies under static and flow conditions. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, [S. l.], n. November, 2017 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jctb.5442>
- PIYADASA, Chathuri *et al.* The application of electromagnetic fields to the control of the scaling and biofouling of reverse osmosis membranes - A review. **Desalination**, [S. l.], v. 418, n. November 2016, p. 19–34, 2017 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.desal.2017.05.017>

- PRONER, Mariane Carolina *et al.* Industrial Cooling Systems and Antibiofouling Strategies: A Comprehensive Review. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, [S. l.], p. 3278–3294, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.0c05985>
- RAJAGOPAL, S. *et al.* Laboratory evaluation of the toxicity of chlorine to the fouling hydroid *Cordylophora caspia*. **Biofouling**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 57–64, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/08927010290017734>
- RAMSEY, Matthew M.; WHITELEY, Marvin. *Pseudomonas aeruginosa* attachment and biofilm development in dynamic environments. **Molecular Microbiology**, [S. l.], v. 53, p. 1075–1087, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04181.x>
- RAND, J. L. *et al.* A field study evaluation for mitigating biofouling with chlorine dioxide or chlorine integrated with UV disinfection. **Water Research**, [S. l.], v. 41, n. 9, p. 1939–1948, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.02.004>
- RAO, Toleti Subba. Biofouling in Industrial Water Systems. *In: Mineral Scales and Deposits*. [S. l.]: Elsevier B.V., 2015. p. 123–140. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63228-9.00006-1>
- RATHI, Rengaswamy; SATHEESH, Sathyaneson. Exposure to chlorine affects the extracellular polymeric substance production and cell surface hydrophobicity in biofilm bacteria. **Oceanological and Hydrobiological Studies**, [S. l.], v. 41, n. 4, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.2478/s13545-012-0035-x>
- RE, B. Del; AGOSTINI, F. Bersani C.; GIORGI, G. Various effects on transposition activity and survival of *Escherichia coli* cells due to different ELF-MF signals. **Radiant Environ Biophys**, [S. l.], p. 265–270, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00411-004-0260-9>
- REHMAN, Zahid Ur; LEIKNES, Torove. Quorum-Quenching Bacteria Isolated From Red Sea Sediments Reduce Biofilm Formation by *Pseudomonas aeruginosa*. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 9, n. July, p. 1–13, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01354>
- ROSEN, Arthur D. Mechanism of Action of Moderate-Intensity Static Magnetic Fields on Biological Systems. **Cell Biochemistry and Biophysics**, [S. l.], v. 39, 2003.
- SALE, A.; HAMILTON, W. Effects of high electric fields on microorganisms. Killing of bacteria and yeasts. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, [S. l.], v. 148, n. 3, p. 781–788, 1967. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(67\)90052-9](https://doi.org/10.1016/0304-4165(67)90052-9)
- SANTOS, Vera Lúcia dos *et al.* Reuse of refinery 's tertiary-treated wastewater in cooling towers: microbiological monitoring. **Environ Sci Pollut Res**, [S. l.], p. 2945–2955, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3555-7>
- SCHOENBACH, Karl H.; ILL, Raymond W. Alden; FOX, Thomas J. Biofouling prevention. [S. l.], p. 75–78, 1996.
- SCHWARTZ, Thomas; HOFFMANN, S.; OBST, U. Formation of natural biofilms during chlorine dioxide and u.v. disinfection in a public drinking water distribution system. **Journal of Applied Microbiology**, [S. l.], v. 95, n. 3, p. 591–601, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02019.x>
- SHIROMA, Letícia S.; MARQUES, Thaís T.; JESUS, Dosil P. A rapid and simple capillary electrophoresis method for indirect determination of the biocide 2,2-dibromo-3-nitrilo-propionamide (DBNPA) in cooling waters. **Water Science and Technology**, [S. l.], v. 71, n. 3, p. 434–439, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.2166/wst.2015.009>
- SILVA, Fabiana Luisa *et al.* Changes in the physico-chemical characteristics of a protein solution in the presence of magnetic field and the consequences on the ultra filtration performance. **Journal of Food Engineering**, [S. l.], v. 242, n. February 2018, p. 84–93, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.08.016>
- SILVA, Neusely *et al.* **Manial de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. 5ª ed. [S. l.]: Bulcher, 2017. *E-book*.
- SIMON, F. Xavier *et al.* Seawater disinfection by chlorine dioxide and sodium hypochlorite. A comparison of biofilm formation. **Water, Air, and Soil Pollution**, [S. l.], v. 225, n. 4, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11270-014-1921-1>
- SOLANO, Cristina; ECHEVERZ, Maite; LASA, Iñigo. Biofilm dispersion and quorum sensing. **Current**

