



CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS AMBIENTAIS POR ENSAIOS NEUTRONGRÁFICOS

Jaqueline Michele Irineu da Silva

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Nuclear, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Nuclear.

Orientadora: Verginia Reis Crispim

Rio de Janeiro
Março de 2013

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE MICOBACTÉRIAS NÃO
TUBERCULOSAS AMBIENTAIS POR ENSAIOS NEUTRONGRÁFICOS

Jaqueline Michele Irineu da Silva

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ
COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM
ENGENHARIA NUCLEAR.

Examinada por:

Prof.^a Verginia Reis Crispim, D.Sc

Prof. Rafael Silva Duarte, D.Sc

Prof. Ademir Xavier da Silva, D.Sc

Prof. Luiz Antonio Ribeiro da Rosa, D.Sc

Prof. Luis Eduardo Barreira Brandão, D.Sc

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

MARÇO DE 2013

Silva, Jaqueline Michele Irineu da

Caracterização Morfológica de Micobactéria Não Tuberculosa Ambientais por Ensaios Neutronográficos/
Jaqueline Michele Irineu da Silva – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2013.

XXI, 123 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadora: Verginia Reis Crispim

Tese – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Nuclear, 2013.

Referências Bibliográficas: p. 110-123.

1. Neutronografia. 2. Micobactérias Não Tuberculosas.
3. *Mycobacterium marinum* e *fortuitum*. I. Crispim, Verginia Reis. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Nuclear. III. Título.

Dedico este trabalho a meu filho, Daniel, que me deu a alegria e a razão de viver.
É através do seu sorriso que sinto a presença e o amor de Deus.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, a quem devo minha vida, orientação e proteção.

A minha orientadora, Prof. Verginia Reis Crispim, pelo companheirismo, atenção, compreensão, apoio, confiança, empenho, orientação na realização deste trabalho e, principalmente, pelo exemplo de vida.

A minha mãe que ainda muito jovem permitiu que eu nascesse e desfrutasse dos seus cuidados, atenção, amor e carinho.

A meu marido que me deu o melhor presente que eu poderia receber nosso filho, Daniel; e pelo companheirismo nos momentos de alegria e dificuldades que já enfrentamos juntos.

Aos meus amados irmãos pelo carinho, incentivo e respeito; além da amizade e união em todos os momentos que compartilhamos nesta e em todas as nossas vidas.

As minhas amigas Simoni e Rosemary pela amizade, conversas e cuidado com meu filho e lar.

Ao Prof. Rafael Silva Duarte pela liberação dos recursos técnicos e científicos do laboratório de Micobactéria/IMPPG/CCS/UFRJ e, com muito carinho, respeito e admiração, ao biólogo Marlei Gomes da Silva, pelas ideias, discussões, sugestões e execuções das atividades com as micobactérias.

Ao Instituto de Engenharia Nuclear/CNEN e seus funcionários, principalmente a equipe de operação do Reator Argonauta, em especial: Carlos A. C. Renke, Francisco J. de O. Ferreira e a Rosilda Maria Gomes de Lima pela preparação do borato de sódio.

A Prof. Vanessa Rodrigues Furtado do Instituto de Química/CT/UFRJ pela atenção, disposição e colaboração fundamentais para os ensaios utilizando dendrímeros e, conseqüentemente, conclusão desta tese.

A Clara T. S. Lima por, gentilmente, me mostrar os primeiros passos para a realização deste trabalho.

A Josevalda L. Noronha, Tânia R. M. Moraes, Liliane Oliveira da Rocha, Washington Luiz dos Santos, Reginaldo Baptista de Oliveira, Maria Susana das Dores e a toda equipe administrativa do PEN/COPPE/UFRJ.

Aos professores do Programa de Engenharia Nuclear da COPPE/UFRJ pela oportunidade e confiança para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos ex-alunos do PEN/COPPE/UFRJ que, através das suas pesquisas, artigos, dissertações e teses, forneceram dados fundamentais para a realização deste trabalho.

Aos colegas do grupo de Neutronografia do LNRTR/PEN/COPPE/UFRJ pelas conversas e apoio.

A todos os membros da banca examinadora deste trabalho, por terem aceitado o convite para avaliar esta tese.

Ao CNPq pelo apoio financeiro a esta pesquisa.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciência (D.Sc.)

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS AMBIENTAIS POR ENSAIOS NEUTRONGRÁFICOS

Jaqueline Michele Irineu da Silva

Março/2013

Orientadora: Verginia Reis Crispim

Programa: Engenharia Nuclear

As micobactérias são consideradas álcool ácido resistente, sendo microorganismos pequenos em forma de bastão. A velocidade e a temperatura ótimas de crescimento são variáveis. Neste estudo, o principal objetivo é aperfeiçoar o processo de caracterização morfológica da presença da *M. marinum* e a *M. fortuitum* para, no futuro, aplicar a outras espécies de Micobactérias Não Tuberculosas. Em relação ao tempo necessário aos ensaios microbiológicos convencionais adotados, os ensaios nucleares, utilizando a técnica neutronográfica, revelaram-se mais rápidos. As amostras foram esterilizadas no Laboratório de Micobactérias/IMPG/UFRJ. Em seguida, foram incubadas, direta ou indiretamente, com o borato de sódio, depositadas em placas de CR-39 e irradiadas pelo feixe de nêutrons térmicos provindos do canal J-9 do reator Argonauta IEN/CNEN. Para incubar indiretamente, o borato de sódio, foi entregue às micobactérias por dendrímeros. Os tempos de incubação, irradiação e revelação foram os mesmos utilizados em trabalhos anteriores do grupo do Laboratório de Neutronografia em Tempo Real LNRTR/PEN/COPPE/UFRJ. As imagens registradas no CR-39 foram visualizadas num microscópio ótico E-400 da Nikon e capturadas por uma câmara digital Nikon Coolpix 995. Os resultados mostraram que a técnica produz imagens ampliadas 1000 vezes e, portanto, facilita a caracterização morfológica das micobactérias, sendo desnecessária utilização de equipamentos mais sofisticados, diminuindo o tempo de análise para cerca de 3 horas, comparativamente ao necessário por outras metodologias.

Abstract of Thesis presented at COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

MORPHOLOGIC CHARACTERIZATION OF ENVIRONMENTAL
NONTUBERCULOUS MYCOBACTERIA BY NEUTRON RADIOGRAPHYS

Jaqueline Michele Irineu da Silva

March/2013

Advisor: Verginia Reis Crispim

Program: Nuclear Engineering

Mycobacteria are considered resistant acid alcohol, rod-shaped small microorganisms. Growth rate and optimal temperature are variable. The aim of this study is to improve the process of *M. marinum* and *M. fortuitum* morphologic characterization and, in the future, apply it to other Nontuberculous Mycobacteria. Nuclear assays, using the neutron radiography technique proved to be faster than conventional microbiologic tests. The samples were sterilized at the laboratory of Mycobacteria/IMPG/UFRJ. Then, they were incubated, directly or indirectly, with sodium borate, deposited on CR-39 sheets and irradiated by the thermal neutron beam from the J-9 channel of the Argonauta IEN/CNEN reactor. In the indirect incubation, sodium borate was given to the mycobacteria by dendrimers. Incubation, irradiation and developing times were the same used by the team of the Laboratory of Neutron Radiography in Real Time LNRTR/PEN/COPPE/UFRJ in previous studies. The images registered on the CR-39 were visualized with the help of a Nikon E-400 optical microscope and captured by a Nikon Coolpix 995 digital camera. The results showed that the technique allows to obtain images enlarged 1000x, thus facilitating mycobacteria morphologic characterization not being necessary the use of more sophisticated equipment and reducing the analysis time (to around 3 hours) when compared to other methodologies.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO	01
I.1 – Generalidades	01
I.1.1 – Ensaio Não-Destrutivo	01
I.1.2 – Aspectos da Neutronografia	02
I.1.3 – Aspectos da Microbiologia	03
I.2 – Motivação para a realização desta pesquisa	06
I.3 – Objetivo e relevância do trabalho	07
I.4 – Revisão bibliográfica	09
I.4.1 – Neutronografia	09
I.4.2 – Detectores de traços nucleares de estado sólido (SSNTD)	11
I.4.3 – Microbiologia	12
CAPÍTULO II – FUNDAMENTOS TEÓRICOS	16
II.1 – O nêutron	16
II.1.1 – Propriedades do nêutron	16
II.1.2 – Energia dos nêutrons	16
II.1.3 – Interação dos nêutrons com a matéria	17
II.1.3.1 – Secção de choque microscópica e macroscópica	18
II.1.3.2 – Tipos de interações dos nêutrons com a matéria	19
II.1.3.3 – Atenuação dos nêutrons	22
II.2 – Neutronografia – Conceitos básicos	22
II.2.1 – Fontes de nêutrons	23
II.2.1.1 – Reatores	23
II.2.2 – Fatores que podem influenciar a Neutronografia	24
II.2.3 – Sistema de detecção da imagem neutronográfica	26
II.2.4 – Métodos para a conversão do nêutron em radiação ionizante	27
II.2.5 – Resolução radiográfica total	29
II.2.6 – A importância do boro como conversor de nêutrons	30
II.2.7 – Registradores e processo de revelação de imagens neutronográficas	31
II.2.8 – O ângulo crítico de revelação do traço	33

II.3 – Fundamentos de Microbiologia	34
II.4 – Micobactérias	35
II.4.1 – Esquema taxonômico	36
II.4.2 – Estrutura celular	37
II.4.3 – Característica tintorial	40
II.4.4 – Crescimento celular e fissão binária	42
II.4.5 – Crescimento de culturas micobacterianas	44
II.4.6 – O ciclo de crescimento	46
II.4.7 – Medida de crescimento populacional micobacteriano	48
II.4.8 – Diagnóstico laboratorial	51
II.4.8.1 – Exame microscópico (Baciloscopia)	51
II.4.8.2 – Cultivo	52
II.4.9 – Identificação das micobactérias	53
II.5 – Micobactérias Não Tuberculosas (MNT)	53
II.5.1 – A ecologia e as Micobactérias Não Tuberculosas	54
II.5.2 – Micobactérias Não Tuberculosas isoladas a partir de ambientes naturais e sintéticos	55
II.5.3 – Biofilmes	55
II.5.4 – Identificação e classificação das Micobactérias Não Tuberculosas	56
II.6 – Aspectos da <i>Mycobacterium marinum</i>	58
II.7 – Aspectos da <i>Mycobacterium fortuitum</i>	59
II.8 – Dendrímeros	60
CAPÍTULO III – METODOLOGIA	64
III.1 – Cultura e armazenamento de micobactérias	66
III.2 – Quantificação do número de bacilos e diluições sucessivas	66
III.3 – Método de inativação das micobactérias	67
III.4 – Dopagem com ¹⁰ B e fixação térmica das micobactéria nas lâminas de CR-39	67
III.5 – Procedimentos do uso da caseína para fixar as amostras de <i>M. marinum</i>	68
III.6 – Procedimentos do uso do glutaraldeído para fixar as amostras de MNT	69
III.7 – Procedimento para cultivo de <i>M. fortuitum</i> utilizando Agar Middlebrook 7H9 base A	69

III.8 – Dopagem durante a fase exponencial	69
III.8.1 – Procedimento para dopagem de <i>M. fortuitum</i> durante cultivo em Agar Middlebrook 7H9 base A	70
III.9 – Dendrímeros como carreadores de boro	71
III.9.1 – Preparação da solução de complexo PAMAM G4 com borato de sódio	72
III.9.2 – PAMAM G4 e borato de sódio na dopagem de <i>M. fortuitum</i> cultivadas no meio de cultura 7H9	73
III.9.3 – PAMAM G4 e borato de sódio na dopagem de <i>M. fortuitum</i> e <i>M. marinum</i> cultivadas no meio de cultura 7H9, CFA 0,2% e Glicose	73
III.10 – Ensaios neutrongráficos	74
III.10.1 – Arranjo neutrongráfico	74
III.10.2 – Condições de irradiação	76
III.10.3 – Tempo de irradiação	76
III.11 – Revelação dos traços nucleares registrados nas lâminas de CR-39	77
III.12 – Visualização e captura das imagens neutrongráficas num microscópio óptico acoplado a uma câmara CCD	78
CAPÍTULO IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
IV.1 – Dopagem de <i>M. marinum</i> após inativação	81
IV.2 – Caseína como fixador de <i>M. marinum</i>	84
IV.3 – Formaldeído como fixador de <i>M. marinum</i>	86
IV.4 – Dopagem após inativação de <i>M. fortuitum</i> cultivadas em Agar Middlebrook 7H9 base	88
IV.5 – Dopagem durante o cultivo de <i>M. fortuitum</i> utilizando Agar Middlebrook 7H9 base A	90
IV.6 – PAMAM G4 e borato de sódio na dopagem de <i>M. fortuitum</i> cultivadas no meio de cultura 7H9	97
IV.7 – PAMAM G4 e borato de sódio na dopagem de <i>M. fortuitum</i> cultivadas no meio de cultura 7H9, CFA 0,2% e Glicose	101
IV.8 – PAMAM G4 e borato de sódio na dopagem de <i>M. marinum</i> cultivadas no meio de cultura 7H9, CFA 0,2% e Glicose	103

CAPÍTULO V – CONCLUSÕES E SUGESTÕES	106
V.1 – Conclusões	106
V.2 – Sugestões	108
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110

LISTA DE FIGURAS

Figura II.1 – Coeficientes de atenuação de alguns elementos para nêutrons térmicos e raios X	19
Figura II.2 – Diagrama ilustrativo das formas de interação nêutron-núcleo: espalhamento e absorção	20
Figura II.3 – Esquema do método de exposição direta utilizando filme radiográfico	28
Figura II.4 – Esquema do método da exposição indireta ou por transferência	29
Figura II.5 – Esquema do perfil microscópico do traço de uma partícula carregada no detector	32
Figura II.6 – Influência do ângulo de incidência na revelação de um traço nuclear: a) se $\phi < \phi_c : V_g > V_t \text{sen}\phi$, o traço não é revelado; b) se $\phi = \phi_c : V_g = V_t \text{sen}\phi$, o traço não é revelado; c) se $\phi > \phi_c : V_g < V_t \text{sen}\phi$; o traço é revelado	34
Figura II.7 – a) Representação esquemática da membrana plasmática. b) Representação dos fosfolipídios em bicamadas. c) As porções hidrofílicas ficam em contato com a água dos meios interno e externo celular, enquanto as hidrofóbicas situam-se internamente na membrana, afastadas da água	38
Figura II.8 – Representação esquemática da parede celular de <i>Mycobacterium</i> , sendo seus principais constituintes: (a) Glicolípideos; (b) Ácidos micólicos; (c) Arabinogalactano; (d) Peptideoglicano; (e) Lipoarabino manano; (f) Membrana citoplasmática; (g) Proteínas da parede celular e da membrana	39

Figura II.9 – Colorações: a) <i>Staphylococcus aureus</i> : Cocos gram-positivos. b) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : Bacilos gram-negativos; c) Ziehl-Neelsen (rosa forte): Bacilos álcool-ácido resistentes compatíveis com <i>M. avium</i> subespécie <i>paratuberculosis</i> em esfregaço de tecidos	42
Figura II.10 – Esquema do processo geral da fissão binária em um bacilo	43
Figura II.11 – O gráfico número de células (escala aritmética) versus tempo, mostrando o crescimento exponencial celular	45
Figura II.12 – Número de células (escala logarítmica) versus tempo de crescimento	45
Figura II.13 – Curva de crescimento bacteriano. 1-Fase lag; 2-Fase exponencial ou logarítmica; 3-Fase estacionária e 4-Fase de morte ou declínio	46
Figura II.14 – Métodos para estimar o aumento do número de organismos	49
Figura II.15 – Métodos para se estimar o aumento da massa de uma cultura bacteriana ou a quantidade de protoplasma	50
Figura II.16 – Representação do método divergente de síntese	61
Figura II.17 – Representação do método convergente de síntese	62
Figura II.18 – Estrutura de um dendrímero PAMAM de primeira geração (G1)	62
Figura III.1 – Roteiro do procedimento para a obtenção da imagem neutrongráfica de micobactérias	65
Figura III.2 – Esquema do método de diluições sucessivas do meio contendo a suspensão de micobactérias, na escala McFarland	67

Figura III.3 – Roteiro do procedimento para a obtenção da imagem neutronográfica da <i>M. fortuitum</i> com realização de dopagem durante o período de cultura	70
Figura III.4 – Roteiro do procedimento para a obtenção da imagem neutronográfica da <i>M. fortuitum</i> utilizando o dendrímero de quarta geração para fazer a dopagem com o boro durante o período de cultura (fase exponencial), ou seja, antes da Inativação	72
Figura III.5 – Representação do núcleo do reator Argonauta/IEN/CNEN. Os 5 (cinco) orifícios possibilitam as medidas experimentais	74
Figura III.6 – Esquema do interior do canal de irradiação J-9 instalado no reator Argonauta – medidas em cm	75
Figura III.7 – Representação da montagem experimental da irradiação da amostra depositada no CR-39 que se encontra fixado na placa de alumínio	76
Figura III.8 – Curva característica do detector de traços CR-39	77
Figura IV.1 – Imagens bidimensionais de defeitos ou danos na superfície do CR-39 devido ao processo de fabricação, transporte ou manuseio no laboratório	80
Figura IV.2 – Imagens de traços de partículas alfa, produto da reação $^{10}\text{B}(n, \alpha)^7\text{Li}$ registrados no detector sólido de traços nucleares, CR-39: a) Imagens de traços circulares; b) Imagens de traços elípticos	80
Figura IV.3 – Imagens neutronográficas obtidas, após utilização do método físico para inativação da <i>M. marinum</i> . As figuras (a) e (b) mostram as imagens de danos, destacados com elipses, e traços de partículas α presentes nas lâminas, destacados com quadrados	82

- Figura IV.4 – Imagens neutrongráficas obtidas após utilização do método químico, utilizando hipoclorito de sódio e formaldeído, figuras (a) e (b), respectivamente, para inativação da *M. marinum*. Nas duas imagens são visualizados danos, destacados com elipses, e traços de partículas α presentes nas lâminas, destacados com quadrados 83
- Figura IV.5 – Caracterização morfológica por Neutrongrafia de *M. marinum*, inativadas por autoclave e fixadas na lâmina de CR-39 com caseína. Os destaques circulares representam bacilos e os quadrangulares, traços nucleares isolados 85
- Figura IV.6 – Caracterização morfológica de *M. marinum*, quando submetida à ação de hipoclorito de sódio e caseína, por imagem neutrongráfica. Na figura (a) o destaque circular representa aglomerações de bacilos, enquanto que na (b), os destaques retangulares referem-se aos traços nucleares isolados 86
- Figura IV.7 - Caracterização morfológica de *M. marinum*, quando submetida à ação de glutaron e formaldeído, por imagem neutrongráfica. Nas figuras (a) e (b) os destaques circulares representam os aglomerados de bacilos e os retangulares são imagens de traços nucleares 87
- Figura IV.8 – Aglomerados de *M. marinum* visualizadas por: (a) Microscopia Óptica; (b) Microscopia Eletrônica de Varredura 88
- Figura IV.9 – Imagens de *M. fortuitum* depositadas no CR-39, dopadas com 10 μ l de borato de sódio e incubadas na temperatura de 4°C, em tempos variáveis: (a) 30 minutos, (b) 60 minutos e (c) 120 minutos. As setas indicam bacilos isolados e os círculos, danos ou defeitos no CR-39 89
- Figura IV.10 – Imagens de *M. fortuitum* depositadas no CR-39, dopadas com 10 μ l de borato de sódio e incubadas na temperatura de 37°C, em diferentes tempos de incubação: (a) 30 minutos, (b) 60 minutos e (c) 120 minutos. As setas destacam alguns bacilos isolados ou aglomerados 90

- Figura IV.11 – Imagens neutronográficas obtidas com amostra contendo *M. fortuitum* crescidas no meio 7H9 com boro e glicose, a 30°C, durante 7 dias e inativadas com hipoclorito de sódio. As figuras (a) e (b) apresentam apenas defeitos ou danos das lâminas do CR-39 e traços nucleares 91
- Figura IV.12 – Imagens neutronográficas obtidas com amostra contendo *M. fortuitum* crescidas no meio 7H9 a 37°C e inativadas com hipoclorito de sódio: (a) imagens características de bacilos; (b) ampliação parcial da imagem selecionada em (a) que se assemelha aos bacilos em análise 92
- Figura IV.13 – Imagem neutronográfica revelando a ausência das *M. fortuitum* crescidas no meio 7H9 com boro e glicose, a 30°C, durante 7 dias e inativadas com hipoclorito de sódio 93
- Figura IV.14 – Imagens neutronográficas obtidas com amostra contendo *M. fortuitum* crescidas no meio 7H9 a 37°C e inativadas com hipoclorito de sódio. Nas imagens (a) e (c) são observados bacilos aglomerados e na (b) imagens conclusivas de bacilos isolados 93
- Figura IV.15 – Figura IV.9 – Imagens neutronográficas obtidas com uma amostra contendo *M. fortuitum* crescidas no meio 7H9, a 30°C, com adição de boro, glicose e CFA 0,2%, e inativadas com hipoclorito de sódio. A imagem (c) se diferencia da (a) e (b), pois não existem aglomerações de bacilos 94
- Figura IV.16 – Imagens neutronográficas obtidas de uma lâmina contendo amostra de *M. fortuitum* crescidas no meio 7H9, a 37°C, com adição de boro, glicose e CFA 0,2%, inativadas com hipoclorito de sódio: (a) imagens de bacilos isolados; (b) imagem de bacilos posicionados numa única direção 95
- Figura IV.17– Imagens de defeitos ou danos no CR-39 e traços de partículas alfa registrados no detector sólido de traços nucleares. Nas figuras (a) e (b) não foram encontradas imagens semelhantes à de bacilos 96