**Opinion in Microbiology**, [S. l.], p. 96–104, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.02.008>

SRIYUTHA MURTHY, P. *et al.* Biofilm control for plate heat exchangers using surface seawater from the open ocean for the OTEC power plant. **International Biodeterioration and Biodegradation**, [S. l.], v. 53, n. 2, p. 133–140, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2003.11.003>

SWARAJ, Sweta *et al.* Biocidal Efficacy of Ozone and Chlorine on Planktonic and Biofilm Cells of Two Marine Bacteria Species. **Ozone: Science and Engineering**, [S. l.], v. 35, n. 2, p. 90–100, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/01919512.2013.759841>

TACHIKAWA, Mariko *et al.* Evaluation of some halogen biocides using a microbial biofilm system. **Water Research**, [S. l.], v. 39, n. 17, p. 4126–4132, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.07.039>

TANG, F. *et al.* Effects of chemical agent injections on genotoxicity of wastewater in a microfiltration-reverse osmosis membrane process for wastewater reuse. **Journal of Hazardous Materials**, [S. l.], v. 260, p. 231–237, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.05.035>

TENG, Hsien Chiao. A Puzzle of the Effect of Magnetic Field on Biological Cells. **Life Science Journal**, [S. l.], v. 2, 2005.

THAMARAISELVAN, Chidambaram *et al.* Low voltage electric potential as a driving force to hinder biofouling in self-supporting carbon nanotube membranes. **Water Research**, [S. l.], v. 129, p. 143–153, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.11.004>

TIGGEMANN, Lídia *et al.* Effect of high pressure and magnetic field treatments on stability of *Candida antarctica* lipase B (CALB) and lysozyme from chicken egg. **Catalysis Communications**, [S. l.], v. 116, n. August, p. 43–47, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.catcom.2018.08.006>

TRUEBA, Alfredo *et al.* Study of the activity of quaternary ammonium compounds in the mitigation of biofouling in heat exchangers – condensers cooled by seawater. **Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm**, [S. l.], n. December 2014, p. 37–41, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/08927014.2013.830108>

TRUEBA, Alfredo *et al.* The effect of electromagnetic fields on biofouling in a heat exchange system using seawater. **Biofouling**, [S. l.], v. 31, n. 1, p. 19–26, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/08927014.2014.994096>

TRUEBA, Alfredo; GARCÍA, Sergio; OTERO, Félix M. Mitigation of biofouling using electromagnetic fields in tubular heat exchangers-condensers cooled by seawater. **Biofouling**, [S. l.], v. 30, n. 1, p. 95–103, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/08927014.2013.847926>

VAN DER BORDEN, Arnout J. *et al.* Electric current-induced detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms from surgical stainless steel. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 70, n. 11, p. 6871–6874, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.70.11.6871-6874.2004>

VAN HOUTT, Rob; MICHIELS, Chris W. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. **Research in Microbiology**, [S. l.], v. 156, p. 626–633, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.02.005>

VEIGA, Andrea Azevedo. **Estudo do Efeito Biocida do Cloro e do Peróxido de Hidrogênio em Sistemas de Resfriamento com Reúso de Efluente como Água de Reposição**. 2010. - Universidade Federal do Rio de Janeiro, [s. l.], 2010.

VENKATNARAYANAN, Srinivas *et al.* Chlorine dioxide as an alternative antifouling biocide for cooling water systems: Toxicity to larval barnacle *Amphibalanus reticulatus* (Utinomi). **Marine Pollution Bulletin**, [S. l.], v. 124, n. 2, p. 803–810, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.01.023>

VRIJENHOEK, Eric M.; HONG, Seungkwan; LIMLECH, Menachem. Influence of membrane surface properties on initial rate of colloidal fouling of reverse osmosis and nanofiltration membranes. **Journal of Membrane Science**, [S. l.], v. 188, p. 115–128, 2001.

VU, Barbara *et al.* Bacterial Extracellular Polysaccharides Involved in Biofilm Formation. **Molecules**, [S. l.], p. 2535–2554, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules14072535>

WAGNER, Monika; BRUMELIS, Daina; GEHR, Ronald. Disinfection of Wastewater by Hydrogen Peroxide or Peracetic Acid : Development of Procedures for Measurement of Residual Disinfectant and

Application to a Physicochemically Treated Municipal Effluent. **Water Reclamation and Reuse**, [S. I.], n. February, 2002. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.2175/106143002X139730>

WAGNER, Wendell *et al.* Evidences of the static magnetic field influence on cellular systems. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, [S. I.], v. 121, p. 16–28, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2016.03.003>

WANG, Huanlei *et al.* Preventing microbial biofilms on catheter tubes using ultrasonic guided waves. **Scientific Reports**, [S. I.], v. 7, n. 1, p. 1–9, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00705-8>

WEN, J. *et al.* Chelators enhanced biocide inhibition of planktonic sulfate-reducing bacterial growth. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S. I.], v. 26, n. 6, p. 1053–1057, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0269-y>

WILEN, Britt-marie; JIN, Bo; LANT, Paul. The influence of key chemical constituents in activated sludge on surface and flocculating properties. **Water Research**, [S. I.], v. 37, p. 2127–2139, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00629-2](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00629-2)

WILSON, W. William *et al.* Status of methods for assessing bacterial cell surface charge. **Journal of Microbiological Methods**, [S. I.], v. 43, p. 153–164, 2001. Disponível em: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00224-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00224-4)

XIAOKAI, Xing. Research on the electromagnetic anti-fouling technology for heat transfer enhancement. **Applied Thermal Engineering**, [S. I.], v. 28, n. 8–9, p. 889–894, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.applthermaleng.2007.07.006>

XU, D. *et al.* D-amino acids for the enhancement of a binary biocide cocktail consisting of THPS and EDDS against an SRB biofilm. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S. I.], v. 28, n. 4, p. 1641–1646, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0970-5>

XU, D.; LI, Y.; GU, T. D-Methionine as a biofilm dispersal signaling molecule enhanced tetrakis hydroxymethyl phosphonium sulfate mitigation of *Desulfovibrio vulgaris* biofilm and biocorrosion pitting. **Materials and Corrosion**, [S. I.], v. 65, n. 8, p. 837–845, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/maco.201206894>

XU, Zhiming *et al.* Characteristics of calcium carbonate fouling on heat transfer surfaces under the action of electric fields †. [S. I.], v. 32, n. 7, p. 3445–3451, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12206-018-0648-0>

YANG, Guiqin *et al.* Extraction and characterization of stratified extracellular polymeric substances in *Geobacter* biofilms. **Bioresource Technology**, [S. I.], v. 276, n. December 2018, p. 119–126, 2019. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.100>

YANG, Y. *et al.* Using *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to evaluate hydrogen peroxide as a biofouling control agent in membrane treatment systems. **Letters in Applied Microbiology**, [S. I.], v. 63, n. 6, p. 488–494, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/lam.12674>

YANG, Yi *et al.* Effects of monochloramine and hydrogen peroxide on the bacterial community shifts in biologically treated wastewater. **Chemosphere**, [S. I.], v. 189, p. 399–406, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.09.087>

YU, Wenzheng; ZHANG, Dizhong; GRAHAM, Nigel J. D. Membrane fouling by extracellular polymeric substances after ozone pre-treatment: Variation of nano-particles size. **Water Research**, [S. I.], v. 120, p. 146–155, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.04.080>

ZAIDI, N. S.; MUDA, K.; SILLANPÄÄ, M. Effects of extra-cellular polymeric substances towards physical properties of biomass under magnetic field exposure. **International Journal of Environmental Science and Technology**, [S. I.], v. 16, n. 7, p. 3801–3808, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13762-018-1897-2>