- Figura IV.18 – Imagem neutronográfica de uma lâmina de CR-39, sem depósito de MNT, dopada com boro 96
- Figura IV.19 – Caracterização morfológica de *M. fortuitum*, dopadas com a solução na proporção molar 10:1 de borato de sódio/PAMAM, na temperatura de 4°C e tempos de incubação: (a) 30 minutos e (b) 120 minutos 97
- Figura IV.20 – Caracterização morfológica de *M. fortuitum*, quando dopadas com a solução de borato de sódio/PAMAM, na proporção molar 10:1. A temperatura e o tempo de incubação foram iguais a 4°C e 60 minutos, respectivamente 98
- Figura IV.21 – Caracterização morfológica de *M. fortuitum*, quando dopadas com solução de complexo PAMAM G4 e borato de sódio de proporções molares de 10:1 e 20:1: (a) encontram-se aglomerados de *M. fortuitum* dopadas na proporção molar 10:1, na temperatura e tempo de incubação de 37°C e 60 minutos, respectivamente; (b) visualizam-se bacilos isolados dopados na proporção molar 20:1, na temperatura e tempo de incubação de 4°C e 30 minutos, respectivamente 99
- Figura IV.22 – Caracterização morfológica de *M. fortuitum*, dopadas com a solução borato de sódio/PAMAM, na proporção molar 20:1, na temperatura e no tempo de incubação de 37°C e 30 minutos, respectivamente: (a) o destaque circular representa bacilo isolado e o quadrado, aglomeração de bacilos; (b) as setas indicam imagens de bacilos com a parede celular rompida 100
- Figura IV.23 – Caracterização morfológica de *M. fortuitum*, quando dopadas com a solução de complexo PAMAM G4 e borato de sódio, na proporção molar 20:1 de borato de sódio/PAMAM. A temperatura e o tempo de incubação foram iguais, respectivamente, a 37°C e 120 minutos 101
- Figura IV.24 – Caracterização morfológica de *M. fortuitum* cultivadas em 7H9 com adição de glicose e Citrato de Ferro Amoniacal (CFA) a 0,2 % e dopadas com a solução de borato de sódio/PAMAM, na proporção molar 10:1. Nas figuras (a) e (b) as temperaturas de incubação utilizadas foram 30°C e 37°C, respectivamente, ambas realizadas num período de 30 minutos 102

Figura IV.25 – Caracterização morfológica de *M. fortuitum* cultivadas em 7H9 com adição de glicose e Citrato de Ferro Amoniacal (CFA) a 0,2 % e dopadas, durante 30 minutos, com a solução de borato de sódio/PAMAM, na proporção molar 20:1. Temperaturas de incubação: (a) 30°C e (b) 37°C 103

Figura IV.26 – Caracterização morfológica de *M. marinum* cultivadas no meio de cultura 7H9 com adição de glicose e Citrato de Ferro Amoniacal (CFA) a 0,2 % e dopadas, durante 30 minutos, com solução de borato de sódio/PAMAM, nas proporção molar 10:1. Temperaturas de incubação: (a) 30°C e (b) 37°C 104

Figura IV.27 – Caracterização morfológica de *M. marinum* cultivadas no meio de cultura 7H9 com adição de glicose e Citrato de Ferro Amoniacal (CFA) a 0,2 % e dopadas, durante 30 minutos, com solução de borato de sódio/PAMAM, na proporção molar 20:1. Temperaturas de incubação: (a) 30°C e (b) 37°C 105

LISTA DE TABELAS

Tabela II.1 – Classificação dos nêutrons segundo sua energia cinética	17
Tabela II.2 – Propriedades nucleares de conversores de nêutrons e <i>screens</i> intensificadores	27
Tabela II.3 – Dependência entre a geometria dos traços, o ângulo de incidência da partícula e a relação entre V_t e V_g	33
Tabela II.4 – Relação entre o grau de turvação indicado pela escala de McFarland e a concentração de bactérias	51
Tabela II.5 – Classificação das MNT pelo tempo de crescimento e pela produção de pigmento	57
Tabela III.1 – Composição de meio de cultura da <i>M. fortuitum</i>	71
Tabela III.2 – Características do feixe de nêutrons provindos do reator Argonauta	76

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS - Acquired Immunodeficiency Syndrome

BAAR - Bacilos álcool-ácido resistentes

H - hidrogênio

H₂O - água

HCl - ácido clorídrico

min - minuto

mg - miligramas

ml - mililitros

mm – milímetros

MNT – Micobactérias Não Tuberculosas

OMS - Organização Mundial da Saúde

PCR - Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

RNA - ácido ribonucléico

s - segundo

µg - micrograma

µl - microlitro

µm - micrômetro

°C - graus Celsius

% - por cento

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

I.1 – Generalidade

I.1.1 – Ensaio Não-Destrutivos

Os Ensaio Não Destrutivos (END) são técnicas utilizadas na inspeção de materiais e equipamentos sem danificá-los, sendo executados nas etapas de fabricação, construção, montagem e manutenção (ANDREUCCI, 2010). Constituem uma das principais ferramentas do controle da qualidade de materiais e produtos, contribuindo para garantir a qualidade, reduzir os custos e aumentar a confiabilidade da inspeção. São largamente utilizadas nos setores petróleo/petroquímico, químico, aeronáutico, aeroespacial, siderúrgico, naval, eletromecânico, papel e celulose, entre outros. Na área nuclear, são utilizados na inspeção e controle de materiais nucleares, condições de criticalidade e técnicas de imageamento baseadas na transmissão da radiação pela matéria. Contribuem para a qualidade dos bens e serviços, redução de custo, preservação da vida e do meio ambiente, sendo fator de competitividade para as empresas que os utilizam.

Os END incluem métodos capazes de proporcionar informações a respeito do teor de defeitos de um determinado produto, das características tecnológicas de um material, ou ainda, da monitoração da degradação em serviço de componentes, equipamentos e estruturas. Os métodos mais usuais de END são: ensaio visual, líquido penetrante, partículas magnéticas, ultrassom, radiografia (Raios X e Gama), correntes parasitas, análise de vibrações, emissão acústica, estanqueidade e análise de deformações.

Para se obter resultados satisfatórios e válidos, os seguintes itens devem ser considerados como elementos fundamentais para os resultados desses ensaios:

Pessoal treinado, qualificado e certificado.

Equipamentos calibrados.

Procedimentos de execução de ensaios qualificados, com base em normas e critérios de aceitação previamente definidos e estabelecidos.

Além do uso industrial, tem crescido significativamente a aplicação dos END na

conservação de obras de arte, no controle da camada de gordura de bovinos e suínos, sendo ainda difundida na medicina (ANDREUCCI, 2010).

I.1.2 – Aspectos da Neutronografia

O início do século passado foi marcado com o nascimento da Física Nuclear e, conseqüentemente, com as inúmeras aplicações de suas descobertas. Um dos notáveis resultados de pesquisas na área da Física Nuclear, especificamente, sobre a desintegração (ou transmutação) de núcleos por partículas α , foi a descoberta por Chadwick, em 1932, dos nêutrons. As diversas reações nucleares induzidas por nêutrons revelaram-se uma valiosa fonte de informações sobre o núcleo do átomo, produzindo novas espécies de nuclídeos. Esses nuclídeos gerados artificialmente passaram, então, a ser adicionais sobre os núcleos e aplicados nas áreas da Química, Biologia e Medicina. O uso de nêutrons em reações nucleares em cadeia, envolvendo materiais físséis, proporcionaram aplicações militares que marcaram época com o advento das bombas atômicas. Entretanto, quando utilizadas de forma controlada, geram poderosas fontes de calor industrial e de energia elétrica (KAPLAN, 1978).

As primeiras Radiografias com Nêutrons (NR), também conhecidas como Neutronografias, foram realizadas em Berlim, entre 1935 e 1938, por Kuhn e Kaufman; consiste numa radiografia que usa nêutrons como radiação incidente. Os nêutrons, por não apresentarem carga elétrica, atravessam as camadas eletrônicas dos átomos, interagindo com os núcleos atômicos, enquanto que os raios X e raios γ podem interagir com os elétrons orbitais (DOMANUS, 1992). Trata-se, portanto, de uma importante ferramenta de inspeção Não-Destrutiva de corpos de prova, quando a Radiografia-x ou a Gamagrafia não são capazes de visualizar seus defeitos, ou, ainda, numa análise complementar a essas técnicas.

Inicialmente, o principal campo de aplicação da Neutronografia, foi na indústria, mas, graças ao crescente desenvolvimento das pesquisas, seu uso se expandiu para outros, tais como (DOMANUS, 1992): Segurança Pública, na detecção de drogas e explosivos plásticos (FERREIRA, 2008); indústria química e petroquímica; indústria aeroespacial; no controle da linha de montagem; transferência de calor, na visualização de escoamento bifásico em tubulações metálicas e medidas de vazão; manutenção de helicópteros, aeronaves e inspeção de turbinas; detecção de corrosões ocultas, umidade, falhas na distribuição de adesivos.

O arranjo necessário para se realizar uma Neutronografia é constituído de uma fonte de nêutrons, um colimador do feixe neutrônico, um conversor e um dispositivo para registro e visualização da imagem. A fonte de nêutrons pode ser extraída de um reator nuclear, de um acelerador de partículas ou de uma fonte radioisotópica. Na escolha da fonte devem-se levar em consideração os seguintes fatores: a) a intensidade e a energia de emissão dos nêutrons; b) a relação entre o fluxo neutrônico e de radiações γ ; c) tamanho; d) portabilidade; e) resolução do sistema; f) blindagem necessária; g) custo.

Os nêutrons se movem no meio moderador de maneira completamente aleatória. Para se extrair um feixe, instalam-se, no interior dos canais de irradiação, tubos colimadores, que conduzirão os nêutrons até a posição de irradiação das amostras. As paredes dos tubos colimadores devem ser revestidas com materiais que possuam elevada secção de choque para absorção de nêutrons, de modo a definir a forma do feixe e caracterizar sua divergência angular. Além disso, a radiação secundária produzida pela absorção do nêutron deve ter baixa probabilidade de ser detectada pelo sistema de detecção e registro da imagem. São empregados, comumente, três tipos de colimadores: multitubos, multiplacas e cônico divergente (HARDT & ROETTGER, 1981).

Uma imagem neutrongráfica é registrada, mediante o uso de um arranjo composto de uma tela conversora, que converte os nêutrons em radiação secundária, capaz de sensibilizar um sensor radiográfico, acoplado intimamente a ela. Dentre os sensores, destacam-se os filmes radiográficos argênteos e os polímeros, tais como o CR-39 (Carbonato de Diglicol Alílico – $H_{18}C_{12}O_{17}$). Com o avanço tecnológico, a imagem neutrongráfica passou a ser obtida por sensores eletrônicos, que permitem a visualização de eventos dinâmicos, em tempo real (FERREIRA, 2003). Na Neutrografia em tempo real (NRTR), uma tela conversora cintiladora é acoplada a uma câmara digital (CCD).

I.1.3 – Aspectos da Microbiologia

Segundo análise de dados geoquímicos, acredita-se que a Terra tenha 4,6 bilhões de anos e a primeira evidência de vida microbiana foi encontrada em rochas de aproximadamente 3,86 bilhões de anos. Algumas rochas antigas apresentam microfósseis semelhantes a formas bacterianas, tais como, simples bacilos ou cocos. Existem formações microbianas, denominadas *estromatólitos*, com aproximadamente, 3,5 bilhões de anos. Estromatólitos correspondem a massas microbianas fossilizadas,

formadas por camadas de procariotos filamentosos e sedimentos aprisionados (MADIGAN *et al.*, 2004).

Apesar do longo tempo de existência da vida bacteriana, sua comprovação demorou centenas de anos. Tais estudos deram origem a uma nova ciência: a Microbiologia. A Microbiologia é a ciência que estuda os micro-organismos - um grande e diverso grupo de organismos microscópicos, que podem ser encontrados como células únicas ou em agrupamentos celulares. Dentre eles, estão incluídos os vírus, seres de natureza acelular. A partir dessas definições, os micro-organismos podem ser diferenciados das células de origem animal ou vegetal, incapazes de sobreviver de forma unicelular na natureza, sendo sempre encontradas como parte de organismos multicelulares. Diferentemente dos organismos macroscópicos, os microscópicos são, em geral, capazes de realizar seus processos vitais de crescimento, geração de energia e reprodução, sem depender de outras células, sejam essas do mesmo tipo ou não (MADIGAN *et al.*, 2004).

Essa área do conhecimento teve seu início com os relatos de Robert Hooke e Antony van Leeuwenhoek, ao desenvolverem microscópios, que possibilitaram as primeiras observações de bactérias e outros micro-organismos, a partir da análise de diversos espécimes biológicos. Embora van Leeuwenhoek seja considerado o "pai" da microbiologia, os relatos de Hooke, descrevendo a estrutura de um bolor, foram publicados anteriormente aos de Leeuwenhoek. Assim, embora Leeuwenhoek tenha fornecido importantes informações sobre a morfologia bacteriana, esses dois pesquisadores foram os pioneiros nesta ciência (MADIGAN *et al.*, 2004).

As características nocivas dos micro-organismos são responsáveis pela má impressão que todos possuem da sua existência. Entretanto, eles também são os principais agentes da manutenção do equilíbrio dos seres vivos. Dentre as aplicações e funções dos micro-organismos, destacam-se:

- a) Na agricultura: fixação de N_2 , ciclo dos nutrientes.
- b) Nos alimentos: preservação e fermentação (iogurtes, queijos, pães, vinagre, bebidas alcoólicas) dos alimentos, aditivos alimentícios (glutamato, monossódico, ácido cítrico, leveduras).
- c) Doenças: identificação de novas doenças, tratamento-cura-prevenção de doenças.
- d) Energia/meio ambiente: bicomustíveis (CH_4), biorremediação e mineração microbiana.

- e) Biotecnologia: organismos geneticamente modificados, síntese de produtos farmacêuticos, terapia genética para certas doenças.

Num homem adulto, por exemplo, existem cerca de 100 trilhões de células microbianas; as células microbianas presentes no intestino, por exemplo, são responsáveis pela digestão e síntese de vitamina K e algumas do complexo B. Em contra partida, a presença desses micro-organismos, também, pode ser nociva e podem levar a morte quando não diagnosticada e combatida no tempo adequado (TORTORA *et al*, 2005).

Neste trabalho, os micro-organismos de interesse são as bactérias pertencentes ao gênero *Mycobacterium*, especificamente a *Mycobacterium fortuitum* e *Mycobacterium marinum*. As micobactérias caracterizam-se pelo perfil tintorial álcool-ácido resistente, genoma com elevado teor de guanina e citosina (conteúdo G+C) e ácidos micólicos na parede bacteriana, com 60-90 átomos de carbono (PFYFFER *et al*, 2003).

As micobactérias, que são ubiqüitárias no meio ambiente, receberam várias denominações dentre elas: “atípicas”, “micobactérias não tuberculosa” e “micobactéria outra que não o bacilo da tuberculose” (FALKIMAN, 1996; NEUMANN *et al*, 1997; DAILLOUX *et al*, 1998).

O estudo das "Micobactérias Não Tuberculosas" (MNT) despertou interesse entre os pesquisadores brasileiros, e, em 1938, o isolamento e a descrição de *M. fortuitum* por Costa Cruz representou um marco no estudo das micobacterioses no Brasil (CRUZ, 1938).

A identificação ocorre por métodos fenotípicos e moleculares. A identificação, por métodos fenotípicos e se baseia nas características, tais como: velocidade de crescimento, produção de pigmento, temperatura de incubação, crescimento em meio de cultura específico, agentes inibidores e testes bioquímicos. Porém, esses métodos demandam um gasto considerável de tempo e, muitas vezes, fornecem resultados inconclusivos. Um dos métodos moleculares utilizados para a identificação de micobactérias é o PRA (PCR-Restriction Enzyme Analysis), entretanto, como nem sempre é possível uma identificação precisa no nível de espécie outras ferramentas moleculares, como o sequenciamento de diferentes alvos genéticos, são necessárias para a identificação precisa no nível de espécie (DROSTEN *et al*, 2003; YAM *et al*, 2006; PERNG *et al*, 2012).

A avaliação das características das culturas e a realização de testes bioquímicos constituem os métodos tradicionais (convencionais) para a identificação de

micobactérias (LEÃO *et al.*, 2005; KATOCH *et al.*, 2007). É importante ressaltar que a maioria desses testes é de simples execução e não exige equipamentos sofisticados, entretanto, eles são trabalhosos e muito demorados, uma vez que dependem do crescimento das micobactérias, atrasando desta forma a identificação e, conseqüentemente, o diagnóstico, o que pode levar a conseqüências sérias em nível clínico. Apesar desses inconvenientes, esses testes permanecem e constituem o procedimento principal para a identificação de micobactérias, na maioria dos laboratórios clínicos, especialmente nos de baixos recursos econômicos (LEÃO *et al.*, 2005).

I.2 – Motivação para a realização desta pesquisa

As Micobactérias Não Tuberculosas (MNT) encontram-se dispersas na natureza e ao contrário das espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, apresentam patogenicidade variável. A capacidade das MNT em produzir doença está claramente documentada na literatura e sua importância vem aumentando progressivamente, com isolamentos de diferentes espécies nos laboratórios de micobactérias.

De 1991 a 1997, foram analisados, no estado de São Paulo, 2053 cepas de MNT isoladas de 1267 pacientes. Dez espécies foram identificadas, entre elas *M. marinum* (6 casos) e *M. fortuitum* (49 casos) (UEKI *et al.*, 2005).

O Centro Nacional de Referência em Doenças Micobacteriana e Drogas resistentes organizou um estudo sobre as infecções causadas por *M. marinum* que ocorreram na França, entre 1996 e 1998. Sessenta e seis pacientes de 31 hospitais participaram dessa pesquisa. Foram confirmados 63 casos de contaminação por *M. marinum*.

Em 1999, foram diagnosticados 23 casos de ceratite, na cidade do Rio de Janeiro, dos quais um foi causado por *M. abscessos*, após cirurgia a laser (LASIK - laser *in situ* keratomieleusis) para correção de miopia, e 22 pacientes com diagnóstico laboratorial de infecção por *M. chelonae*, entretanto, a fonte de infecção não foi determinada. Um ano depois do surto na cidade do Rio de Janeiro, dez pacientes em uma única clínica em São Paulo também foram diagnosticados com ceratite, após LASIK, causada por *M. chelonae*. Nesse mesmo ano, foram diagnosticados abscessos cutâneos em dez pacientes submetidos à mesoterapia, em uma clínica em São Paulo (SAMPAIO *et al.*, 2006).

Entre 2002 e 2004, em Campinas, confirmaram-se quatorze casos (50 suspeitos)

de infecção de pele e subcutâneo por *Mycobacterium abscessus*, *M. fortuitum* e *Mycobacterium porcinum* após procedimentos cirúrgicos de implante de prótese de silicone (PADOVEZE *et al*, 2007).

Em 2004, após operações por videolaparoscopia e mesoterapia, 310 pacientes, de diferentes serviços de saúde da cidade de Belém do Pará foram diagnosticados com infecções causadas por *M. abscessus*, *Mycobacterium massiliense* e *Mycobacterium bolleti* (VIANA *et al*, 2008).

A maior epidemia de infecções causadas por Micobactérias de Crescimento Rápido (MCR) ocorreu entre 2006 e 2007 no Rio de Janeiro. Foram notificados, em 63 hospitais, 1051 casos suspeitos, sendo 197 confirmados.

Foi no Espírito Santo, principalmente em 2007, o segundo maior surto de contaminação por MNT. Foram 248 casos notificados com 79% de confirmação (GARCIA, 2007).

A identificação das MNT pode ser feita por métodos fenotípicos, moleculares ou pela combinação de ambos, entretanto, ambos os métodos apresentam algumas limitações. As principais limitações do método fenotípico consistem no tempo relativamente longo para obtenção de resultados e a dificuldade de diferenciação de diversas espécies. Alguns testes bioquímicos podem apresentar resultados duvidosos, mesmo se utilizando controles de qualidade adequados. Para obtenção do resultado final de identificação pelo método fenotípico, deve-se considerar o conjunto de todos os testes (LEÃO *et al*, 2004). As principais limitações do método de PRA-*hsp65* consistem no fato de que algumas espécies apresentam perfil de PRA ainda não descrito na literatura ou um perfil de PRA compartilhado por mais de uma espécie (BRUNELLO *et al*, 2001).

I.3 – Objetivo e relevância do trabalho

A técnica neutronográfica tem se mostrado como uma ferramenta eficiente para a caracterização morfológica de bactérias; uma das vantagens da radiografia com nêutrons é a ampliação de 1000 x nas imagens das amostras através do processo de revelação do detector de traços nucleares usado em todos os ensaios desta pesquisa. Com base nos últimos resultados, resolveu-se utilizar uma metodologia baseada em ensaios nucleares e marcadores específicos visando a caracterização morfológica de MNT, especificamente, *M. marinum* e *M. fortuitum*.

Espera-se que a utilização da Neutronografia minimize o tempo do diagnóstico de doenças causadas por micobactérias que infectam a população mundial, uma vez que a fase de pré-cultivo é desnecessária. É importante salientar que o objetivo não é substituir nenhuma das técnicas já utilizadas para este fim, mas, sim, desempenhar um papel coadjuvante no diagnóstico da contaminação.

Além do objetivo principal ainda existem os secundários, sendo eles:

- Fixar as MNT no detector CR-39 utilizando Caseína ou Formaldeído;
- Testar a eficiência da inativação das MNT pelos processos físicos e químicos;
- Verificar se a incorporação do boro deve ser realizada durante o cultivo ou após inativação das micobactérias;
- Avaliar a utilização dos dendrímeros como transportadores de boro até as micobactérias.

A presente proposta de pesquisa subdivide-se em cinco capítulos, cujo conteúdo subdivide-se:

No capítulo inicial, discorreu-se sobre as características das micobactérias e da técnica neutronográfica, os surtos de contaminação por MNT no Brasil e a evolução das pesquisas tanto na área Neutronográfica quanto na Microbiológica. Foram apresentados os objetivos, a relevância e a motivação para a realização desta pesquisa.