ZAIDI, Nur Syamimi *et al.* Magnetic Field Application and its Potential in Water and Wastewater Treatment Systems. **Separation & Purification Reviews**, [S. I.], v. 43, n. 3, p. 206–240, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/15422119.2013.794148>

ZHAO, Ju-Dong; LIU, Zhi-An; ZHAO, Er-Jun. Combined effect of constant high voltage electrostatic field and variable frequency pulsed electromagnetic field on the morphology of calcium carbonate scale in circulating cooling water systems Ju-Dong Zhao , Zhi-An Liu and Er-Jun Zhao. **Water Science &**

**Technology**, [S. l.], p. 1074–1082, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.2166/wst.2014.337>

## APÊNDICE

**Figura 1A.** Permissão para uso de imagens do trabalho publicado por Proner et al. (2021). Copyright 2021 American Chemical Society.

14/02/2022 15:55 RightsLink® by Copyright Clearance Center


Home | Help | Email Support | Sign In | Create Account

---

**Industrial Cooling Systems and Antifouling Strategies: A Comprehensive Review**

**Author:**  
Mariana Carolina Proner, Alessandra Cristina de Menezes, Andressa Azevedo Velga, et al.

**Publication:** Industrial & Engineering Chemistry Research  
**Publisher:** American Chemical Society  
**Date:** Mar 1, 2021  
**Copyright:** © 2021, American Chemical Society

**PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE**

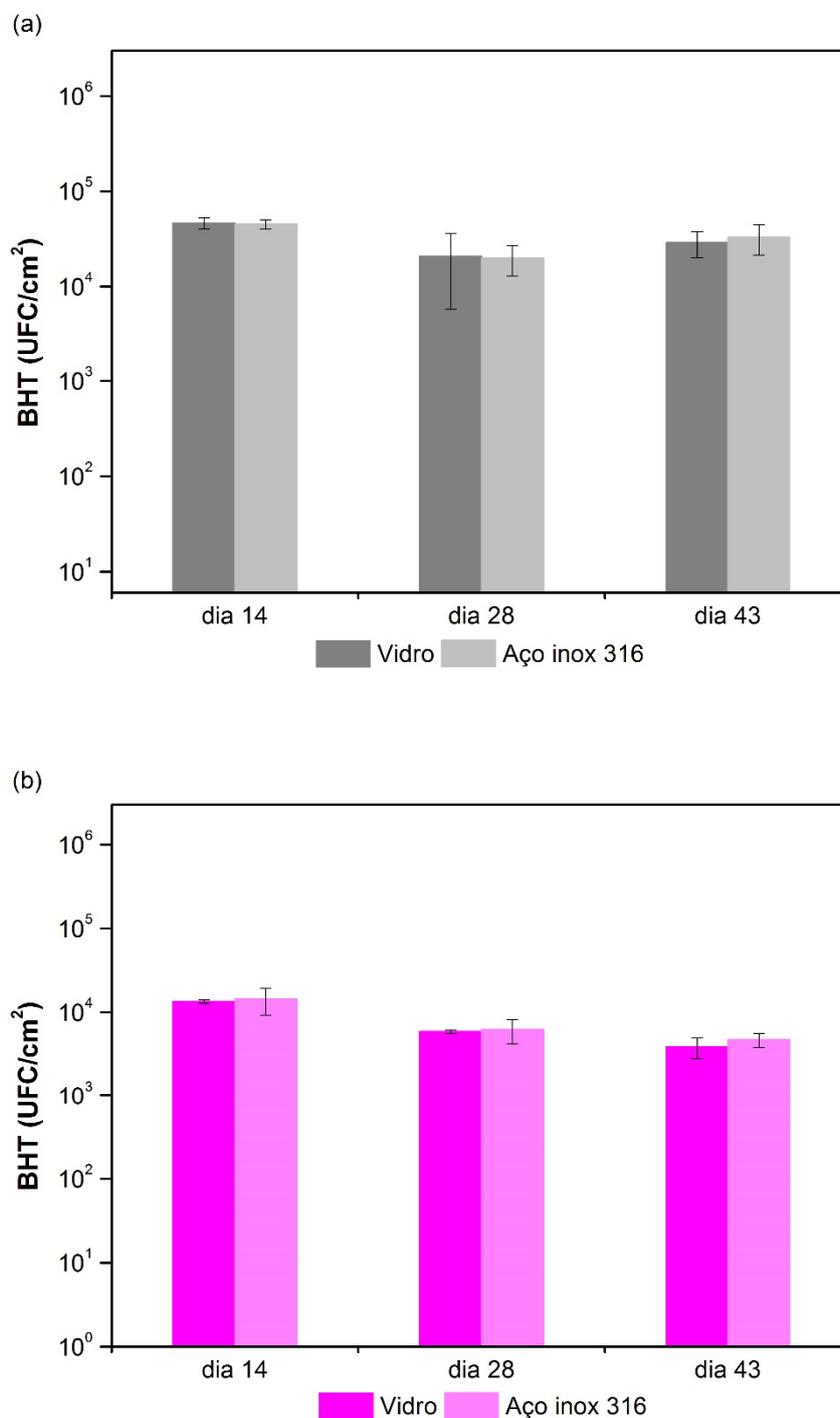
This type of permission license, instead of the standard Terms and Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from COMPLEMENTS: CITATIONS. Copyright (YEAR) American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your RightsLink request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any uses, please submit a new request.