No capítulo II, foram apresentados os fundamentos teóricos relacionados a Neutronografia; aos detectores de traços nucleares; a Microbiologia, em especial, ao gênero *Mycobacterium* e algumas considerações sobre os dendrímeros.

O sistema neutronográfico utilizado, os protocolos de preparação das amostras biológicas, o procedimento de revelação dos traços nucleares, a microscopia das amostras, a aquisição e o processamento das imagens neutronográficas constam no capítulo sobre a metodologia empregada na pesquisa.

As imagens neutronográficas obtidas com a utilização ou não dos dendrímeros foram apresentadas e analisadas no capítulo IV.

No capítulo final, encontram-se as conclusões sobre a caracterização morfológica de MNT, bem como as sugestões de continuidade desta pesquisa.

I.4 – Revisão bibliográfica

As pesquisas de Walther Bothe, em 1930, mostrou que, ao bombardear um alvo de berílio com partículas alfas, uma radiação desconhecida e altamente penetrante era gerada como produto da reação nuclear (GAMOW, 1963). Desde a descoberta do nêutron, em 1932, pelo físico inglês James Chadwick, o papel e a importância da física do nêutron cresceram marcadamente, havendo agora um largo interesse nos métodos e nas novas aplicações. James Chadwick, utilizando dos dados da pesquisa de Walther Bothe, também provou que sua massa era igual a 1,008664904 (14) unidade de massa atômica (u.m.a.) e que era desprovido de carga. As aplicações da física do nêutron dependem do conhecimento de suas propriedades e da compreensão da interação deles com a matéria (KAPLAN, 1978). A utilização de nêutrons como projéteis nucleares só ocorreu em 1934, com o físico Enrico Fermi; ele demonstrou que a transformação nuclear ocorre em quase todos os elementos sujeitos ao bombardeamento com nêutrons. A pesquisa de Fermi levou à descoberta da fissão nuclear e à produção de elementos com que estão além do que era até então a Tabela Periódica (PRIZE NOBEL, 1938).

I.4.1 – Neutronografia

O século XX, especificamente a década de 30, foi marcado pelas grandes descobertas relacionadas ao nêutron, dentre elas, sua aplicação na obtenção de imagens, ou seja, a Neutronografia.

A técnica de radiografia com nêutrons foi introduzida no Laboratório de Instrumentação Nuclear da COPPE/UFRJ através das teses de mestrado de Santos, J., em 1977; Pinheiro, R., em 1979 e de Pessôa, R., em 1980, orientados pelo professor Jonh D. Rogers. Outros trabalhos marcantes foram realizados, dentre eles: Em 1993, V. R. Crispim defendeu sua tese de doutorado, cujo título foi “*Desenvolvimento de Ensaios Não-Destrutivos com Neutronografias*”; Este trabalho tinha como objetivo detectar e localizar corrosões ocultas em ligas de alumínio AA7075; No ano de 1999, Hacidume defendeu a tese de mestrado intitulada “*Detecção de explosivos plásticos por NR térmica*”; Ferreira, F., 2003, “*Estudo para Implantação de um Sistema Eletrônico para Aquisição de Imagens Neutronográficas no Reator Argonauta do IEN/CNEN*”.

Para o desenvolvimento desta pesquisa, destacam-se os trabalhos do grupo do Laboratório de Neutronografia em Tempo Real (LNRTR), instalado no bloco I-2000 –

Setor MM2 da COPPE/UFRJ, chefiado pela professora Verginia Reis Crispim:

Em 1999, R. Wacha apresentou, em sua dissertação, um novo método de detecção de micro-organismos em diversos meios de cultura, tais como, água potável e fluidos corporais. Após os processos de crescimento no meio de cultura, separação e resuspensão em solução tampão à base de boro, os micro-organismos foram depositados em detectores de traços, sendo estes submetidos a um feixe de nêutrons térmicos $2,2 \times 10^5 \text{ n/cm}^2 \cdot \text{s}$). Os traços latentes registrados pelas partículas alfa provenientes da reação $B(n,\alpha)Li$ foram analisados por um microscópio óptico, que permitiu detectar a existência dos micro-organismos. Complementando a análise, um Microscópio de Força Atômica, conhecido como nanoscópio, foi utilizado para comprovar essa identificação através da geometria dos traços das partículas alfa (WACHA, 1999).

Em 2001, Lopes, J., em sua tese de doutorado, intitulada “*Caracterização Morfológica e Análise Quantitativa de Bactérias In Vitro por Técnicas Nucleares de Medida*”, conseguiu reduzir o tempo de caracterização morfológica de bactérias, mediante o uso da técnica neutronográfica, visando estabelecer um método mais rápido e auxiliar aos métodos já existentes. As amostras contendo micro-organismos, bactérias com diferentes morfologias, após os procedimentos microbiológicos adequados foram incubadas com B^{10} durante 30 minutos e em seguida depositadas numa placa de um detetor sólido de traços nucleares (SSNTD), denominado CR-39. Para a formação das imagens relativas às bactérias o detetor foi submetido a um fluxo de nêutrons térmicos da ordem de $2,2 \cdot 10^5 \text{ n/cm}^2 \cdot \text{s}$ provindos do canal J-9 do Reator Argonauta IEN/CNEN. Para observar as imagens das bactérias em microscópio óptico, as lâminas passaram por processo de revelação química. A análise das imagens revelou diferenças morfológicas entre as espécies em amostras contendo bactérias isoladas ou misturadas (LOPES, 2001).

Em 2009, Lima, C., desenvolveu sua tese de doutorado, “*Ensaio Neutronográfico para Estudo Morfológico de Micobactérias*”, com o objetivo de caracterizar morfolologicamente e a quantificar bacilos em amostras cultivadas e clínicas (secreções), por meio de imagens neutronográficas de bactérias do gênero *Mycobacterium*, em especial da *Mycobacterium tuberculosis*, num menor tempo de diagnóstico, em relação ao requerido pelas técnicas de baciloscopia e de cultura, utilizadas em laboratórios de análises clínicas.

Atualmente, a Neutronografia é conhecida e utilizada mundialmente como uma técnica de Ensaio Não-Destrutivos. Para o registro das imagens obtidas existem

dispositivos, tais como: filmes fotográficos, sensores eletrônicos, detectores de traços nucleares (SSNTD).

I.4.2 – Detectores de traços nucleares de estado sólido (SSNTD)

Os Detectores Sólidos de Traços Nucleares (SSNTD - Solid State Nuclear Tracks Detectors), são materiais com capacidade de registrar danos causados por radiações nucleares de partículas pesadas (alfa, prótons e fragmentos de fissão) (ENGE, 1980).

Em 1958, o químico inglês David Young, pesquisador da *General Electric Research Laboratory*, descobriu o princípio dos Detectores Sólidos de Traços Nucleares (SSNDT) observando, num microscópio óptico, traços superficiais registrados por partículas carregadas, em lâminas de fluoreto de lítio, após submetê-las a um ataque químico (YOUNG, 1958).

No ano seguinte, Silk e Barnes, no mesmo laboratório e usando um Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET), observaram o registro de traços em muscovita natural e mica, quando cobertas por lâminas de urânio e expostas a um feixe neutrônico provindo de um reator nuclear (SILK e BARNES, 1959).

Num trabalho de Cartwright, Shirk e Price, em 1978, foi descoberto que o polímero CR-39 (Columbia Resina), um plástico resultante da polimerização do monômero líquido Carbonato de Diglicol Alílico, desenvolvido, em 1933, para a fabricação de lentes, era muito eficiente para detectar partículas carregadas (CARTWRIGHT, SHIRK e PRICE, 1978).

Nos anos que se seguiram, as pesquisas voltadas ao estudo das propriedades do CR-39 como material detector revelaram que ele apresentava uma alta sensibilidade para detectar nêutrons com energias entre 100 keV e 18 MeV. A nitidez com que os traços gravados apareciam sobre a superfície do detector possibilitou o desenvolvimento de sistemas automáticos de contagem de traços, dotados de microscópio óptico, monitor de TV, câmera fotográfica e analisador de imagem. Essa capacidade tornou os detectores CR-39 bastante populares nos meios científicos. Atualmente, o tipo de CR-39 mais utilizado na técnica de detecção de traços é o PM355 SUPERGRADE, uma versão melhorada do CR-39, fabricado pela empresa Page Mouldings Ltda (Pershore) que é sensível a prótons com energias acima de 200 keV e apresenta menos defeitos inerentes ao processo de fabricação do que os CR-39 usados na fabricação de lentes de óculos. O notável desenvolvimento da técnica de detecção de traços nucleares em detectores

sólidos propiciou sua aplicação nas áreas de Geologia, Ciências Espaciais, Dosimetria das Radiações, Física das Altas Energias, Radiobiologia, Neutronografia, Alfagrafia, Metalurgia, Exploração de Urânio, dentre outras (SANTOS, 1988).

I.4.3 – Microbiologia

A origem da vida é uma das grandes questões científicas da humanidade e tem sido abordada pelos mais ilustres pensadores há milênios. Para o filósofo grego Aristóteles (384-322 a.C.), a vida era gerada espontaneamente por um princípio ativo (um tipo de energia capaz de produzir a vida). Ele defendia, portanto, a teoria denominada abiogênese, cujo nome vem do grego: *a* (prefixo que significa "sem"); *bio* (significa "vida") e *gênese* (significa "origem"). Esse princípio seria responsável, por exemplo, pelo desenvolvimento de um ovo no animal adulto, cada tipo de ovo tendo um princípio organizador diferente, de acordo com o tipo de ser vivo. Esse mesmo princípio organizador também tornaria possível que seres vivos completamente formados eventualmente surgissem a partir da "matéria bruta".

Durante a Idade Média, essa hipótese contou com defensores ilustres, como Santo Agostinho, São Tomás de Aquino, René Descartes e Isaac Newton.

Um dos primeiros opositores foi, o médico e naturalista florentino, Francesco Redi (1626-1698). Em resposta a teoria de Aristóteles, Redi, em 1668, demonstrou experimentalmente que só aparecem larvas de moscas na carne podre, quando deixamos moscas pousar nessa carne. Esta experiência abalou profundamente a teoria da geração espontânea.

A invenção do microscópio, atribuída a Galileu, foi na verdade fruto do aperfeiçoamento realizado pelo naturalista holandês Antony van Leeuwenhoek, que o utilizou na observação de seres vivos. Dotado de apenas uma lente de vidro, o microscópio primitivo inventado pelo pesquisador permitia aumento de percepção visual de até 300 vezes e com razoável nitidez. E tudo aquilo que se encontrava invisível aos olhos se tornou visível o suficiente para que fosse pesquisado. Este microscópio primitivo foi construído, em 1674, e com ele conseguiu-se observar bactérias de 1 a 2 micra (medida equivalente a um milésimo de milímetro).

A história da microbiologia inicia-se, em 1677, com Leeuwenhoek que por meio de suas cartas dirigidas a Sociedade Royal de Londres, relatou a existência de seres microscópicos "*animáculos*" observados por meio dos seus microscópios. Devido a

descoberta desses “animálculos”, duas escolas de pensamento sobre sua origem surgiram: a abiogênese e a biogênese. Muitos experimentos foram realizados para se comprovar a veracidade das duas teoria.

O conceito e o debate sobre a geração espontânea foi reavivado, em 1745, com os experimentos de John Needham. Ele cozinhou pedaços de frango, com o intuito de matar os micro-organismos pré-existentes; em seguida, colocou-os em frascos abertos. Needham observou o desenvolvimento de uma solução turva espessa de micro-organismos no frasco; era uma prova forte sobre a existência da geração espontânea.

Para que a ideia da geração espontânea fosse rejeitada definitivamente, o pesquisador italiano Lazzaro Spallanzani (1729-1799) fez um experimento semelhante ao realizado por Redi. Ele ferveu caldo de carne em uns frascos e destruiu os micro-organismos ali presentes. Manteve alguns frascos fechados e outros abertos. Os micro-organismos reapareceram somente nos frascos abertos.

Os defensores da teoria da abiogênese contestaram os resultados do experimento de Spallanzani, apresentando a suposição de que a falta de uma substância (o princípio ativo), que transformaria o caldo de carne em seres vivos, não estava presente.

Foi somente em meados do século XIX que o cientista francês Louis Pasteur refutou de vez a teoria da abiogênese (ideia de geração espontânea), com uma série de experimentos controlados.

Em 7 de abril de 1864, Louis Pasteur apresentou o resultado de muitos anos de pesquisas em uma conferência na Sorbonne (Universidade de Paris). Demonstrou a falsidade da teoria da geração espontânea. Com seu trabalho, Pasteur demonstrou que esses organismos nascem de germes já existentes.

O físico Jonh Tyndall realizou experimentos em que demonstrava que o ar poderia ficar isento de micro-organismos apenas por permitir que as partículas de poeira se sedimentassem no fundo de uma caixa fechada. Ele colocou tubos contendo líquido estéril dentro da caixa. O líquido manteve-se estéril, finalmente, provando que a “força vital” não era responsável pelo surgimento dos micro-organismos.

Os experimentos realizados por Tyndall e Pasteur foram aceitos pela comunidade científica, descartando a teoria da geração espontânea.

O cirurgião inglês, Joseph Lister, descobriu, em 1867, que poderia reduzir consideravelmente o número de micro-organismos em feridas e incisões, usando ataduras tratadas com ácido fénico (agora conhecido como fenol), um composto que matou micro-organismos. Durante a cirurgia, ele começou a prática de se pulverizar a

ferida com uma fina névoa de ácido fénico para matar micróbios. Essas práticas reduziu consideravelmente a taxa de infecção e mortalidade de pacientes de cirurgia, dando crédito à teoria do germe da doença (PELCZAR, CHAN, KRIEG, 1996).

Em 1876, Robert Koch apresentou prova definitiva da teoria dos germes, isolando a causa do antraz e mostrando ser uma bactéria. Daí veio o desenvolvimento dos postulados de Koch, um conjunto de regras para a atribuição de um micróbio como a causa de uma doença.

Em 1876, Robert Koch e Cohn identificaram uma bactéria, o *Bacillus anthracis*, como a causa do carbúnculo hemático e publicaram suas pesquisas.

Os anos seguintes foram repletos de novas descobertas e aplicações, como, por exemplo:

Em 1880, Pasteur descobriu que as bactérias podiam perder a capacidade de produzir doenças, se cultivadas por muito tempo.

Em 1882, Koch isolou o bacilo da tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*.

Em 1884, Koch apresenta seus postulados, ou normas que provam que um micro-organismo é a causa de uma doença. A aplicação dos postulados de Koch continuou a revelar a associação de várias doenças com os patógenos.

Em 1886, John Brown Buist foi a primeira pessoa a observar um vírus.

Em 1892, Dmitri Ivanowski publicou a primeira evidência da filtrabilidade de um agente patogênico, o vírus da doença do mosaico do tabaco.

Em 1899, Martinus Beijerinck reconhece a natureza singular de sua descoberta Ivanowski. Friedrich Loeffler¹ e Paul Frosch descobriram que a febre aftosa também era causada por um agente filtrável.

Em 1915, Frederick Twort e Felix d'Herelle descobriram o vírus bacteriano.

Em 1928, Alexander Fleming descobriu a penicilina.

A Microbiologia não ficou restrita à área médica, mas também foi utilizada em outras áreas, que receberam as seguintes denominações: Microbiologia do solo, Microbiologia da água, Microbiologia do ar, Microbiologia dos insetos, Microbiologia Industrial, Microbiologia dos alimentos, Microbiologia espacial.

Para aumentar a produtividade na atividade agrícola, necessita-se lançar mão de agrotóxicos, sejam para o controle de pragas, doenças, plantas daninhas ou para regular os processos fisiológicos das plantas. Neste caso, devem-se tomar os devidos cuidados, tanto para comprar, transportar, armazenar, como para aplicar esses produtos, visto que, quando mal manipulados, podem causar graves danos ao ambiente e ao ser humano.

Além dos riscos de contaminação, o alto custo dos agrotóxicos levou os pesquisadores a desenvolver outro método para controlar as pragas e doenças, ou seja, buscaram encontrar agentes biológicos (CRECCHI & STOTZKY, 1998). Em 1911, a espécie microbiológica *Bacillus thuringiensis* foi descoberta e passou a ser utilizada como inseticida na França, em 1938, e, nos Estados Unidos da América, na década de 1950.

O sucesso das pesquisas foi obtido com o auxílio do desenvolvimento tecnológico. O ultramicroscópio, inventado, em 1903, por Henry Siedentogf, a fotomicrografia de raios ultravioletas e o microscópio eletrônico são instrumentos importantes para o avanço de pesquisas na Microbiologia.

Embora o estudo da Microbiologia tenha avançando, ainda existem problemas na identificação de bactérias. A grande dificuldade na identificação de agentes causadores dos processos infecciosos está relacionada ao tempo necessário para se obter um resultado preciso. Mesmo com equipamentos de ponta, o período necessário para se gerar um diagnóstico é, muitas vezes, ineficiente para salvar vidas.

O gênero *Mycobacterium*, único da família Mycobacteriaceae, é constituído por espécies do complexo *M. tuberculosis*, *Mycobacterium leprae* e outras denominadas de MNT (COLLINS *et al*, 1997; BROSCH *et al*, 2002).

As MNT encontram-se dispersas na natureza e ao contrário das espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, apresentam patogenicidade variável. A capacidade das MNT em produzir doença está claramente documentada na literatura e sua importância vem aumentando progressivamente, com isolamentos de diferentes espécies nos laboratórios de micobactérias (FALKINHAM, 1996, TORTOLI, 2003).

O diagnóstico de doenças causadas por MNT exige muita cautela, pois seu isolamento de espécimes clínicos não estéreis do organismo pode significar colonização transitória ou contaminação. Por isso, a correlação clínico-laboratorial é de fundamental importância para o estabelecimento do diagnóstico de doença por MNT e para determinação da estratégia terapêutica (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 1997).

CAPÍTULO II

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

II.1 – O nêutron

No início da década de 30, ocorreram diversas investigações sobre a natureza da radiação penetrante, oriunda do impacto de partículas alfas do polônio sobre núcleos de berílio. Os pesquisadores Walther Wilhelm Georg Bothe e Herbert Becker, na Alemanha, e o casal Pierre e Marie Curie, em Paris, pensavam que se tratavam de raios gama com altas energias. Entretanto, em 1932, James Chadwick comprovou experimentalmente que esta radiação era uma partícula de carga neutra, o nêutron (HUGHES, 1959).

II.1.1 Propriedades do nêutron.

O nêutron é uma partícula de massa ligeiramente maior que a do próton, isto é, 1,008982 u.m.a, e neutra, em relação à sua carga líquida; possui ainda spin $s = \frac{1}{2}$ e momento de dipolo magnético $\mu = -1,913 \mu_N$ (μ_N - magnéton nuclear). A meia-vida do nêutron livre é de 12,8 minutos, decaindo pela emissão de um próton (\mathbf{p}^+), de um nêutron (\mathbf{n}) e de um antineutrino ($\bar{\nu}$), ou seja (KAPLAN, 1978):



Além disso, o nêutron possui um comprimento de onda de De Broglie dado por:

$$\lambda = 0,286/(E)^{1/2} \quad (2.2)$$

II.1.2 – Energia dos nêutrons

Os nêutrons são classificados por sua energia cinética, de acordo com a faixa energética em que se encontram, conforme especificado na tabela II.1.

Tabela II.1 – Classificação dos nêutrons segundo sua energia cinética (ZAMBONI, 2007).

Classe	Subclasse	Energia (eV)	Observação
Lentos	Frios	$0 < E < 2 \times 10^{-3}$	Pode atingir a rede cristalina dos metais
	Térmicos	$0,01 < E < 0,5$	Distribuição maxwelliana
	Epitérmicos	$0,5 < E < 10^4$	
Ressonância		$10^0 < E < 10^2$	
Rápidos		$10^3 < E < 2 \times 10^7$	
Relativísticos		$E > 10^7$	

É possível reduzir-se a energia dos nêutrons, fazendo-os interagir com os núcleos de materiais que os espalham. Este processo é denominado moderação de nêutrons. A quantidade de energia perdida pelo nêutron por colisão é função da massa do núcleo que constitui o meio e do ângulo de espalhamento. O material que apresenta a propriedade de reduzir a velocidade dos nêutrons é denominado moderador. Nêutrons que atingem velocidades próximas àquelas do movimento térmico dos átomos ou moléculas do material moderador com quem interagem são chamados nêutrons térmicos (KAPLAN, 1978).

II.1.3 – Interação dos nêutrons com a matéria

O nêutron tem massa compatível com a do próton, mas não interage com a matéria por meio da força colombiana, que predomina nos processos de transferência de energia da radiação para a matéria. Por isso, é bastante penetrante e, ao contrário da radiação gama, as radiações secundárias são, frequentemente, núcleos de recuo, principalmente, para materiais hidrogenados. Além dos núcleos de recuo, existem os produtos de reações nucleares do tipo (n, α) , altamente ionizantes (TAUHATA *et al*, 2003). A energia do nêutron, assim como, a estrutura do núcleo com quem interage, interferem, tanto no mecanismo de interação, quanto na atenuação energética dele. Dessa forma, no estudo das reações nucleares é de fundamental importância o conceito de "secção de choque microscópica".

II.1.3.1 - Secção de choque microscópica e macroscópica

Em termos qualitativos, a secção de choque microscópica pode ser compreendida como a área efetiva do núcleo alvo sobre a qual, sendo atingida por um feixe neutrônico, deverá ocorrer uma reação nuclear, que resultará em produtos diversos. Quantitativamente, representa a probabilidade de ocorrência de certos produtos dessa reação. A secção de choque microscópica “ σ ” é comumente expressa na unidade "barn", sendo $1\text{barn}=10^{-24}\text{ cm}^2$ (LAMARSH, 1978). O nêutron poderá, então, ser absorvido ou espalhado pelo núcleo alvo e a probabilidade total de ocorrência será dada por:

$$\sigma_T = \sigma_S + \sigma_a \quad (2.3)$$

onde σ_T , σ_S e σ_a são as secções de choque total, de espalhamento e absorção, respectivamente.

O produto da seção de choque microscópica, σ , pelo número de núcleos atômicos idênticos, N , contidos num volume de $1,0\text{ cm}^3$ do material alvo, resulta na seção de choque macroscópica, Σ .

$$\Sigma = \sigma \cdot N \quad (2.4)$$

Analogamente, à seção de choque microscópica total, a seção de choque macroscópica total será dada por:

$$\Sigma_t = \Sigma_s + \Sigma_a \quad (2.5)$$

Fisicamente, interpreta-se Σ_t como a probabilidade, por unidade de percurso, de que algum tipo de interação ocorra, quando nêutrons, com velocidade v , interagem com os núcleos do material.

É importante ressaltar que, como os nêutrons apresentam interações do tipo nêutron-núcleo, os valores das seções de choque, associadas aos tipos de eventos ocorridos, são randômicos, não sendo correlacionados em função do número atômico, como ocorre as radiações eletromagnéticas, como mostra a figura II.1 que relaciona os

coeficientes de atenuação ao número atômico, para nêutrons térmicos e para raios X de diversas energias. Este comportamento aleatório dos nêutrons é o principal diferencial da Radiografia Neutronográfica (NR) em relação as demais radiografias (DOMANUS, 1992).

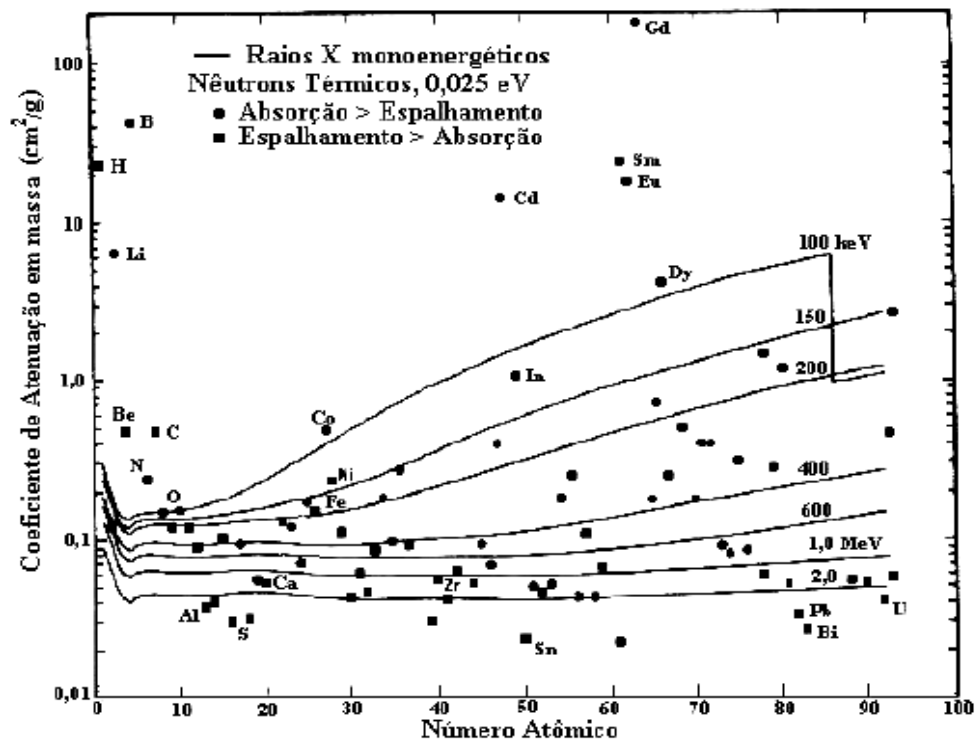


Figura II.1 – Coeficientes de atenuação de alguns elementos para nêutrons térmicos e raios X (DOMANUS, 1992).

II.1.3.2 – Tipos de interações dos nêutrons com a matéria

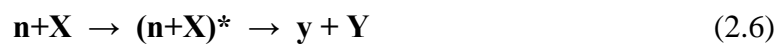
Em 1936, Niels Bohr propôs uma teoria para a explicação das reações nucleares, de acordo com a qual os processos da interação nêutron-núcleo somente se iniciam, quando a distância entre estas partículas for tal que as forças nucleares sejam efetivas. Durante o processo, é formado um núcleo composto por ambos, em estado excitado, denominado núcleo composto. A interação cessa logo que os produtos da reação se afastem o suficiente para que as forças nucleares não sejam mais efetivas. Dessa forma, uma reação nuclear ocorre fundamentalmente em duas etapas:

a) formação do "núcleo composto": nesta fase, o nêutron incidente perde sua identidade e se incorpora ao sistema. A energia de excitação introduzida pelo nêutron (cinética+ligação) é dividida entre os nucleons.

b) desintegração do núcleo composto nos produtos da reação: o núcleo composto permanece excitado até que um ou mais nucleons adquiram energia suficiente para serem emitidos. Caso esta energia seja insuficiente, ele emitirá radiação- γ . A desintegração do núcleo composto independe da maneira pela qual foi formado, sendo função exclusiva de suas características, tais como, energia de excitação e momento angular.

Em alguns casos, o núcleo produto formado também é instável e decairá até atingir a estabilidade.

Uma reação nuclear pode ser esquematizada da seguinte forma:



sendo:

n - nêutron incidente;

y - partícula ou radiação γ emergente;

X,Y - núcleos alvo e produto;

(n+X)* - núcleo composto excitado.

A interação nêutron-núcleo pode ocorrer por dois processos, conforme o diagrama ilustrado na figura II.2.

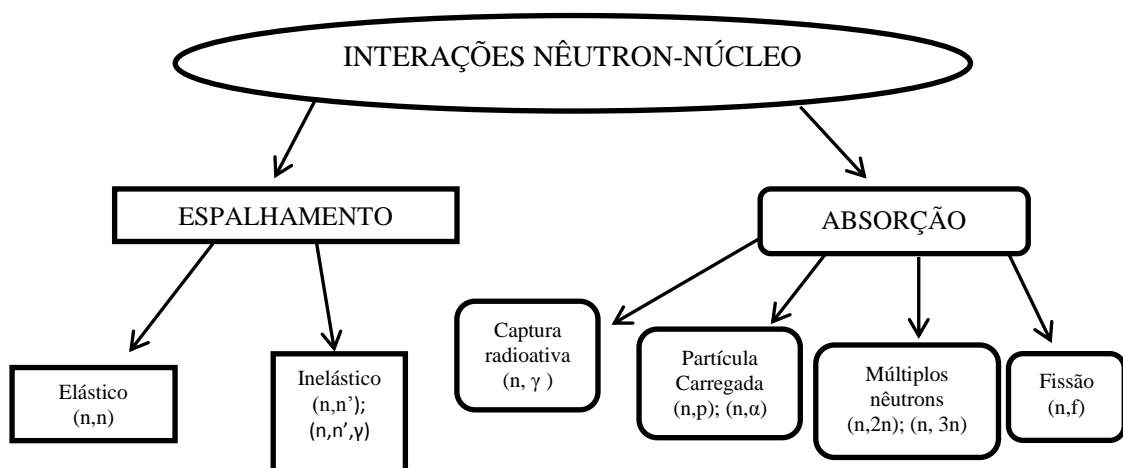


Figura II.2 - Diagrama ilustrativo das formas de interação nêutron-núcleo: espalhamento e absorção.

No processo de espalhamento, o núcleo composto excitado emite um nêutron, sendo o processo conhecido como espalhamento ressonante. Quando o nêutron é espalhado pelo núcleo, sua velocidade e direção mudam e o núcleo é deixado com o mesmo número de prótons e nêutrons que tinha antes da interação.

Caso o espalhamento seja resultante de um ricocheteamento do nêutron incidente na superfície do núcleo alvo, teremos o chamado espalhamento potencial e, neste caso, não há formação do núcleo composto.

Os eventos de espalhamento podem ser subdivididos em elástico e inelástico.

a) Espalhamento elástico (n,n): o núcleo atingido não tem sua estrutura alterada, ocorrendo apenas uma simples transferência de energia cinética e de momento linear. Um outro nêutron reaparece e o núcleo mantém seu estado fundamental. Este espalhamento é o principal responsável pela moderação dos nêutrons.

b) Espalhamento inelástico (n,n'); (n,n',γ): o núcleo composto emite um outro nêutron e retorna ao seu estado fundamental, geralmente, com emissão de raios gamas. Para que esse mecanismo ocorra, é necessário que o nêutron incidente possua uma energia cinética superior a um limiar, cujo valor depende também do núcleo com o qual ele irá interagir.

A soma das probabilidades de espalhamento elástico, σ_e , e inelástico, σ_{in} , resulta na probabilidade total de espalhamento, σ_S , (KAPLAN, 1978), como mostra a equação (2.7).

$$\sigma_S = \sigma_e + \sigma_{in} \quad (2.7)$$

Durante a *absorção*, o núcleo recua e passa a um estado excitado. Quando o núcleo retorna ao seu estado fundamental, emite partículas carregadas, preferencialmente, para nêutrons de alta energia (da ordem de MeV) e elemento alvo de baixo número atômico, e/ou emite radiação γ , para nêutrons de baixa energia (da ordem de meV).

a) Captura radioativa: ocorre para nêutrons incidentes com energias intermediárias. O núcleo composto, após passar pelo estado excitado, se estabiliza, emitindo uma ou mais partículas ou fótons, por reações do tipo: (n,p), ($n,2n$), (n,α) ou (n,γ).

b) Fissão nuclear: núcleos de um material fissionável, tal como ^{235}U , ao

absorverem nêutrons produz reação nuclear de fissão, resultando como produtos: dois fragmentos, 2 ou 3 nêutrons rápidos e decaimentos radioativos dos fragmentos de fissão, com a emissão de raios γ , neutrinos, nêgatrões, que totalizam uma considerável quantidade de energia, em média 200 MeV por fissão.

A probabilidade de absorção (σ_a) é a soma de todas as probabilidades de ocorrerem reações nucleares que envolvam a absorção de nêutrons.

$$\sigma_a = \sigma_{(n,\gamma)} + \sigma_{(n,p)} + \sigma_{(n,\alpha)} + \sigma_{(n,2n)} + \sigma_{(n,3n)} + \sigma_f \quad (2.8)$$

II.1.3.3 – Atenuação dos nêutrons

A atenuação dos nêutrons pela matéria, do ponto de vista macroscópico, representa a redução da intensidade do feixe neutrônico provindo de uma fonte, quando atravessa uma espessura x do material alvo. Sendo o coeficiente de atenuação, Σ_t , (seção de choque macroscópica total), a fração relativa de nêutrons removidos do feixe I/I_0 , revela um comportamento exponencial; para um feixe estreito colimado, com uma boa geometria, esta fração é dada por:

$$I/I_0 = e^{-\Sigma_t \cdot x} \quad (2.9)$$

onde, I e I_0 são as intensidades final e inicial do feixe neutrônico, respectivamente.

II.2 – Neutronografia - Conceitos básicos

Quando os nêutrons são empregados como radiação penetrante, para inspecionar amostras, não destrutivamente, uma técnica indicada para tal é a Neutronografia. Como o nêutron não ioniza o material constituinte da amostra é necessário o emprego de um conversor, cuja finalidade é transformar o nêutron numa radiação capaz de sensibilizar um sensor.

Três elementos compõem um sistema neutronográfico, a saber: a) uma fonte de nêutrons que produza um feixe apropriado; b) o corpo de prova ou amostra; c) um dispositivo contendo um conversor de nêutrons e um registrador da imagem.

A obtenção de uma radiografia com nêutrons é semelhante à da radiografia convencional com raios X ou raios γ . O corpo de prova a ser inspecionado é submetido a um feixe de nêutrons colimado e alinhado, cuja intensidade é modulada ao atravessá-lo; o feixe transmitido interage com o conversor, convertendo-se em radiação secundária que é registrada por um sensor: filme radiográfico, SSNTD, cintiladores. (HAWKESWORTH, 1977).

II.2.1 - Fontes de nêutrons

Para fins radiográficos, os feixes de nêutrons podem provir de aceleradores, fontes radioisotópicas ou de reatores nucleares (HAWKESWORTH, 1977; BERGER, 1965). A escolha da fonte de nêutrons, para uma determinada aplicação neutrongráfica, depende do fluxo e o espectro de energia dos nêutrons, da colimação do feixe, da resolução da imagem que se deseja obter e do tempo de exposição da amostra ao feixe neutrônico (CRISPIM, 1993). Tendo em vista a escolha do feixe neutrônico provindo de um reator nuclear, para a realização dos ensaios das amostras em apreço, destacar-se-á o emprego dessa fonte para se obter suas respectivas Neutronografias.

II.2.1.1 – Reatores

Um reator nuclear de fissão é uma das fontes mais utilizadas na obtenção de feixes de nêutrons com intensidade suficientemente alta para gerar Neutronografias de qualidade, em menor tempo de exposição. Um reator nuclear, em geral, pode fornecer feixes de 10 a 100 vezes mais intensos que os gerados por aceleradores e fontes radioisotópicas (DOMANUS, 1992). Entretanto, apresentam desvantagens, tais como: não-portabilidade, alto investimento inicial e contaminação de radiação γ inerente ao feixe de nêutrons. Num reator nuclear de pesquisa típico, seu núcleo contém material altamente físsil, tal como urânio-235, que enriquece o combustível nuclear. O núcleo é envolvido por um meio moderador, sendo ambos contidos por uma blindagem de espessura adequada. A fissão é produzida, sobretudo, quando nêutrons com energias térmicas atingem os núcleos dos átomos de urânio-235, gerando além dos fragmentos da fissão, a emissão de partículas carregadas, raios- γ e mais dois ou três nêutrons rápidos. Novas fissões podem ser inicializadas por esses nêutrons emitidos com energias em torno de 2 MeV. Ao serem moderados por colisões elásticas e inelásticas, atingem o

equilíbrio térmico, em energias cinéticas médias da ordem de 25 meV, que correspondem à temperatura de aproximadamente 30°C no meio moderador, quando o processo de fissão é mais provável de ocorrer.

Para regular as reações de fissão nuclear, são inseridas barras de controle no núcleo do reator para absorverem nêutrons. As potências nominais geradas em reatores nucleares de pesquisa variam de 250 kW a 50 MW, fornecendo, nessas condições, fluxos de nêutrons rápidos entre 10^{12} e 10^{15} n/cm².s, junto aos núcleos. Os nêutrons, após serem moderados, são extraídos por canais de irradiação, até a borda externa da blindagem, que garante a proteção radiológica, de acordo com as Normas específicas internacionais e nacionais. Nesses canais de irradiação são instalados colimadores que podem ter configurações geométricas diversas (tubos cilíndricos, troncos de cone, troncos de pirâmide), cuja utilização dependerá do tipo de experimento visado (MENEZES, 1994).

II.2.2 – Fatores que podem influenciar a Neutronografia

Para aquisição uma imagem neutronográfica de qualidade, alguns fatores devem ser considerados:

a) Moderação dos Nêutrons

Já que fontes (item II.2.1) produzem nêutrons rápidos, dependendo do conversor de radiação empregados, devem ser termalizados para serem usados para gerar imagens neutronográficas. O processo de termalização ocorre por meio de colisões com os núcleos do material moderador de baixo número atômico, Z (hidrogênio e carbono, por exemplo).

Os nêutrons são térmicos quando atingem o equilíbrio térmico com os átomos e moléculas do meio, tendo velocidades que seguem uma distribuição maxwelliana, cuja energia mais provável ocorre em torno de 25 meV (LAMARSH, 1978).

b) Colimação do feixe neutrônico

Tanto a emissão dos nêutrons pelas fontes, quanto a difusão no moderador, ocorrem de maneira aleatória. Para se extrair o feixe neutrônico a ser usado numa

Neutronografia, instala-se, no interior dos canais de irradiação, tubos colimadores, que conduzirão os nêutrons até o plano de irradiação.

As paredes dos tubos colimadores devem ser revestidas com materiais de alta secção de choque de absorção de nêutrons térmicos, de modo a alinhar o feixe neutrônico e reduzir a divergência angular. A radiação secundária decorrente dessa absorção também deve ser retida nas paredes, de forma a minimizar a probabilidade dela ser registrada pelo sensor radiográfico.

Um colimador é caracterizado por sua divergência angular e razão de colimação. A razão de colimação, L/D , é definida pela razão entre a distância da fonte ao detector, L , e o diâmetro ou a largura de abertura na entrada do colimador, D . A divergência angular do feixe de nêutrons resulta numa distorção (penumbra) na imagem registrada, cuja indefinição de borda do objeto neutronografado é representada pela resolução geométrica, U_G , de acordo com a equação (2.10):

$$U_G = L/D \quad (2.10)$$

Para se assegurar feixes com pequena divergência, a razão L/D deve ter valores elevados, dentro do intervalo $100 < L/D < 500$ (DOMANUS, 1992).

O fluxo de nêutrons na saída de um colimador do tipo paralelo é definido pela equação (2.11):

$$\Phi = \Phi_0 \cdot A / 4 \cdot \pi \cdot L^2 \quad (2.11)$$

onde:

Φ é o fluxo de nêutrons na saída do colimados;

Φ_0 é o fluxo de nêutrons na entrada do colimador;

A é a área da base ou abertura do colimador;

L é o comprimento do colimador.

Caso a abertura seja circular, a equação 2.11 pode ser reescrita como:

$$\Phi = \Phi_0 \cdot D^2 / 16 \cdot L^2 \quad (2.12)$$

c) Filtragem da radiação γ

Inerente ao feixe neutrônico, um feixe de raios γ , oriundo das reações primárias de produção de nêutrons ou das reações secundárias ocorridas nos materiais estruturais do arranjo, gera uma contribuição indesejável (ruído) nas imagens neutrongráficas. Como alguns sistemas de imageamento são sensíveis aos raios γ , a presença deles, portanto, reduz a qualidade da neutrongrafia, ou seja, uma gamagrafia de fundo a sobreporá. Para contornar o problema, são utilizados filtros, de forma a reduzir a intensidade do feixe de radiação γ , mas, ao mesmo tempo, não atenuar significativamente a intensidade do feixe neutrônico. Os materiais mais recomendados são o chumbo e o bismuto, que possuem alto coeficiente mássico de absorção para raios γ e baixa seção de choque de absorção e de espalhamento de nêutrons térmicos. Para evitar a sobreposição da gamagrafia à NR, a razão n/γ recomendada, entre o fluxo de nêutrons, em $n/\text{cm}^2.\text{s}$, e a taxa de exposição devido a radiação γ , em mR/s , sobre a amostra é $n/\gamma > 5,0.10^5 n/\text{cm}^2.\text{mR}$ (BERGER, 1965).

d) Blindagem para nêutrons e radiação γ .

Visando atender aos requisitos das Normas específicas de proteção radiológica (CNEN, 2011), são utilizadas blindagens compostas por materiais moderadores e absorvedores de nêutrons térmicos, acoplados a materiais com alto coeficiente de atenuação para raios γ . A parafina borada é muito utilizada para blindar nêutrons, enquanto que o chumbo é excelente bloqueador de radiação γ .

II.2.3 – Sistema de detecção da imagem neutrongráfica

Diferentemente da radiografia com raios X, os nêutrons praticamente não sensibilizam um filme radiográfico. Sendo assim, para que o feixe de nêutrons seja empregado, é necessário se utilizar uma tela conversora para transformá-los em radiação secundária (partículas β , α , elétrons de conversão interna ou raios γ) capaz de fazê-lo. Os materiais conversores devem possuir uma alta seção de choque de absorção para nêutrons, de forma que, da interação do nêutron com o material conversor, seja emitida uma radiação ionizante secundária capaz de ionizar os átomos que constituem o filme radiográfico. Gadolínio, lítio, boro e cádmio são materiais conversores que emitem

prontamente essa radiação secundária, após absorverem nêutrons térmicos, sendo denominados materiais de pronta emissão. Já o ouro, índio, disprósio e o ródio tornam-se radioativos, quando interagem com os nêutrons térmicos, sendo chamados de potencialmente radioativos. Durante um intervalo de tempo correspondente a três meias-vidas esses conversores deverão ser irradiados, para, em seguida, serem deixados intimamente acoplados ao filme, dentro de um chassi radiográfico, por mais três meias-vidas. Embora o processo seja mais lento, são indicados quando a razão n/γ é baixa. Na tabela II.2, encontram-se listados os conversores de nêutrons mais utilizados e alguns de seus dados nucleares.

Tabela II.2 – Propriedades nucleares de conversores de nêutrons e *screens* intensificadores (DOMANUS, 1992).

Elemento	Método de exposição	Seção de choque de absorção para nêutrons térmicos (barns)	Reação nuclear predominante	Meia-vida	Energia da radiação ionizante
Lítio	direto	945	(n, α)		α – 2,05 MeV
Boro	direto	3837	(n, α)		α – 1,47 MeV
Índio	indireto	191	(n, γ)	54 min	β^- - 1,00 MeV
Gadolínio	direto	46000	(n, γ)		β^- - 70 keV
Disprósio	indireto	950	(n, α)	2,3 h	β^- - 1,28 MeV

II.2.4 – Métodos para a conversão do nêutron em radiação ionizante

Em função do tipo de conversor escolhido, ou seja, do modo como a conversão do nêutron em radiação ionizante se dá, dois métodos podem ser adotados.

a) Método da exposição direta ou método direto de exposição

As telas conversoras usadas no método direto são feitas de materiais de pronta emissão, o que possibilita irradiação simultânea da amostra e tela conversora acoplada ao filme radiográfico, acondicionado num chassi (figura II.3). Neste caso, podem-se utilizar telas metálicas ou cintiladoras e a Neutronografia é obtida em duas etapas consecutivas: irradiação e revelação.