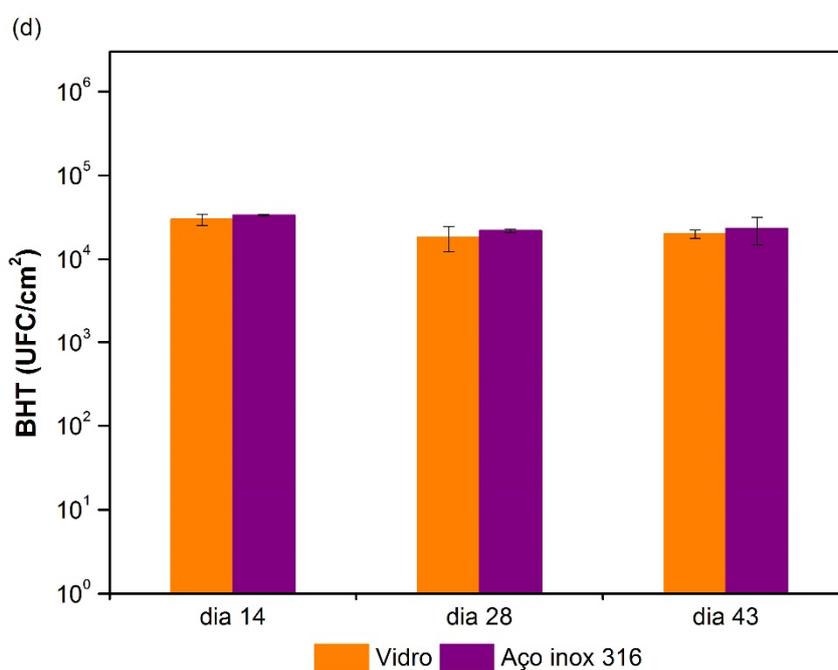
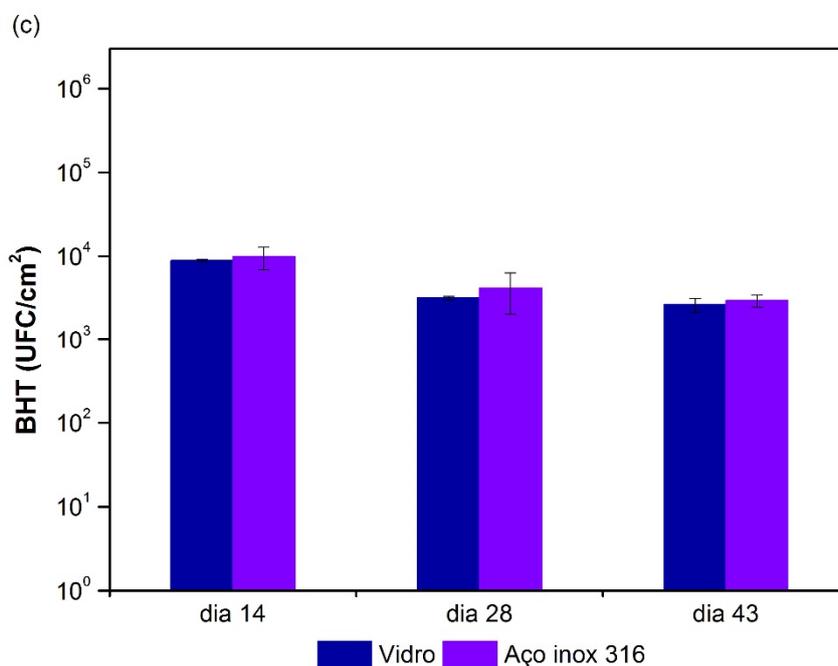
If credit is given to another source for the material you requested from RightsLink, permission must be obtained from that source.

[BACK](#) [CLOSE WINDOW](#)

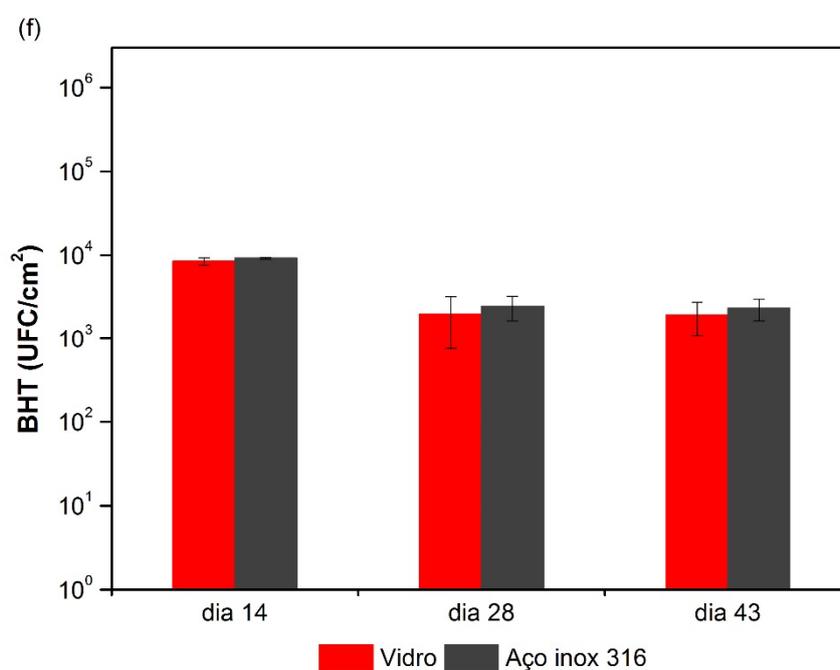
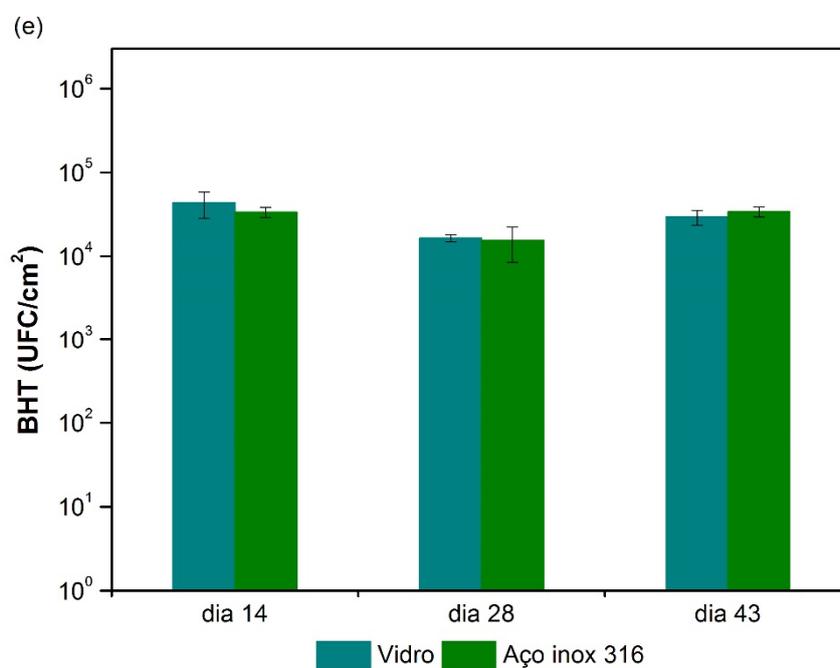
**Figura 2A.** BHT sésseis dos corpos de prova de vidro e de aço inox acoplados no sistema controle, e nos sistemas magnéticos com diferentes densidades de fluxo, nos dias 14, 28 e 43, utilizando como fonte de carbono diesel estabilizado com 1% de DSS, na concentração 160 mg/L, como inóculo cultura mista, com concentração inicial de  $5 \times 10^2$  UFC.mL<sup>-1</sup>, vazão de 50 L.h<sup>-1</sup> e temperatura de 30 °C. (a) Controle, (b) 0,45 T, (c) 0,23 T, (d) 0,10 T, (e) 0,05 T, e (f) ímã em repulsão.