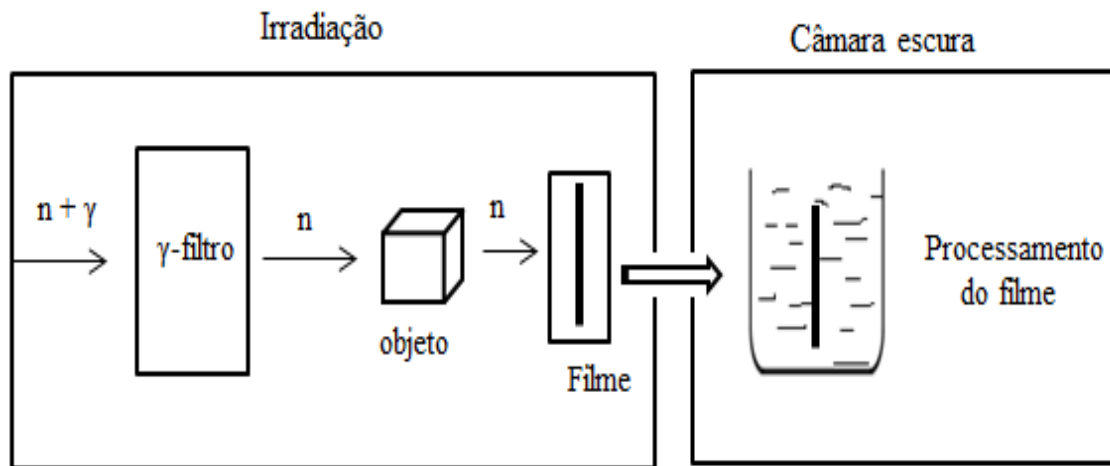


Figura II.3 – Esquema do método de exposição direta utilizando filme radiográfico.

Uma das telas metálicas conversoras mais utilizadas no método direto é a de gadolínio, que possui elevada secção de choque microscópica de absorção de nêutrons térmicos ($\sigma_{\text{abs}} = 46.000$ barns). Outros materiais comumente utilizados na confecção de telas metálicas são: cádmio, prata, samário. Quando se empregam telas cintiladoras, que contêm uma mistura de ${}^6_3\text{Li}$ e ZnS, ocorre a emissão de uma partícula α , produto da reação ${}^6\text{Li}(n, \alpha)$, que, ao ser absorvida pelo sulfeto de zinco, libera um fóton de luz (HARDT & ROETTGER, 1981).

A inviabilidade da utilização das telas metálicas ou cintiladoras ocorre, quando a Neutronografia é realizada em locais com elevada dose de radiação γ , uma vez que os filmes radiográficos empregados são sensíveis a esta radiação e, conseqüentemente, a análise da imagem fica prejudicada. Para contornar tal problema, o uso dos detectores de traços nucleares de estado sólido, associados a telas conversoras à base de ${}^{10}\text{B}$ e ${}^7\text{Li}$, é recomendado. Os SSNTD são insensíveis às radiações β , γ e fótons de luz visível.

b) Método da exposição indireto ou por transferência

Neste método, a tela conversora é exposta ao feixe de nêutrons, que registra uma imagem latente, resultante da modulação do feixe pela amostra. Em seguida, a tela é colocada em contato íntimo com o filme, em chassi radiográfico, dentro de uma câmara escura, durante um intervalo de tempo necessário ao decaimento radioativo do conversor (figura II.4). As radiações secundárias passam as informações armazenadas pela tela conversora para o filme, ao ionizá-lo.

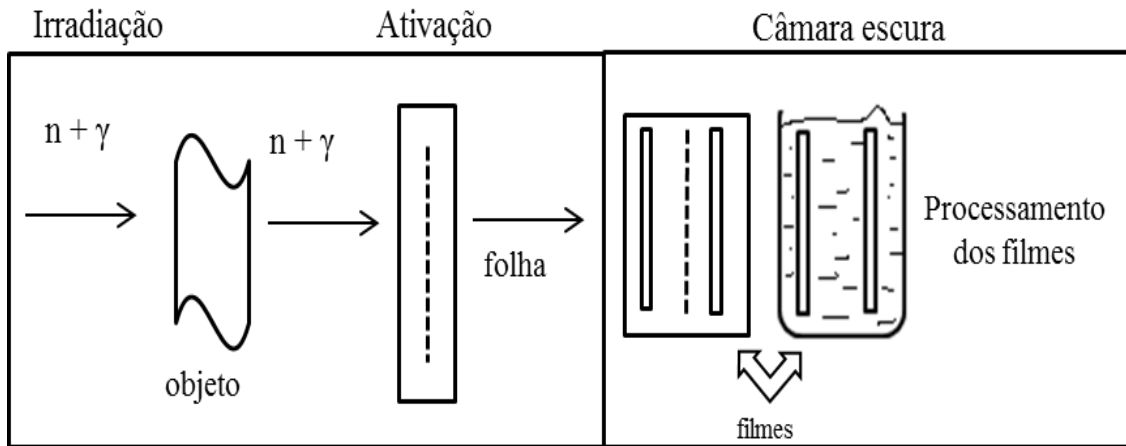


Figura II.4 – Esquema do método da exposição indireta ou por transferência.

As telas conversoras apropriadas para este método são aquelas cujo decaimento radioativo possui meia-vida que possibilite tempos de exposição e de transferência da imagem, os mais curtos possíveis. Uma das telas mais empregadas é a de disprósio, com secção de choque microscópica de absorção de nêutrons térmicos, σ_a , de 950 barns, onde o decaimento β é o principal responsável pela formação da imagem, sendo a meia-vida de 2,3 horas (HARDT & ROETTGER, 1981). Normalmente, a obtenção de uma Neutronografia, pelo método de exposição indireta, exige um tempo total de seis meias-vidas, o que o coloca em desvantagem perante o método de exposição direta.

II.2.5 – Resolução radiográfica total

A resolução intrínseca de uma imagem radiográfica é função do alcance da radiação ionizante na tela conversora e, conseqüentemente, no filme radiográfico. A resolução intrínseca, U_i , associada à geométrica, U_g , mencionada no item II.3.3, compõem a resolução total, U_t , dada pela equação:

$$(U_t)^n = (U_i)^n + (U_g)^n \quad (2.13)$$

onde o expoente "n" depende dos valores relativos de U_i e U_g , podendo variar entre 1 e 3 (HARMS & ZELLINGER, 1977; HARMS *et al* 1973).

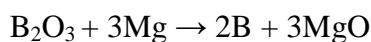
II.2.6 – A importância do boro como conversor de nêutrons

Como o elemento químico boro será utilizado como conversor de nêutrons para a caracterização morfológica das MNT, seguem informações sobre ele.

Boro, do árabe "buraq" e do persa "burah", recebeu esse nome devido a um dos seus sais, bórax ou tetraborato de sódio, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$. A descoberta do boro, em 1808, é atribuída a Joseph-Louis Gay-Lussac e a Louis Jacques Thénard. No entanto, na mesma época, Humphry Davy parece ter obtido boro, por eletrólise do ácido bórico, e, pouco depois, obteve o boro, usando o mesmo método empregado por Gay-Lussac e Thénard, ou seja, por aquecimento do potássio com fluoreto de boro (produzido por aquecimento do fluorspar com trióxido de boro, B_2O_3 , em um tubo de ferro). Porém, nenhuma dessas descobertas levou à classificação do boro como elemento químico. Berzelius, em 1824, ao discutir e avaliar o trabalho de Davy, Gay-Lussac e Thénard, identificou e classificou o boro como um elemento químico. Em 1879, o pesquisador Herbert C. Brown recebeu o prêmio Nobel de química, por seus estudos sobre os elementos presentes nos compostos orgânicos que continham boro (PEIXOTO, 1996).

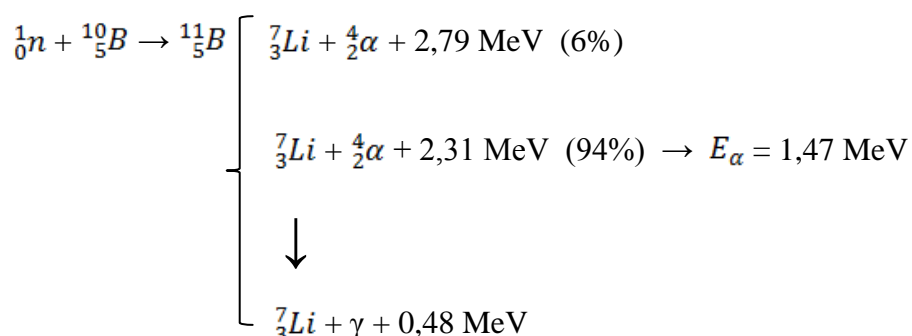
Na tabela periódica, o boro (B) pertence ao grupo 3A. Suas propriedades estão entre as dos metais e não metais. Quimicamente é mais semelhante ao silício do que ao alumínio, gálio, índio e tálio, elementos pertencentes ao seu grupo (QUAGLIANO e VALLARINO, 1969). Ele é um semicondutor, isto é, quando submetidos a uma alta temperatura, ele conduz eletricidade como um metal, mas é quase um isolante a baixa temperatura (PEIXOTO, 1996).

Como é difícil obter boro puro, fontes distintas são utilizadas para este fim. As fontes mais comuns de boro são a turmalina, bórax [$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_5(\text{OH})_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$] e kernite [$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_5(\text{OH})_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$]. Ele pode ser produzido, através da redução do óxido de magnésio, B_2O_3 , como segue (MARASHI, 2000):



Existem dois isótopos estáveis do boro, ^{11}B e o ^{10}B , cujas seções de choque de absorção para nêutrons térmicos (energia de 25 meV) são, respectivamente, iguais a 0,005 e 3837 barns. Comparando os valores, nota-se que o ^{10}B é mais eficiente na conversão de nêutrons térmicos. Numa reação de nêutrons térmicos com núcleos de ^{10}B ,

partículas α são emitidas e sensibilizam o filme radiográfico, formando uma imagem latente. Sendo assim, as reações nucleares possíveis de ocorrer são (MARASHI, 2000):



II.2.7 – Registradores e processo de revelação de imagens neutrongráficas

Dentre os dispositivos usados para registro de imagens neutrongráficas destacam-se: os filmes fotográficos, os sensores eletrônicos e os detectores sólidos de traços nucleares (Solid-State Nuclear Track Detector – SSNTD). De um modo geral, os SSNTD têm alta sensibilidade às partículas α , prótons e fragmentos de fissão (MENEZES, 1994). Dentre os SSNTD, o CR-39 apresenta vantagens em relação aos demais detectores, tais como: a insensibilidade à radiação eletromagnética, menor efeito de desvanecimento de traços latentes e maior estabilidade química (BENTON *et al*, 1978).

Quando uma partícula carregada incide sobre uma placa de CR-39, ela perde sua energia, devido as interações coulombianas com os átomos do material, provocando um desarranjo na sua estrutura molecular e originando danos, denominados traços latentes. O tamanho desses traços varia de acordo com a massa, carga e energia da partícula incidente.

Os traços latentes podem ter diâmetros de 30 Å a 100 Å e, após um ataque químico conveniente, tornam-se observáveis ao microscópio óptico, porque seus diâmetros se ampliam cerca de 1000 vezes (BENTON, 1969). O conjunto bidimensional dos traços ampliados é capaz de formar uma imagem visível a olho nu; para que um traço latente seja ampliado, é necessário que haja em seu interior uma densidade mínima de danos, cujo valor está relacionado diretamente à ionização específica da radiação que os provocou, estabelecendo-se assim, para cada radiação, um limiar energético para a

formação de um traço revelável. A revelação dos traços, sob o ponto de vista microscópico, é realizada ao longo e ao redor da trajetória da partícula (figura II.5).

Certos reagentes químicos (hidróxidos de sódio e de potássio), que atuam como reveladores, degradam e retiram porções, simultaneamente, das regiões danificadas e não danificadas do CR-39. Entretanto, o ataque químico corrói mais rapidamente as regiões onde o material foi danificado, iniciando, assim, o processo de revelação.

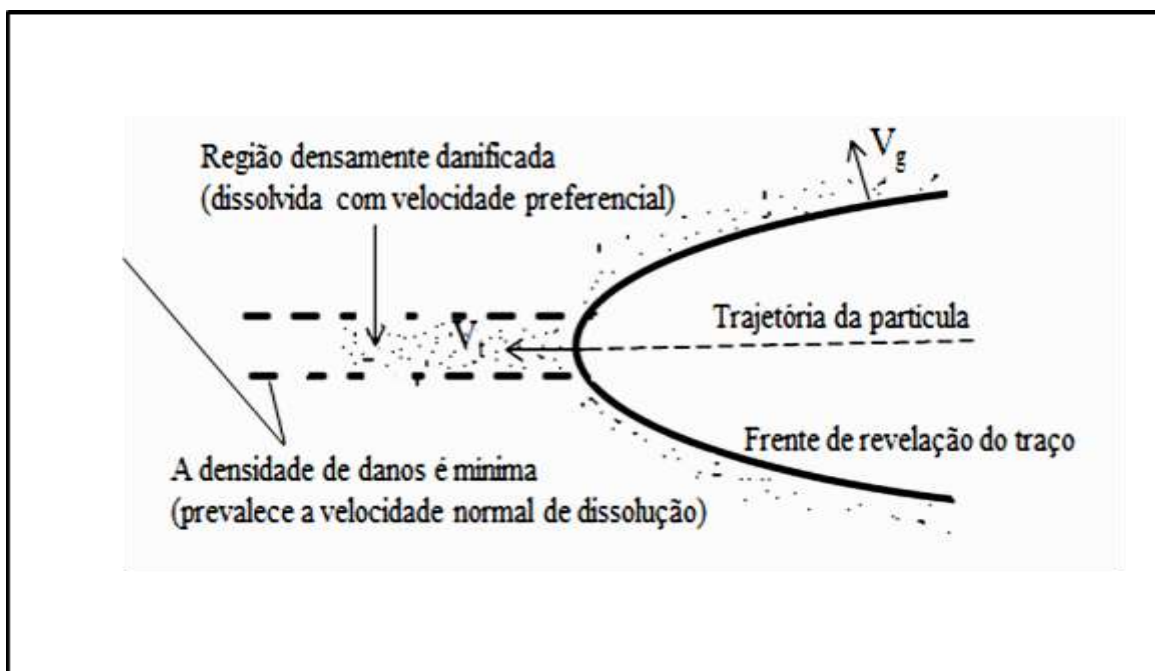
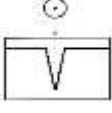
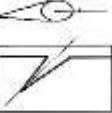
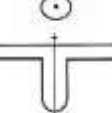
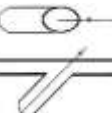


Figura II.5 – Esquema do perfil microscópico do traço de uma partícula carregada no detector (Figura adaptada do livro de ENGE, 1980).

A velocidade de ataque químico, V_t , na região ao longo do traço latente, depende das condições de ataque e das características da partícula incidente, enquanto que, na superfície do detector e nas paredes internas dos traços, a velocidade de degradação, V_g , é função do material do detector e das condições de revelação. Os valores de V_t e V_g , além do ângulo de incidência, interferem diretamente na geometria dos traços, como se pode observar na tabela II.3.

Tabela II.3 - Dependência entre a geometria dos traços, o ângulo de incidência da partícula e a relação entre V_t e V_g (ENGE, 1980).

Geometria do traço	Forma vista através do microscópio	Imagem do traço	Relação entre V_t e V_g	Ângulo de incidência
Cônica	Circular		$V_t > V_g$	Normal
	Elíptica		$V_t > V_g$	Oblíquo
Cilíndrica	Circular		$V_t \gg V_g$	Normal
	Elíptica		$V_t \gg V_g$	Oblíquo

II.2.8 – O ângulo crítico de revelação do traço

O ângulo crítico de revelação (ângulo característico do detector), ϕ_c , limita a capacidade do reagente químico em revelar os traços nucleares latentes (PRICE, 1958). O valor do ângulo crítico é dado pela equação (2.14):

$$\phi_c = \arcsen(V_g / V_t) \quad (2.14)$$

Quando uma partícula incide obliquamente, em relação à superfície do detector, sob um ângulo ϕ , menor ou igual ao ângulo crítico de revelação, ϕ_c , os traços latentes por ela formados não são revelados. Quando a velocidade de remoção da superfície (V_g) é maior que a componente normal à superfície ($V_t \cdot \sin\phi$), o material é retirado tão rapidamente que o ataque preferencial, ao longo da trajetória da partícula, passa a ser desprezível e, conseqüentemente, o traço é eliminado. A figura II.6, representa o perfil dos traços para vários ângulos de incidência, em relação ao ângulo crítico.

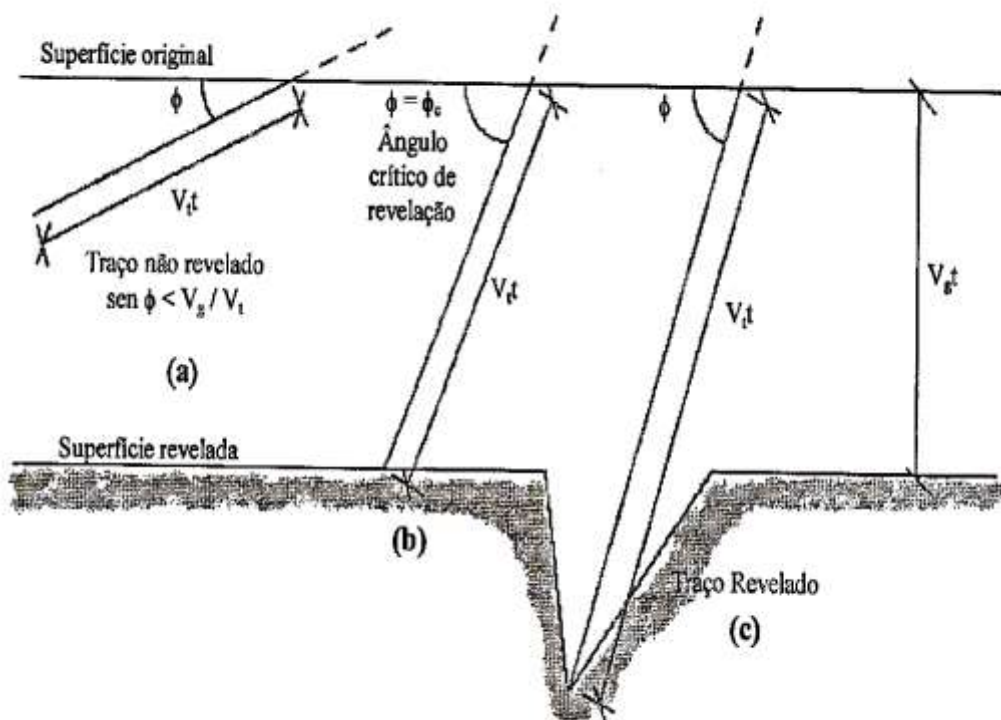


Figura II.6 – Influência do ângulo de incidência na revelação de um traço nuclear: a) se $\phi < \phi_c : V_g > V_t \cdot \sin \phi$, o traço não é revelado; b) se $\phi = \phi_c : V_g = V_t \cdot \sin \phi$, o traço não é revelado; c) se $\phi > \phi_c : V_g < V_t \cdot \sin \phi$; o traço é revelado (PRICE, 1958).

II.3 – Fundamentos de Microbiologia

Microbiologia é a ciência que estuda os micro-organismos (um grande e diversificado grupo de organismos microscópicos), que podem ser encontrados como células únicas ou em agrupamentos celulares. Os micro-organismos são, em geral, capazes de realizar seus processos vitais de crescimento, geração de energia e reprodução, sem depender de outras células, sejam essas do mesmo tipo ou de tipos diferentes (MADIGAN *et al*, 2004). Essa ciência pode abordar duas grandes áreas: microbiologia básica (estuda a natureza fundamental e a fisiologia dos micro-organismos) e a microbiologia aplicada (através dos estudos da microbiologia básica controla e usa os micro-organismos de maneira benéfica).

R. H. Wittaker, em 1969, classificou os micro-organismos como: Reino Fungi, Reino Protista (microalgas e protozoários) e Reino Monera (bactérias e algas azul-verdes). Estudando as similaridades e diferenças do RNA ribossômico, C. Woese

propôs, em 1979, uma nova classificação para os seres vivos: supra-reino Arquibactéria (incluindo bactérias metanogênicas, termófilas, acidófilas e holófilas); supra-reino Eubactéria, incluindo plantas, animais, fungos, protozoários e algas (TRABULSI e ALTERTHUM, 2004).

Como o objetivo do trabalho é fornecer uma nova metodologia para auxiliar na caracterização de micobactérias, uma descrição relativa aos fundamentos teóricos será dada, partindo da classificação das micobactérias até se atingir as formas de diagnósticos.

II.4 - Micobactérias

De 1873 até o presente, técnicas, que incluem a taxonomia numérica, métodos radiométricos associados à hibridização de sondas de DNA, perfis de ácidos micólicos, seqüenciamento de DNA e testes baseados na PCR, permitiram a identificação de 152 espécies e subespécies no gênero *Mycobacterium*. As primeiras espécies descobertas foram aquelas que mais afetaram e ainda afetam a saúde do homem: o bacilo de Hansen (1873), denominado de *Mycobacterium leprae*, e o bacilo de Koch (1882) designado como *Mycobacterium tuberculosis*. No gênero, também foram incluídas as micobactérias descritas por Bloom, em 1884, vinculadas à colonização transitória ou contaminação das amostras clínicas. A maioria das micobactérias tem sido isolada de diversas fontes ambientais (águas, solos, poeiras e materiais vegetais e/ou de animais). Algumas são encontradas na própria microbiota epidérmica dos tratos respiratório e gástrico-intestinal dos seres humanos. Tal fato fez com que Ruiz Manzano e colaboradores (1998), as denominassem como Micobactérias Ambientais (MA).

O gênero *Mycobacterium* é formado por organismos unicelulares, procariontes (sem envoltório nuclear isolando os cromossomos), se caracterizam como bacilos retos ou ligeiramente curvos, aeróbico estrito, apesar de algumas espécies possam crescer em atmosfera com reduzido O₂, imóveis, e não esporulados. Medem aproximadamente de 1 a 10 µm de comprimento e 0,2 a 0,6 µm de largura e isento de encapsulamento. A morfologia colonial varia conforme a espécie, variando de lisa a rugosa e de não pigmentada a pigmentada. Esse pigmento pode ser amarelo, laranja ou, raramente, róseo, normalmente devido aos pigmentos carotenóides (KUBICA e WAYNE, 1984).

Este gênero apresenta uma distintiva propriedade tintorial, a acidoresistência. Essa propriedade deve-se à presença de componentes lipídicos de superfícies

singulares, os ácidos micólicos. Tais ácidos são encontrados apenas no gênero *Mycobacterium*.

Outra importante característica é que as micobactérias crescem mais lentamente que a maioria das bactérias patogênicas em humanos, devido a sua superfície celular hidrofóbica. Esta hidrofobicidade faz com que os micro-organismos se agrupem e assim os nutrientes não são facilmente acessíveis a célula. O crescimento é lento, com colônias tornando-se visíveis de 2 a 60 dias, em temperatura ótima (FORBES *et al* 1998).

II.4.1 - Esquema taxonômico

As micobactérias pertencem a ordem *Actinomycetales* e a família *Mycobacteriaceae*, que possui um único gênero, denominado *Mycobacterium* (*fungus bacterium*), nome proposto por Lehmann e Neumann, em 1896, em referência à película formada pelo *Mycobacterium tuberculosis* na superfície de meios líquidos, que era similar a produzida por alguns fungos.

Em 1994, foi publicada, nos Estados Unidos, a 9ª edição do *Manual Bergey's of Bacteriology Determinative* com o esquema de classificação para os procariotos, baseado na composição da parede celular, morfologia, coloração diferencial, testes bioquímicos e outros, porém, não se atendo às relações evolutivas. Para o gênero *Mycobacterium*, o esquema taxonômico é o que se segue (BRENNER *et al.*, 2005):

Domínio → *Archea*

Filo → *Actinobacteria*

Classe → *Actinobacteria*

Ordem → *Actinomycetales*

Subordem → *Corynebacterineae*

Família → *Mycobacteriaceae*

Gênero → *Mycobacterium*

Espécie → (Ex.: *M. marinum*)

Considerando as diferenças na epidemiologia e associação com doenças, as micobactérias podem ser divididas em dois grandes grupos, sendo eles: complexo MT e

MNT. Outros nomes são usados para designar MNT, como: anônimas, atípicas, não classificadas, desconhecidas, tuberculóides, ambientais, oportunistas, micobactérias outras que o bacilo tubérculo (MOTT) (FORBES *et al*, 1998).

Como afirmado, indiretamente, acima, o *M. leprae* é uma micobactéria não tuberculosa, entretanto, para alguns pesquisadores, o termo micobactérias não tuberculosas se refere às micobactérias, exceto às do complexo *M. tuberculosis* e *M. leprae* (ALBAN, 2006).

II.4.2 – Estrutura celular

As micobactérias são células procarióticas, portanto, não apresentam membrana nuclear nem nucléolo e, como toda célula, possui membrana plasmática, parede celular e citoplasma.

Membrana plasmática ou citoplasmática

É uma película finíssima constituída basicamente por fosfolipídios e proteínas. A membrana plasmática é de fundamental importância para a vida, uma vez que contém e delimita o espaço interno da célula, isolando-a do ambiente ao redor. Esse isolamento, porém, não é absoluto, pois, para viver, a célula precisa permitir a entrada de certas substâncias úteis – água, gás oxigênio, alimento – e a saída de outras, principalmente, gás carbônico e substâncias tóxicas geradas no metabolismo celular (AMABIS, 2009).

As moléculas de fosfolipídios se organizam em duas linhas paralelas, chamadas camada dupla de fosfolipídios. Cada molécula de fosfolipídios pode ser dividida em duas partes: uma porção polar (hidrofílica), composta de grupos fosfatos e glicerol, e uma porção apolar, formada por ácidos graxos. Eles formam uma dupla camada na membrana plasmática, sendo arranjados de modo que suas regiões apolares se situem entre as polares (DAFFÉ, 1999).

As proteínas se distribuem por toda a superfície da dupla camada, sendo que as proteínas, denominadas periféricas, são encontradas na superfície interna ou externa da membrana, enquanto que, algumas proteínas, chamadas integrais, provavelmente, se estendem por toda a dupla camada da membrana citoplasmática e algumas delas

possuem canais que permitem o transporte de moléculas específicas e de íons para o interior e exterior da célula (DAFFÉ, 1999; REZWAN *et al*, 2007).

A figura II.7 mostra o modelo de mosaico-fluído para a membrana citoplasmática, segundo o modelo mosaico fluido, proposto originalmente em 1972 pelos pesquisadores S. Jonathan Singer e Garth L. Nicholson. Além disso, encontra-se um esquema do fosfolipídio, da bicamada da membrana citoplasmática e uma representação das porções hidrofílicas e hidrofóbicas dos fosfolipídios.

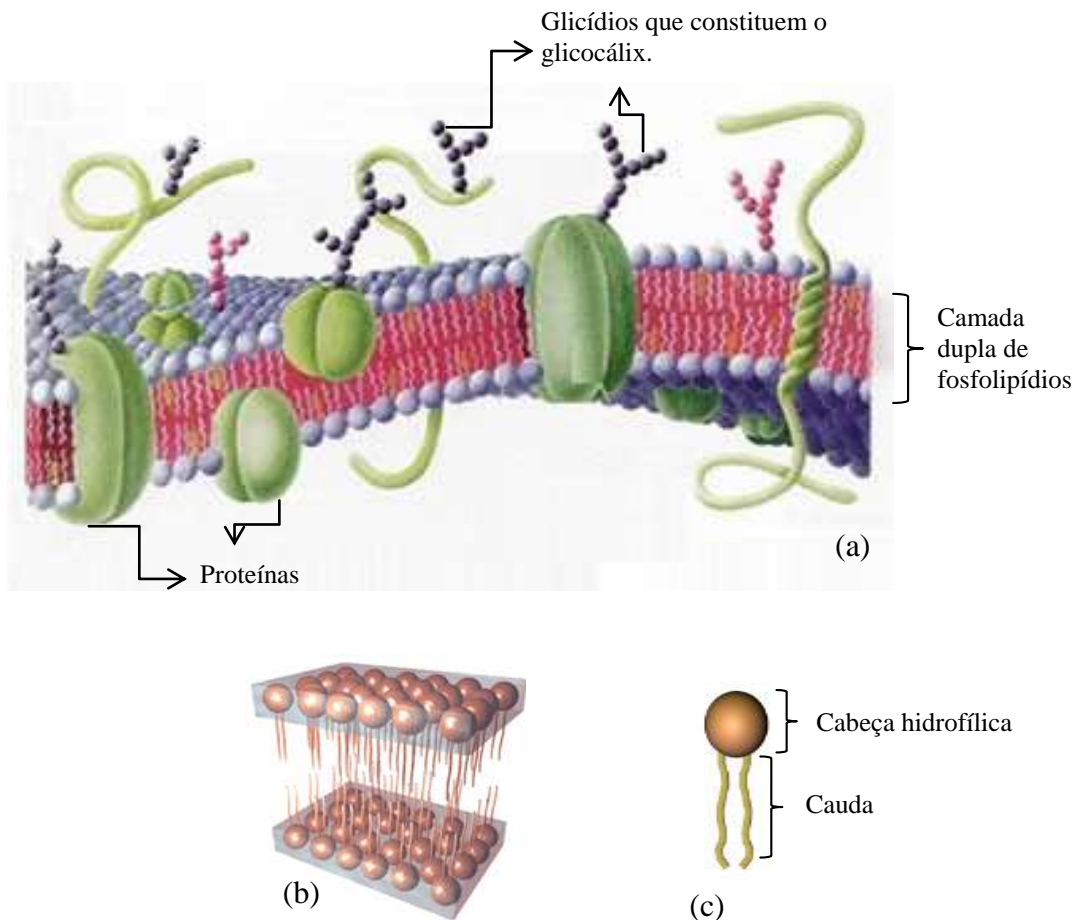


Figura II.7 - a) Representação esquemática da membrana plasmática. b) Representação dos fosfolipídios em bicamadas. c) As porções hidrofílicas ficam em contato com a água dos meios interno e externo celular, enquanto as hidrofóbicas situam-se internamente na membrana, afastadas da água. Disponível em:

a) <http://www.brasilecola.com/biologia/membrana-plasmatica.htm> Acesso: 06/2008.

b) <http://www.qmc.ufsc.br/qmcweb/artigos/lipidios/lipidios.html> Acesso: 06/2008.

c) <http://aeducadora.blogspot.com> Acesso: 08/2008.

Parede celular

As micobactérias produzem uma parede celular de estrutura extremamente singular, na qual o peptideoglicano contém ácido N-glicolilmurâmico, em vez de ácido N-acetilmurâmico, encontrado na maioria de outras bactérias.

A figura II.8 apresenta um esquema da parede celular das micobactérias e seus principais constituintes.

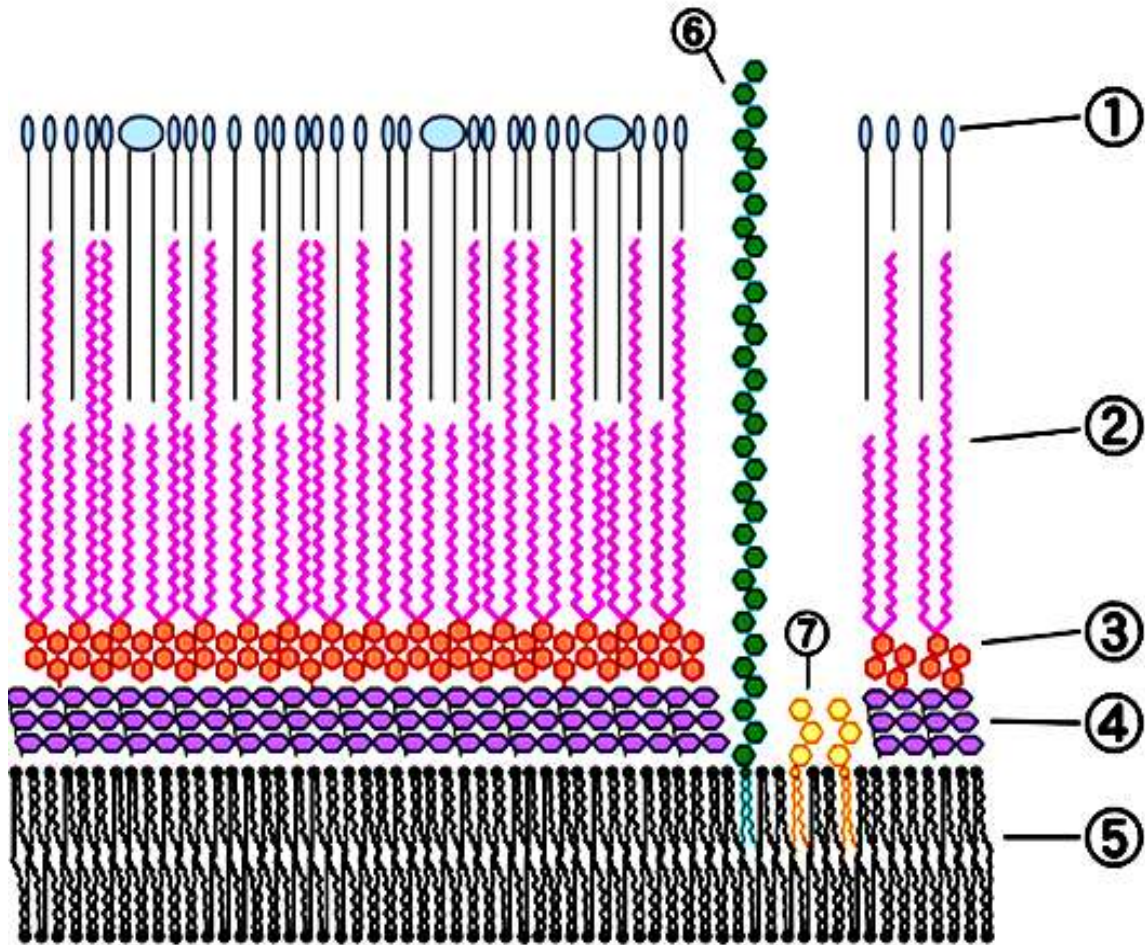


Figura II.8 – Representação esquemática da parede celular de *Mycobacterium*, sendo seus principais constituintes: (1) Glicolípídeos; (2) Ácidos micólicos; (3) Polissacarídeos (Arabinogalactano); (4) Peptideoglicano (LAM); (5) Membrana citoplasmática; (6) Lipoarabinomanano; (7) Fosfatidilinositol manósido. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/Mycobacterium>. Acesso: 05/2012.

Uma característica ainda mais distinta é que cerca de 60% da parede celular micobacteriana se constitui de lipídios que consistem basicamente em ácidos graxos de cadeia longa incomuns, com 60 a 90 átomos de carbono, denominados ácidos micólicos.

Esses estão covalentemente ligados ao polissacarídeo que compõe a parede celular, denominado arabinogalactano, que, por sua vez, liga-se ao peptídeoglicano, através de pontes fosfodiéster. A parede celular também contém alguns tipos de lipídeos livres, não covalentemente associados a este esqueleto basal (o complexo arabinogalactano-peptídeoglicano), e algumas proteínas. Esses lipídios representam epítomos passíveis de reconhecimento pelo hospedeiro (TRABULSI e ALTERTHUM, 2004).

O gradiente de fluidez na parede celular micobacteriana aparenta ter uma orientação contrária à das bactérias Gram-negativas, com regiões externas mais fluidas que as internas. Possuem proteínas de membranas formadas de canais catiônicos seletivos chamados porinas, que controlam ou retardam a difusão de pequenas moléculas hidrofílicas, conferindo uma baixa permeabilidade da parede celular a solutos hidrofílicos, e presentes em baixa concentração na parede. Esta parede singular permite que o micro-organismo sobreviva dentro de macrófagos, que normalmente aniquilam patógenos fagocitados. Também facilita agregação de bactérias, tornando ainda mais árduo o cultivo deste patógeno e a realização da contagem, além de dificultar seu diagnóstico.

Citoplasma

Constitui-se de um líquido viscoso e semitransparente, o citosol, composto por 80% de água e por milhares de tipos de proteínas, glicídios, lipídios, aminoácidos, bases nitrogenadas, vitaminas, íons. Mergulhados no citosol, há uma ou mais moléculas de DNA e milhares de ribossomos, estruturas granulosas especializadas na produção de proteínas (AMABIS, 2009).

O citoplasma das micobactérias é semelhante ao de outras bactérias e contém, principalmente, proteínas, carboidratos, lipídeos, íons orgânicos e compostos de baixo peso molecular. Possui estruturas como nucleóide, ribossomos e vacúolos gasosos espalhadas em seu interior.

II.4.3 – Característica Tintorial

Para facilitar a visualização de alguns micro-organismos num microscópio ótico, como bactérias, são utilizados métodos de coloração. Alguns métodos são denominados diferenciais, ou seja, permitem a classificação das bactérias em “grupos”. Dentre eles

destacam-se o Método de Coloração de Gram (que classifica a maioria das bactérias em Gram positivas e Gram negativas) e o Método de Ziehl-Neelsen (que cora, em particular, as micobactérias).

O médico dinamarquês Hans Christian Gram, em 1884, desenvolveu o método de coloração baseado na composição química e na integridade da parede celular. O método diferencia as bactérias, em relação a sua capacidade de resistir à remoção do complexo corante iodo-pararosanilina por uma solução de descorante orgânico (solução de álcool etílico, por exemplo). Aquelas bactérias que possuem uma parede celular composta por proteínas, lipídeos, uma grande quantidade de peptídeoglicano e ácidos teicóicos retêm o complexo corante (reação positiva) e se apresentam coradas em roxo, sendo chamadas de “Gram positivas”. As que possuem uma membrana externa à parede celular, constituída de fosfolipídeos, lipoproteínas e lipopolissacarídeos, e uma parede celular, constituída por uma fina camada de peptídeoglicano, não conseguem reter o complexo corante (reação negativa) e se apresentam coradas em rosa ou vermelho, sendo denominadas “Gram negativas”.

A coloração de Ziehl-Neelsen foi desenvolvida, em 1882, por Franz Ziehl (1857-1926) e Friedrich Neelsen (1854-1894). O método permite caracterizar os microorganismos que possuem paredes celulares ricas em ácido micólico. Esse método consiste no tratamento do esfregaço com fucsina fenicada (uma mistura dos corantes trifenilmetana, rasanilina e pararosalina em solução aquosa de fenol a 5%), seguida pelo descoramento, a partir da mistura álcool (97%) e ácido clorídrico (3%). Após ser lavado com água, o esfregaço é corado com azul de metileno. Bactérias álcool-ácido resistente (BAAR) positivas retêm a fucsina, corando-

se em vermelho; as que não a retêm, portanto BAAR negativas, coram-se em azul (TRABULSI *et al*, 2002).

A figura II.9 apresenta imagens de bactérias submetidas à coloração de Gram e a coloração de ZN.

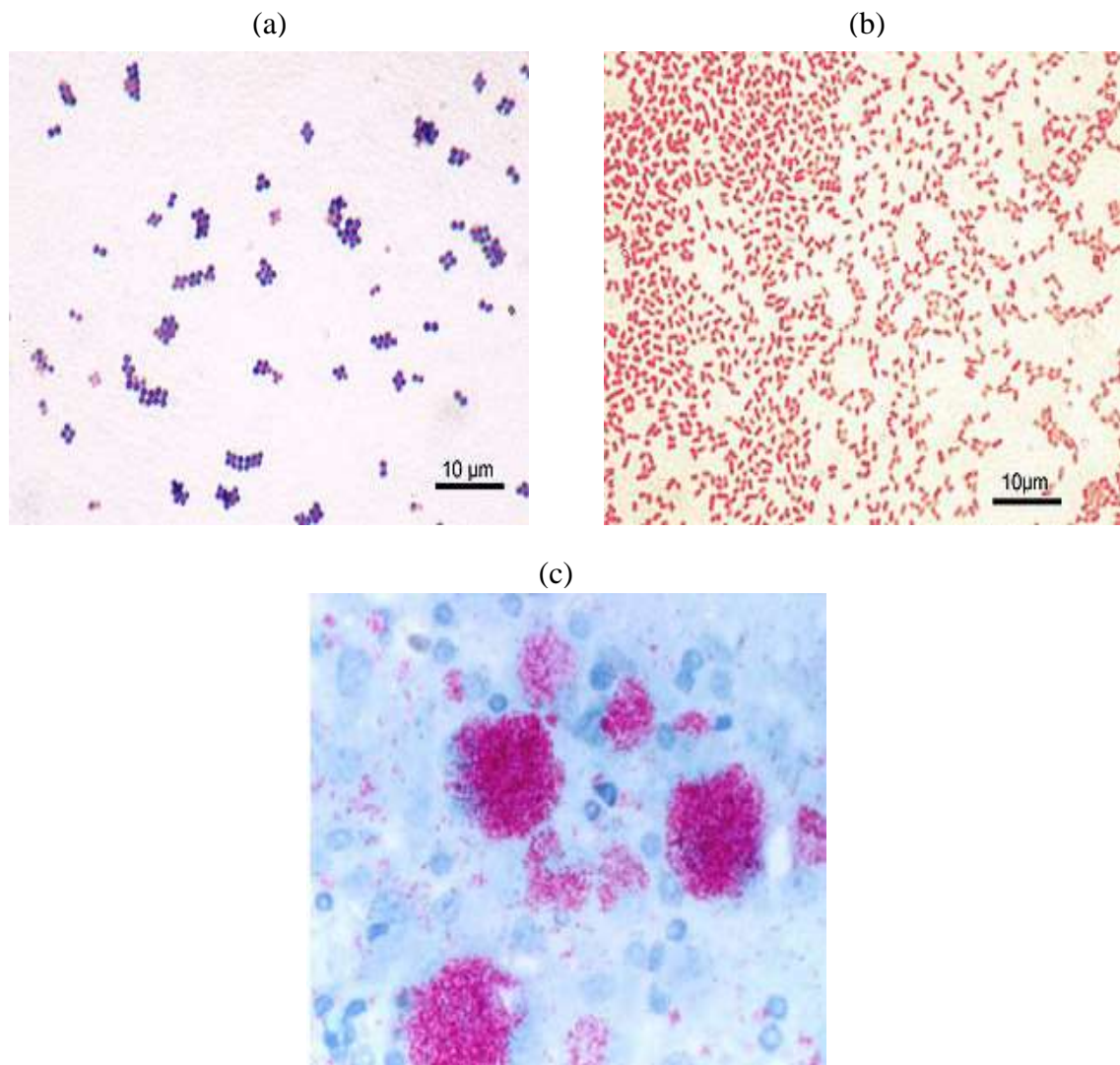


Figura II.9 – Colorações: a) *Staphylococcus aureus*: Cocos gram-positivos. b) *Pseudomonas aeruginosa*: Bacilos gram-negativos; c) Ziehl-Neelsen (rosa forte): Bacilos álcool-ácido resistentes compatíveis com *M. avium* subespécie *paratuberculosis* em esfregaço de tecidos. Disponível em:

a) e b) http://pt.wikipedia.org/wiki/T%C3%A9cnica_de_Grama Acesso: 06/2012

c) www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-09352008000500009&script=sci_arttext Acesso: 06/2012

II.4.4 – Crescimento celular e fissão binária

A célula bacteriana corresponde a uma usina biossintética capaz de se duplicar. Nos processos sintéticos do crescimento celular bacteriano, ocorrem várias reações químicas que envolvem, por exemplo, transformação de energia e biossíntese de pequenas moléculas. As principais reações de síntese celular correspondem às reações

de polimerização, processos pelos quais polímeros (macromoléculas) são originados, a partir de monômeros. A partir da formação dos polímeros, ocorrem os eventos finais do crescimento celular: organização das macromoléculas e formação de estruturas celulares, tais como: parede celular, membrana citoplasmática, flagelos, ribossomos, corpos de inclusão, complexo enzimático e assim por diante (TRABULSI e ALTERTHUM, 2004).