**Continuação Figura 2A.** BHT sésseis dos corpos de prova de vidro e de aço inox acoplados no sistema controle, e nos sistemas magnéticos com diferentes densidades de fluxo, nos dias 14, 28 e 43, utilizando como fonte de carbono diesel estabilizado com 1% de DSS, na concentração 160 mg/L, como inóculo cultura mista, com concentração inicial de  $5 \times 10^2$  UFC.mL<sup>-1</sup>, vazão de 50 L.h<sup>-1</sup> e temperatura de 30 °C. (a) Controle, (b) 0,45 T, (c) 0,23 T, (d) 0,10 T, (e) 0,05 T, e (f) ímã em repulsão.

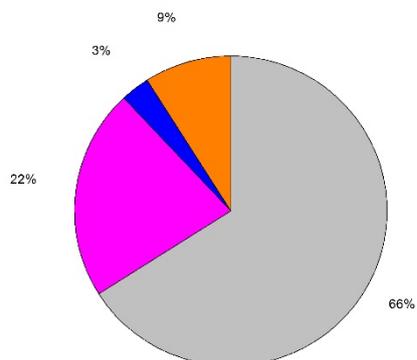


**Continuação Figura 2A.** BHT sésseis dos corpos de prova de vidro e de aço inox acoplados no sistema controle, e nos sistemas magnéticos com diferentes densidades de fluxo, nos dias 14, 28 e 43, utilizando como fonte de carbono diesel estabilizado com 1% de DSS, na concentração 160 mg/L, como inóculo cultura mista, com concentração inicial de  $5 \times 10^2$  UFC.mL<sup>-1</sup>, vazão de 50 L.h<sup>-1</sup> e temperatura de 30 °C. (a) Controle, (b) 0,45 T, (c) 0,23 T, (d) 0,10 T, (e) 0,05 T, e (f) ímã em repulsão.

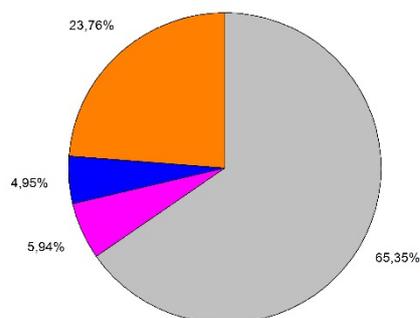


**Figura 3A.** Perfil microbiológico dos inóculos (gêneros). (a) Inóculo 1, (b) inóculo 2, e (c) inóculo 3.

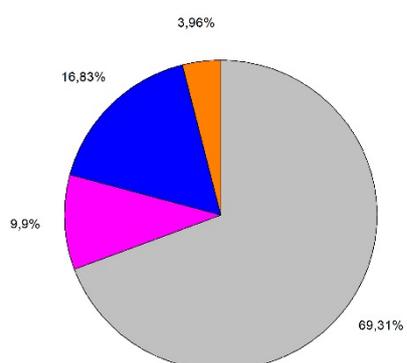
(a)  *Enterobacteriaceae*  *Proteus*  *Salmonella*  *Vagococcus*



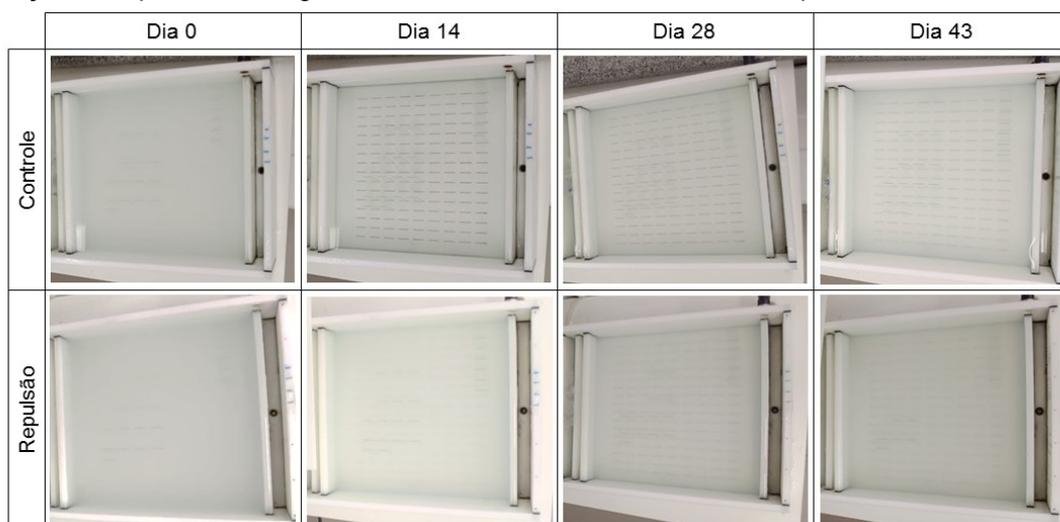
(b)  *Enterobacteriaceae*  *Proteus*  *Salmonella*  *Vagococcus*



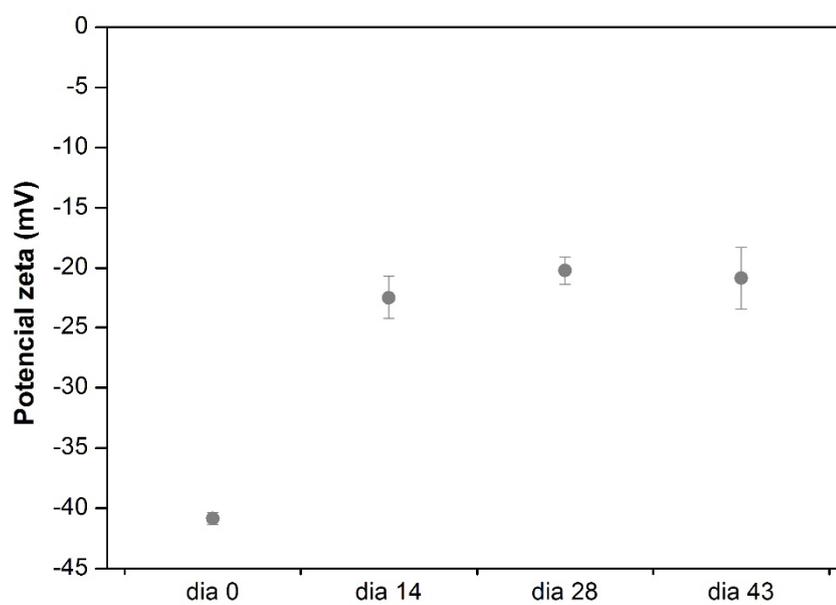
(c)  *Enterobacteriaceae*  *Proteus*  *Salmonella*  *Vagococcus*



**Figura 4A.** Imagens dos tanques de circulação do sistema controle e do sistema magnético com ímãs em posição de repulsão com água sintética nos dias 0, 14, 28 e 43 de experimento.



**Figura 5A.** Potencial zeta da água sintética estéril nos dias 0, 14, 28 e 43.



**Figura 6A.** (a) Imagens da água sintética do sistema com NaClO e do sistema com NaClO e campo magnético, com adição do reagente DPD para determinação da concentração de cloro livre residual. (b) Concentração de cloro livre residual do sistema de NaClO e de NaClO com campo magnético. Nos dias 5, 7, 14, 28 e 43 de experimento.