Fissão binária

Na maioria dos procariotos, o crescimento de uma célula individual ocorre até que esta se divida, originando duas novas células – processo denominado fissão binária ou cissiparidade (figura II.10). Essa partição, referida como septo, é resultante do crescimento da membrana citoplasmática e da parede celular para o interior da célula, em direções opostas, até a individualização da célula filha (TRABULSI e ALTERTHUM, 2004).

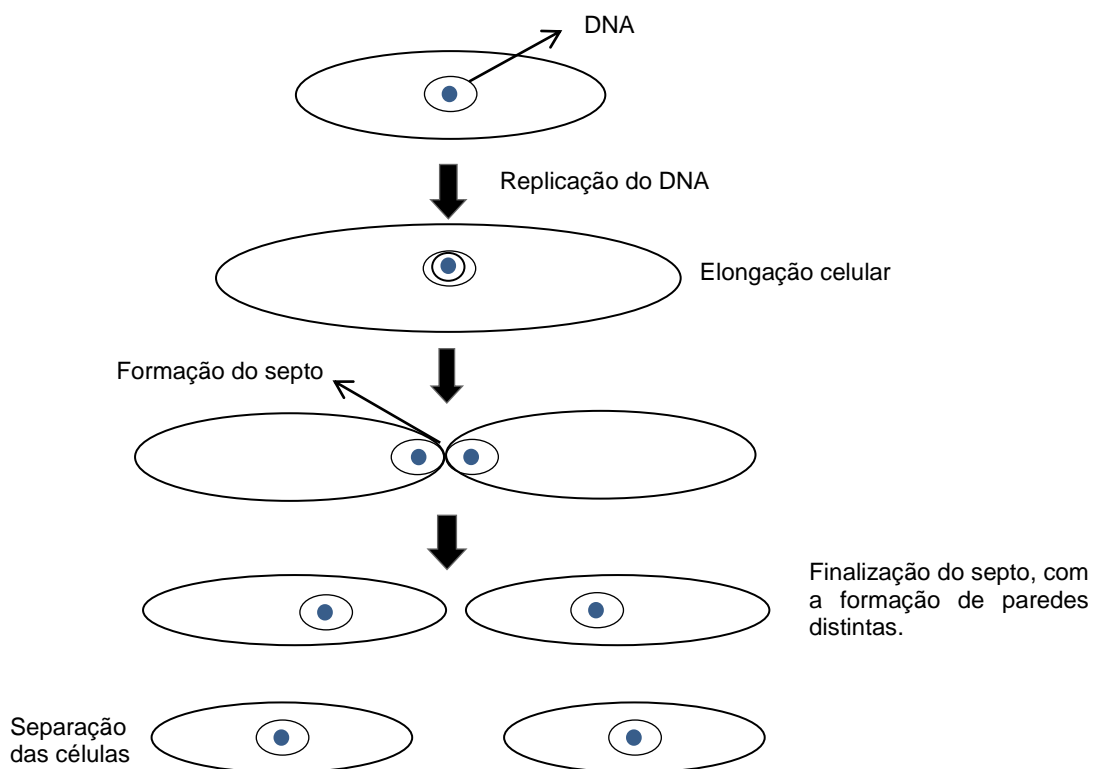


Figura II.10 – Esquema do processo geral da fissão binária em um bacilo.

As micobactérias se reproduzem utilizando o mesmo processo que a maioria das

bactérias. Durante a divisão celular, o cromossomo e o material citoplasmático da célula-mãe são distribuídos em partes iguais, entre duas células-filhas, originando descendentes geneticamente iguais entre si e a seu ancestral, caso não ocorra mutação. No entanto, relatos mais recentes da literatura descrevem a ocorrência de diferentes processos de reprodução no domínio *Bacteria* (MADIGAN *et al*, 2004). Em bactéria, o tempo necessário para que um ciclo completo de crescimento ocorra é altamente variável, pois depende de fatores, tanto nutricionais, quanto genéticos (MADIGAN *et al*, 2004).

II.4.5 – Crescimento de culturas micobacterianas.

O crescimento bacteriano pode ser definido, tanto como o aumento do número de células, quanto pode ser medido em termos do aumento de massa bacteriana. A taxa de crescimento corresponde à variação do número de células ou da massa celular por unidade de tempo. Durante o ciclo de divisão celular, todos os componentes estruturais de uma célula são duplicados. O intervalo em que uma célula origina duas novas é denominado geração. O tempo necessário para uma população dobrar de número (e de massa) é denominado tempo de geração ou tempo de duplicata. As condições de incubação no cultivo e o meio de cultura empregado interferem no tempo de geração (MADIGAN *et al*, 2004). O meio de cultura é um material nutriente, preparado em condições apropriadas num laboratório, que favorece o crescimento do micro-organismo (ANVISA, 2004).

Crescimento exponencial

O padrão de aumento populacional, em que o número de células é duplicado a cada período de tempo, é denominado crescimento exponencial. O crescimento exponencial caracteriza-se por apresentar inicialmente uma taxa lenta de aumento do número de células que, posteriormente, é acelerado (figura II.11).

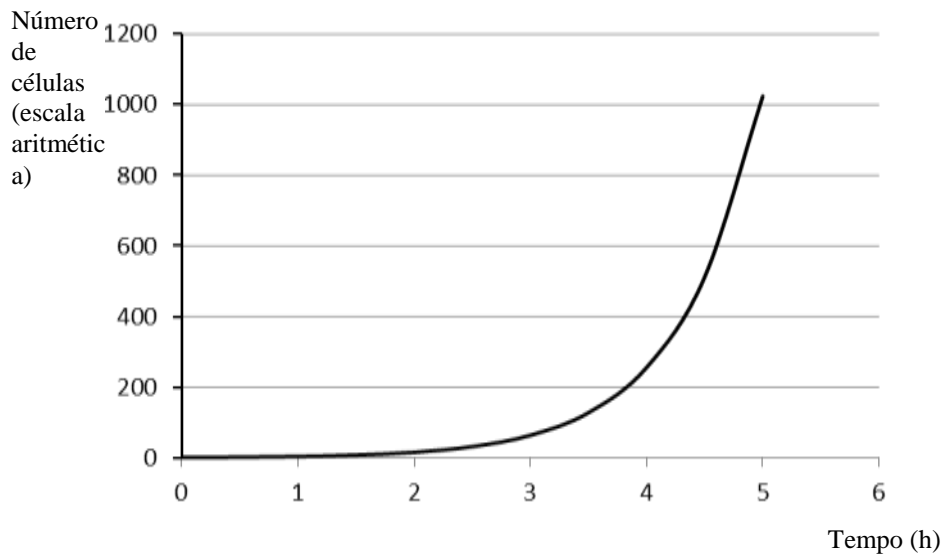


Figura II.11 - O gráfico número de células (escala aritmética) versus tempo, mostrando o crescimento exponencial celular.

Com o gráfico em escala aritmética, torna-se difícil obter informações sobre a taxa de crescimento. Entretanto, o gráfico com os mesmos dados, em escala semilogarítmica, gera uma reta (figura II.12). A função linear indica que as células estão crescendo exponencialmente e, além disso, permite se estimar o tempo de geração, a partir de um conjunto de resultados.

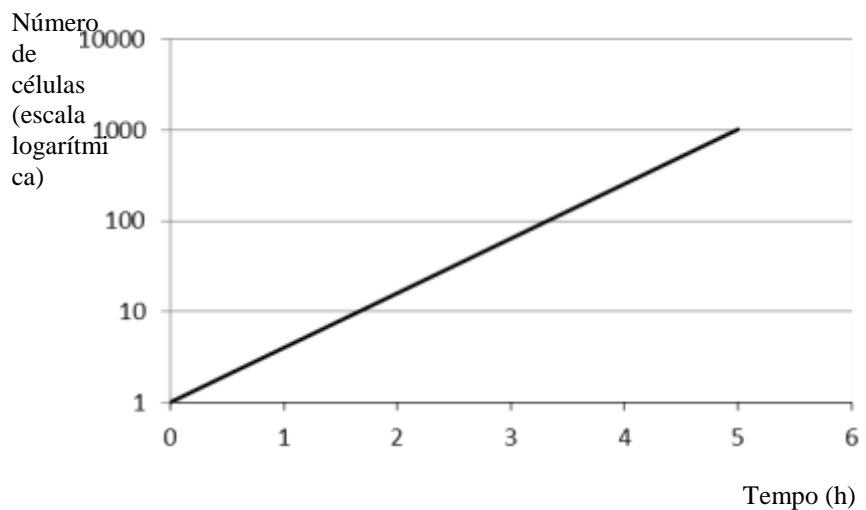


Figura II.12 - Número de células (escala logarítmica) versus tempo de crescimento.

O tempo de geração, g , é definido como a razão entre o tempo para a formação de gerações e o número de gerações, ou seja, $g = t/n$.

Outro dado importante no crescimento das bactérias é a relação direta entre o número de células inicialmente presentes numa cultura e o número de células depois de determinado período de crescimento. A equação 2.15 apresenta esta relação:

$$N = N_0 \cdot 2^n \quad (2.15)$$

onde N é o número final de células, N_0 , o número inicial de células, e n , o número de gerações formadas durante o período de crescimento exponencial.

II.4.6 – O ciclo de crescimento

O crescimento de micro-organismos num recipiente fechado – denominado cultura em batelada – permite a construção de uma curva de crescimento típica, ilustrada na figura II.13. Essa curva de crescimento pode ser dividida em várias fases distintas denominadas: fase lag, fase exponencial, fase estacionária, fase de morte.

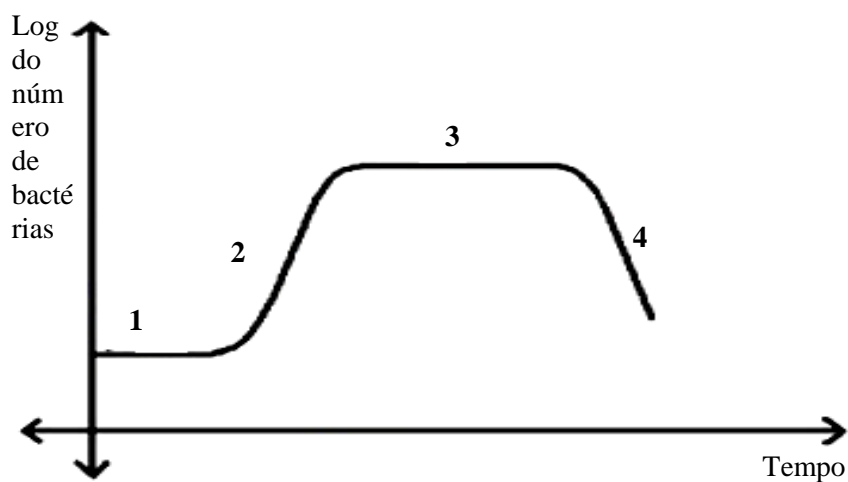


Figura II.13 – Curva de crescimento bacteriano. 1-Fase lag; 2-Fase exponencial ou logarítmica; 3-Fase estacionária e 4-Fase de morte ou declínio.

Fase lag: É a fase em que não ocorre a divisão celular, mas há um aumento de massa. Ela pode ou não existir, dependendo de certos fatores. Os fatores que a influenciam são: (MADIGAN *et al*, 2004):

- a) Inóculo pequeno;
- b) Inóculo oriundo de uma cultura velha;
- c) Meio de cultura e temperatura de incubação não adequados;
- d) Estágio do crescimento em que se encontra a cultura da qual provêm o inóculo;
- e) Inóculo formado por células que sofreram algum tipo de dano (tratamento térmico, radiações, compostos químicos tóxicos);

A fase lag é considerada um período de adaptação, no qual a atividade enzimática múltipla da célula, com os seus produtos, está sendo coordenada para um estado chamado integração total. A célula seria encarada como um sistema de dependências mútuas, no qual o ácido nucléico não pode ser sintetizado sem enzimas; proteínas enzimáticas são formadas sob a orientação do ácido nucléico e são essenciais para a construção da membrana celular, que, por sua vez, controla a entrada e a saída de material da célula. Somente depois que esse sistema estiver funcionando harmoniosamente, a divisão pode ocorrer. A fase lag deve ser encarada como um período não de repouso, mas, ao contrário, de intensa atividade metabólica (TRABULSI e ALTERTHUM, 2004)

Fase exponencial ou fase logarítmica

Esta fase foi descrita na seção anterior. Entretanto, vale ressaltar que, nela, a multiplicação celular é máxima e constante. Além disso, as células se encontram nas condições mais “saudáveis”. Células que se encontram na metade da fase exponencial de crescimento são, frequentemente, utilizadas para estudos enzimáticos ou de outros componentes celulares (TRABULSI e ALTERTHUM, 2004).

Fase estacionária

Ocorre quando os nutrientes essenciais são limitados e há um acúmulo de toxinas. (LOPES, 2001). Durante esta fase, a velocidade de multiplicação diminui gradualmente, até que se anule. O número de bactérias presentes, por unidade de volume, permanece constante por um tempo determinado. Durante essa fase, o número de bactérias novas que se formam contrabalança com o número daquelas que estão morrendo (TRABULSI e ALTERTHUM, 2004).

Em alguns organismos, pode haver um crescimento lento, durante a fase estacionária: algumas células se dividem, enquanto outras morrem e os dois processos são equilibrados, não promovendo alterações líquidas no número de células (esse fenômeno é denominado crescimento críptico) (MADIGAN *et al*, 2004).

Fase de morte ou de declínio

Se uma população que atingiu a fase estacionária permanecer nas mesmas condições de incubação, as células poderão permanecer vivas (metabolizando) ou morrer. Se elas morrerem, é possível dizer que atingiram a fase de morte, também conhecida como fase de declínio (MADIGAN *et al*, 2004). Os principais fatores da morte são a diminuição das reservas de energia e a lise da membrana citoplasmática.

A fase de morte, no ciclo celular, é também exponencial: Na maioria dos casos, no entanto, a taxa de morte celular é muito inferior à taxa de crescimento exponencial.

II.4.7 – Medida de crescimento populacional micobacteriano.

O crescimento populacional pode ser acompanhado pela análise das variações referentes ao número de células, a massa de algum componente celular ou a massa seca total das próprias células. Existem vários métodos que podem ser empregados na contagem do número total de células ou na mensuração da massa celular, os quais são adaptáveis aos diferentes organismos ou situações (TRABULSI e ALTERTHUM, 2004).

Os métodos utilizados para se estimar o número de organismos (figura II.14) e a massa de uma cultura bacteriana ou a quantidade de protoplasma (figura II.15) podem ser diretos e indiretos.

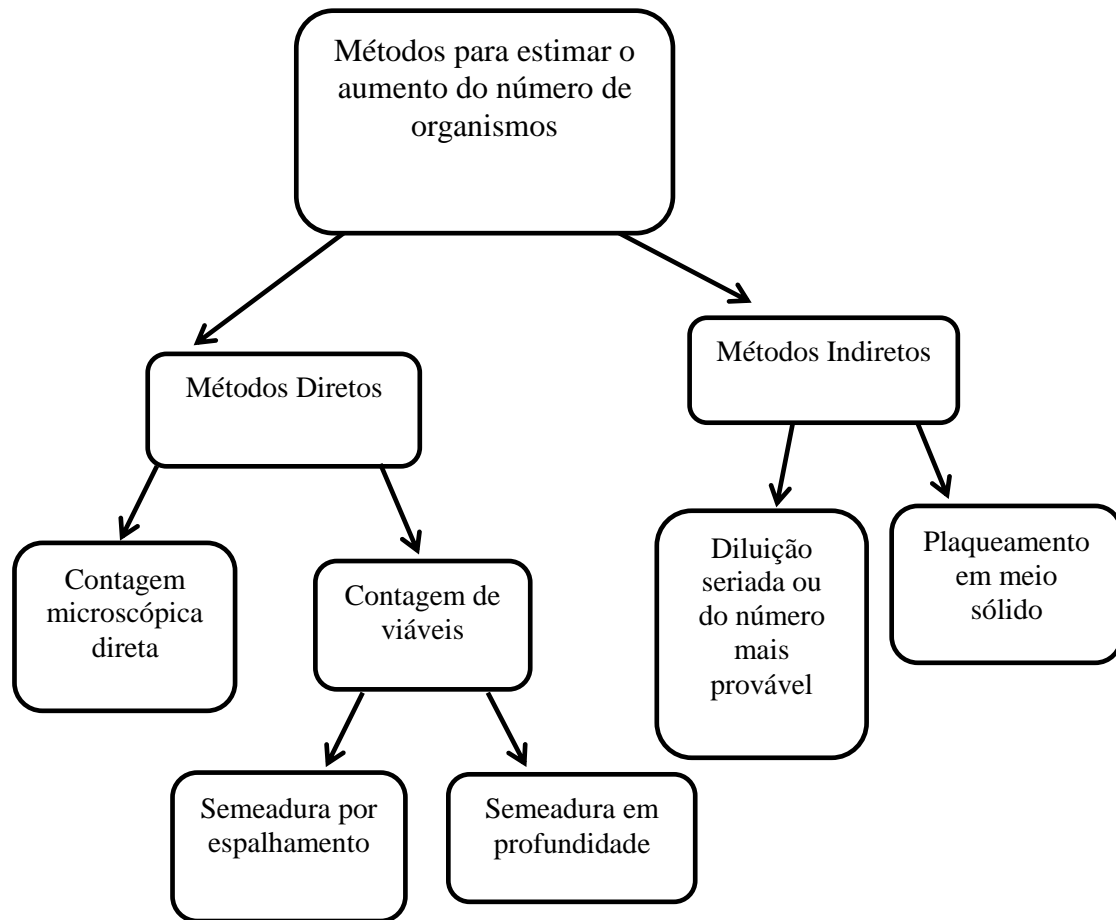


Figura II.14 – Métodos para estimar o aumento do número de organismos.

Dois tipos de contagem microscópica direta podem ser realizados: a partir de amostras secas em lâminas e de amostras líquidas. Para amostras líquidas, é necessária a utilização de câmaras especiais de contagem. A contagem microscópica direta é uma maneira rápida de se estimar o número de células microbianas. Entretanto, apresenta limitações, como: a) não é possível distinguir células vivas de células mortas; b) é uma técnica pouco precisa; c) não deve ser usada em suspensões com baixa densidade de células.

Quando se deseja excluir as células mortas do número total de organismos, o método adotado é a contagem de viáveis. Esta contagem normalmente é realizada pela determinação do número de células capazes de formar colônias em um meio sólido adequado. Por esta razão, tal metodologia é também denominada contagem em placas ou contagem de colônias.

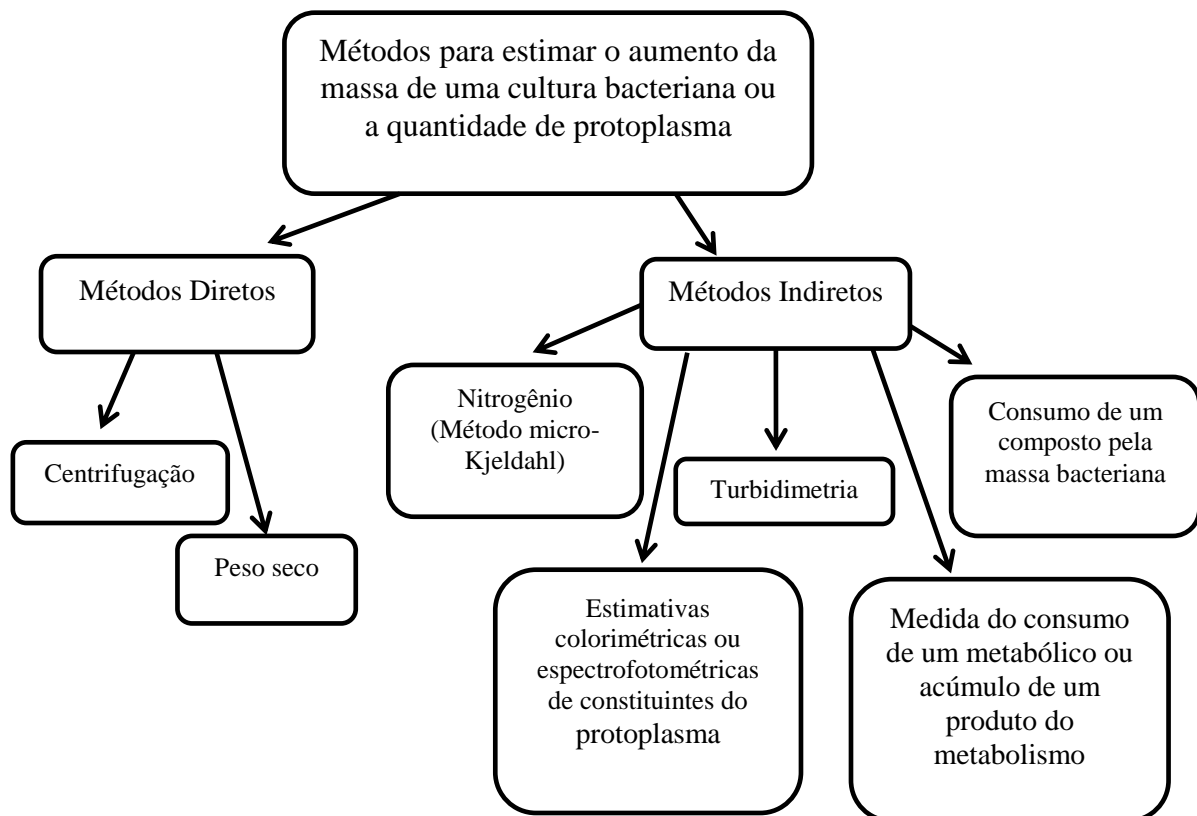


Figura II.15 – Métodos para se estimar o aumento da massa de uma cultura bacteriana ou a quantidade de protoplasma.

Dentre os métodos para se estimar o aumento da massa de uma cultura bacteriana destaca-se a Turbidimetria. Nesse ensaio, uma suspensão de células é colocada em uma cubeta e, então, num espectrofotômetro. Pode-se ainda usar um calorímetro ou, preferencialmente, um turbidímetro.

Bactérias em suspensão exibem o efeito Tyndall. A quantidade de massa bacteriana pode ser medida, tanto por absorvância, como por nefelometria, que correspondem, respectivamente, à luz absorvida e à luz dispersada no meio. Os fatores que afetam as medidas turbidimétricas são: tamanho e forma das partículas, concentração, índice de refração relativos das partículas e dos meios e comprimento de onda da luz incidente (TRABULSI e ALTERTHUM, 2004).

É importante ressaltar que o método só deve ser aplicado para suspensões densas; Além disso, é incapaz de diferenciar organismos viáveis das células mortas, estabelecendo assim, a contagem total de micro-organismos vivos e mortos presentes na suspensão.

A medição deve ser feita sempre por comparação a um padrão previamente aferido pela contagem na placa de Petri. Na rotina dos laboratórios, é comum o uso de uma escala visual de turvação, obtida pela mistura de quantidades variáveis de uma solução de cloreto de bário a 1% e de ácido sulfúrico a 1%. A escala não se aplica, entretanto, para todos os micro-organismos. O grau de turvação, correspondente aos tubos do padrão na escala de McFarland e a concentração de bactérias por mililitros são apresentados na tabela II.4 abaixo (BIER, 1970).

Tabela II.4 – Relação entre o grau de turvação indicado pela escala de McFarland e a concentração de bactérias.

Tubo	Número aproximado de micro-organismos (10⁸/ml)
1	3
2	6
3	9
4	12
5	15
6	18
7	21
8	24
9	27
10	30

II.4.8 – Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial pode ser obtido através da baciloscopia e do cultivo dos micro-organismos.

II.4.8.1 - Exame Microscópico (Baciloscopia)

A baciloscopia é considerada o procedimento mais rápido e fácil permitindo ao laboratório detectar a presença de BAAR. É também utilizada, quando se deseja confirmar a presença de BAAR no crescimento de culturas em meio sólido.

Apesar da facilidade de execução, a baciloscopia apresenta algumas desvantagens, tais como: elevado número de bacilos necessários para testar a positividade; carência de sensibilidade, que varia de 30% à 80%; e incapacidade de

discriminar a espécie de micobactéria (RIEDER *et al*, 1998; GEBRE *et al*, 1995).

II.4.8.2 - Cultivo

O cultivo é um procedimento que propicia a nutrição, o crescimento e a multiplicação dos micro-organismos, resultando na formação da colônia, quando estes são semeados em determinados meios líquidos ou sólidos, chamados meios de cultura. A cultura é o método mais sensível que detecta, em média, 80% dos casos e permite a identificação posterior da espécie (SCHIRM *et al*, 1995). A limitação do método está no tempo necessário para o crescimento da cultura. Para a realização do cultivo de micro-organismos, deve-se levar em consideração: a nutrição adequada, os fatores de crescimento e o meio de cultura.

a) Nutrição microbiana

As células constituem-se de água, uma grande quantidade de macromoléculas e uma variedade de íons orgânicos. As macromoléculas (proteína, polissacarídeos, lipídeos, lipopolissacarídeos, DNA e RNA) são compostas por unidades menores denominados manômeros. Assim, a nutrição microbiana pode ser definida como um mecanismo que fornece às células ferramentas químicas necessárias à síntese dos diversos manômeros. Essas ferramentas químicas correspondem aos nutrientes.

Nem todos os nutrientes são necessários nas mesmas quantidades. Alguns, denominados macronutrientes (carbono, nitrogênio, hidrogênio, oxigênio, fósforo, potássio, magnésio, sódio, cálcio e ferro) são necessários em grandes quantidades, enquanto outros nutrientes, os micronutrientes, são requeridos em menores quantidades, muitas vezes apenas traços (MADIGAN *et al*, 2004).

b) Fatores de crescimento

Os fatores de crescimento são definidos como compostos orgânicos que alguns tipos celulares necessitam em quantidade muito pequenas. Os fatores de crescimento incluem vitaminas, aminoácidos, purinas e pirimidinas. Embora a maioria dos micro-organismos seja capaz de sintetizar todos esses compostos, alguns os requerem pré-formados, a partir do meio (MADIGAN *et al*, 2004).

c) Meios de cultura

Os meios de cultura, sólidos ou líquidos correspondem a soluções nutrientes utilizadas para promover o crescimento dos micro-organismos em laboratório. Existem duas grandes classes de meios de cultura utilizados em microbiologia: os quimicamente definidos e os indefinidos (complexos). Os quimicamente definidos são preparados pela adição de quantidades precisas de compostos químicos orgânicos e inorgânicos altamente purificados a uma determinada quantidade de água destilada. Já os meios complexos, frequentemente, empregam produtos da digestão de caseína (proteína do leite), de carne, de soja, de leveduras ou de várias outras substâncias altamente nutritivas (ainda que quimicamente indefinidas) (MADIGAN *et al*, 2004).

O meio mais utilizado para isolamento e/ou crescimento das micobactérias é o Lowenstein-Jensen (LJ). O LJ é um meio solidificado à base de ovo que contém glicerol como fonte de carbono e asparagina como fonte de nitrogênio. Outros meios solidificados à base de ágar, como 7H10 e 7H11 de Middlebrook (BRASIL, 1998).

Atualmente, encontram-se disponíveis, comercialmente, novos métodos de cultura, pois a ênfase no laboratório clínico tem sido o desenvolvimento de sistemas mais rápidos e sensíveis para o isolamento de micobactérias, que, no futuro, irão substituir os processos longos da cultura em meios sólidos. Como exemplos desses novos métodos, destacam-se: o método radiométrico (Bactec), Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) e o Sept-check AFB.

II.4.9 - Identificação das micobactérias

As micobactérias são identificadas por suas características morfológicas, velocidade de crescimento em meios de cultura apropriados, capacidade de crescimento em meios de cultura contendo inibidores, morfologia colonial, pigmentação e reação bioquímicas e enzimáticas.

II.5 - Micobactérias Não Tuberculosas

As MNT também são conhecidas como micobactérias ambientais, micobactérias atípicas, outras micobactérias que não *M. tuberculosis* ou ainda oportunistas.

As micobactérias não tuberculosas podem ser encontradas como micro-organismos saprófitos, comensais, simbióticos ou potenciais patogênicos (oportunistas). Podem-se encontrar espécies de crescimento lento (com formação de colônias em meio sólido, a partir do sétimo dia de incubação) e espécies de crescimento rápido (com formação de colônias em meio sólido, em menos de sete dias de incubação). A elevada resistência a antibióticos e desinfetantes, bem como a presença de ácidos micólicos em sua parede e a patogenicidade intracelular são algumas das características compartilhadas entre as MNT e as espécies do complexo *M. tuberculosis* (PRIMM *et al.*, 2004).

Atualmente, as micobactérias não tuberculosas são reconhecidas como verdadeiros patogênicos e apresentam mais de 50 espécies associadas a doenças no ser humano. Acredita-se que a infecção seja adquirida, a partir do meio ambiente, através da ingestão, inalação de água, partículas ou aerossóis, ou inoculação. Também existem relatos de infecções provocadas pela inadequada desinfecção de equipamentos médicos. A distinção das micobactérias não tuberculosas do complexo *M. tuberculosis*, numa fase inicial do diagnóstico, é muito importante, uma vez que existe diferença quanto a susceptibilidade aos antibióticos, que exige um maior cuidado no tratamento (CERCA, 2010).

Nas últimas décadas, há um crescente interesse nas MNT, principalmente devido à epidemia da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) (SIVASANKARI *et al.*, 2006; PIERSIMONI & SCARPARO, 2008).

II.5.1 – A ecologia e as Micobactérias Não Tuberculosas

As Micobactérias Não Tuberculosas podem ser encontradas em ambientes naturais e sintéticos. Em ambos os casos, os biofilmes podem ser importantes fontes de micobactérias não tuberculosas e serem responsáveis por “pseudo-infecções” e por doenças. (LEÃO *et al.*, 2005).

II.5.2 – Micobactérias Não Tuberculosas isoladas a partir de ambientes naturais e sintéticos

As micobactérias não tuberculosas estão presentes numa grande variedade de reservatórios, incluindo: água para consumo, esgotos, solo, aerossóis, poeiras, protozoários, animais e o homem.

O homem está regularmente em contato com micobactérias não tuberculosas, ao inalar ou ingerir partículas do ambiente, água ou alimentos contaminados. Conseqüentemente, a colonização temporária ou permanente no trato respiratório ou digestivo e na pele do homem por estes organismos é muito comum.

É importante diferenciar os ambientes naturais dos ambientes influenciados pelo homem (abastecimentos de água, piscinas, aquários, esgotos) como nichos ecológicos de micobactérias, porque determinadas espécies são muito mais comuns na natureza, enquanto que outras são encontradas, em sua maioria, em ambientes sintéticos (LEÃO *et al.*, 2005).

Os chamados ambientes sintéticos são colonizados por um espectro considerável de espécies de micobactérias, algumas das quais vivem quase exclusivamente nesses habitats.

A predominância de muitas espécies de micobactérias não tuberculosas na água canalizada é explicada pela sua elevada resistência aos desinfetantes mais comuns e sua tolerância as variações amplas de pH e temperatura, o que permite a colonização, sobrevivência e crescimento de micobactérias na água canalizada. Adicionalmente, o tratamento do abastecimento de água com cloro pode levar a uma alteração na população bacteriana, levando ao predomínio das micobactérias não tuberculosas na rede de água pública (PRIMM *et al.*, 2004; HUSSEIN *et al.*, 2009). Mais de 20 espécies de micobactérias não tuberculosas já foram isoladas, a partir de sistemas de água potável (HUSSEIN *et al.*, 2009). Além disso, como já foram referidas anteriormente, as micobactérias não tuberculosas apresentam a capacidade de formar biofilmes, podendo, desse modo, persistir no meio ambiente (PRIMM *et al.*, 2004; HUSSEIN *et al.*, 2009).

II.5.3 - Biofilmes

Define-se um biofilme como uma estrutura de células microbianas, irreversivelmente associada com uma superfície, onde elas se multiplicam e produzem

uma matriz extracelular com propriedades adesivas. Os biofilmes podem formar-se nas mais diversas superfícies, nos quais se incluem os tecidos vivos, equipamentos hospitalares, nos sistemas de água potável ou industrial, ou ainda em sistemas aquáticos naturais (DONLAN, 2002).

Os biofilmes podem ser fontes importantes de micobactérias não tuberculosas. No entanto, a função protetora dos biofilmes, em relação às micobactérias não tuberculosas contra fatores ambientais agressivos e, em alguns casos, na promoção de seu crescimento, ainda não está bem caracterizada. A presença de micobactérias não tuberculosas nos biofilmes pode, conseqüentemente, apresentar um impacto na saúde do homem, pois elas podem ser responsáveis por problemas de contaminação e doenças (LEÃO *et al*, 2005).

II.5.4 - Identificação e classificação das MNT

A identificação das micobactérias deveria ser realizada, considerando-se todo o esquema taxonômico; entretanto, dificuldades, ocasionadas pelas semelhanças de alguns padrões bioquímicos, além das variações na mesma espécie, impedem alcançar tal objetivo.

Em períodos diferentes, as características fenotípicas e genotípicas coordenavam a identificação das micobactérias. Entre meados de 1880 até o final da década de 1980, a identificação das micobactérias ocorria através de técnicas fenotípicas. A utilização de técnicas que usam características genotípicas foi iniciada somente na última década do século 20.

Quando se utiliza os testes fenotípicos, deve-se levar em consideração o tempo de crescimento, produção ou não de pigmentos, temperatura preferencial de crescimento, provas bioquímicas, crescimento ou não na presença de inibidores químicos (KANAI, 2006).

Em 1954, Timpe e Runyon utilizaram, pela primeira vez, o termo “micobactéria não tuberculosas” (MNT) para identificar e diferenciar todas as micobactérias não pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* e *M. leprae*. Em 1959, implementaram sua classificação, reconhecida, hoje em dia, por classificação de Runyon. (SOLAR *et al*, 2005). Tal classificação (Tabela II.5) divide-se em quatro grupos, com base em duas características fenotípicas (ADOLF LUTZ, 2005):

a) produção de pigmentos carotenóides.

b) tempo de crescimento em meio de cultura (rápido, se ocorrer antes de sete dias, e lento, se ocorrer em sete dias ou mais).

Tabela II.5 - Classificação das MNT pelo tempo de crescimento e pela produção de pigmento.

GRUPOS	PIGMENTAÇÃO	TEMPO DE CRESCIMENTO	EXEMPLOS DE MNT
Grupo I	Fotocromógenas	Lento	<i>M. marinum</i> e <i>M. kansasii</i>
Grupo II	Escotocromógenas	Lento	<i>M. gordonae</i> e <i>M. xenopi</i>
Grupo III	Acromógenas	Lento	<i>M. avium-intracellulare</i> e <i>M. terrae</i>
Grupo IV	Produtora ou não de pigmento	Rápido	<i>M. fortuitum-chelonae</i>

As MNT são também classificadas, conforme sua capacidade de causar doença no homem, como potencialmente patogênicas e não patogênicas (DAVIDSON, 1989).

A identificação de micobactérias, através de métodos que levam em consideração as características fenotípicas, denominada de metodologia clássica, já está bem estabelecida, padronizada, sendo de baixo custo. Entretanto, tais métodos limitam a identificação, quando há um grande número de cepas sendo estudadas.

A classificação atual fundamenta-se ainda na de Runyon, baseada, sobretudo, em características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas das micobactérias, mas enriquecida por evidências antigênicas e informações genômicas, obtidas com técnicas de Biologia Molecular. Além disso, houve também o desenvolvimento de técnicas quimiotaxonômicas, com importantes resultados relacionados à análise da carga lipídica da parede celular das micobactérias, que inclui moléculas únicas, como os ácidos micólicos.

A identificação química é feita pela análise dos ácidos micólicos, que podem variar o tipo estrutural, mas não apresentam mais do que dois pontos de instauração. Esses ácidos micólicos de cadeia longa, ramificados em α e hidroxilados em β , são utilizados na taxonomia por formarem uma propriedade fenotípica estável entre as espécies de micobactérias. Cada espécie ou grupo de espécies sintetizam um conjunto de ácidos micólicos, cujo perfil ou padrão são revelados pelas técnicas de cromatografia (TORTORA et al, 2005). Métodos que usam sequenciamento de DNA, hibridação e

PCR (“Polymerase Chain Reaction”) são usados para identificação genotípica (molecular) das micobactérias (PERNG *et al*, 2012; DROSTEN *et al*, 2003; YAM *et al*, 2006).

É importante ressaltar que a identificação exata das espécies possibilita a realização de estudos epidemiológicos detalhados, orienta a análise laboratorial das amostras e, além disso, amplia o conhecimento sobre os perfis de sensibilidade das diferentes espécies aos antimicrobianos, o que representa um importante subsídio para a prática clínica frente às infecções associadas a tais micro-organismos (KANAI, 2006).

II.6 - Aspectos da *Mycobacterium marinum*

Primeiramente descrita por Aronson, em 1926, esta espécie também foi conhecida como *M. balnei* (LINELL e NORDEN, 1954). Somente em 1951, infecções relacionadas à *M. marinum* foram documentadas.

Clinicamente, lesões resultantes desta micobactéria atípica variam de um único granuloma na pele a nódulos esporotricóides das mãos, sendo verificada uma manifestação sistêmica da doença provavelmente pelo fato deste micro-organismo não sobreviver a temperaturas acima de 37°C o que justificaria o fato de manifestação clínica da doença se restringir às extremidades do corpo.

Em termos epidemiológicos, infecção por *M. marinum* relaciona-se à atividade pesqueira, havendo necessidade do contato desta micobactéria com fissuras ou cortes prévios na pele. Neste sentido, exposição ao risco de infecção ocorre em atividades pesqueiras em alto mar ou no cultivo de peixes para comercialização. Neste último caso, proliferação aumentada de *M. marinum* é atribuída à concentração populacional do hospedeiro e a presença de altos níveis de compostos nitrogenados e carbonados na água do reservatório (ISHIKAWA, *et al*, 2001).

Em relação às características biológicas do patógeno, verifica-se que seu crescimento em meio de cultura é considerado de velocidade intermediária entre às micobactérias verdadeiramente lentas e as espécies com crescimento rápido. Esta micobactéria não possui atividade nitrato redutase e se mostra fotocromogênica, sendo estes fatores determinantes para sua diferenciação de *M. fortuitum*.

Quanto aos protocolos quimioterapêuticos sugeridos para o tratamento de infecções causadas por *M. marinum*, este inclui a utilização de drogas como minociclina, trimetoprim-sulfametaxazol, ou rifampicina mais etambutol. Finalmente,

isolados de *M. marinum* são resistentes a isoaniazida e pirazinamida e tem uma susceptibilidade intermediária a estreptomincina.

A incidência internacional e prevalência de infecção *M. marinum* são desconhecidas devido à falta de vigilância. Um estudo francês encontrou a incidência de infecção *M. marinum* de 4 por 10.000.000 habitantes por ano.

Não há comprovação que a infecção por *M. marinum* seja transmitida de pessoa para pessoa. Assim como também, em hospitais.

II.7 - Aspectos da *Mycobacterium fortuitum*

Em 1905, a *Mycobacterium fortuitum* foi isolada de um anfíbio e, em 1938, identificada como a causa de uma infecção em um paciente; constitui-se em uma micobactéria não tuberculosa de crescimento rápido de importante relevância clínica por estar associada a diversas lesões subsequentes a procedimentos cirúrgicos, incluindo liposucção, implantes de seios de silicones, exposição a materiais prostéticos e introdução de marcapasso, além de lesões esporádicas na pele, tecidos moles e, raramente, nos pulmões (MATOS *et al.*, 2004; PALWADE *et al.*, 2006; USLAN *et al.*, 2006).

Esta bactéria atípica é considerada urbana, sendo largamente encontrada em coleções de água e nos solos por todo o mundo. Quando comparada a *M. tuberculosis*, enquanto bactéria ambiental, é considerada menos virulenta, entretanto, ao estabelecerem um processo patogênico por ocasião da infecção, são de difícil erradicação por apresentarem maior resistência aos antimicrobianos (PALWADE *et al.*, 2006).

Em pacientes imunocomprometidos, infecções por *M. fortuitum* tem sido consideradas emergentes. Nestes pacientes, a infecção é caracterizada pelo acometimento de órgãos profundos e disseminação de lesões cutâneas, mas a despeito das baixas frequências de mortalidade documentada em pacientes HIV positivos, verificam-se significantes casos de morbidade quando comparados a pacientes imunocompetentes.

Em termos de caracterização fenotípica, isolados de *M. fortuitum* em laboratório crescem a temperatura de 43°C ou a 37°C em meio Agar Mac Conkey, um meio de cultura diferencial tóxico para bactérias Gram positivas devido à presença de cristal violeta. Em adição, *M. fortuitum* é capaz de crescer a 37°C numa solução de cloreto de

sódio na concentração de 5% e apresenta atividade nitrato redutase, indicando que este patógeno é capaz de converter o nitrato a nitrito para posterior utilização deste como fonte de nitrogênio para biossíntese de biomoléculas como proteínas e bases nitrogenadas. Finalmente, *M. fortuitum* é incapaz de utilizar somente citrato como fonte de carbono (MATOS *et al.*, 2004; USLAN *et al.*, 2006).

II.8 – Dendrímeros

O termo dendrímeros é derivado das palavras gregas *dendron* (árvore) e *meros* (porção) (VÖGTLE *et al.*, 2000). Trata-se de macromoléculas poliméricas tridimensionais que podem ser de diferente natureza, altamente ramificadas e compostas por um núcleo ao qual são adicionadas unidades monoméricas. A cada unidade monomérica adicionada ao núcleo iniciador da macromolécula forma-se uma geração; o núcleo é denominado geração 0 (zero) (BERNHARDSSON e SHISHOO, 2003). Os polímeros com estrutura dendrímica diferem dos polímeros clássicos em quatro áreas distintas: (i) simetria; (ii) grau de ramificação; (iii) funcionalização terminal e (iv) monodispersão. (BOAS e HEEGAARD, 2004).

Uma das propriedades mais representativas dos dendrímeros é a sua viscosidade. O grau de viscosidade cresce com o aumento do número de monômeros, tal como os polímeros, entretanto, a partir de uma determinada geração, dependendo do dendrímero, esta viscosidade decai; por consequência, os dendrímeros de geração mais alta apresentam mais grupos terminais, porém, menor viscosidade que os de geração mais baixa.

Os dendrímeros podem ser sintetizados quimicamente por duas formas distintas: pelo método divergente, desenvolvido por Tomalia (TOMALIA *et al.*, 1985) e Newkome (NEWKOME *et al.*, 1985), ou pelo convergente de Frechet (FRECHET, 1999).

O método divergente consiste no crescimento de um núcleo central, onde as ramificações são justapostas através de etapas sintéticas repetitivas. Este método é caracterizado por reações que ocorrem por um aumento do número de sítios reativos na molécula, como se o dendrímero estivesse sendo construído “de dentro para fora” (TOMALIA *et al.*, 1985). A representação do método de síntese divergente está esquematizado na figura II-16.

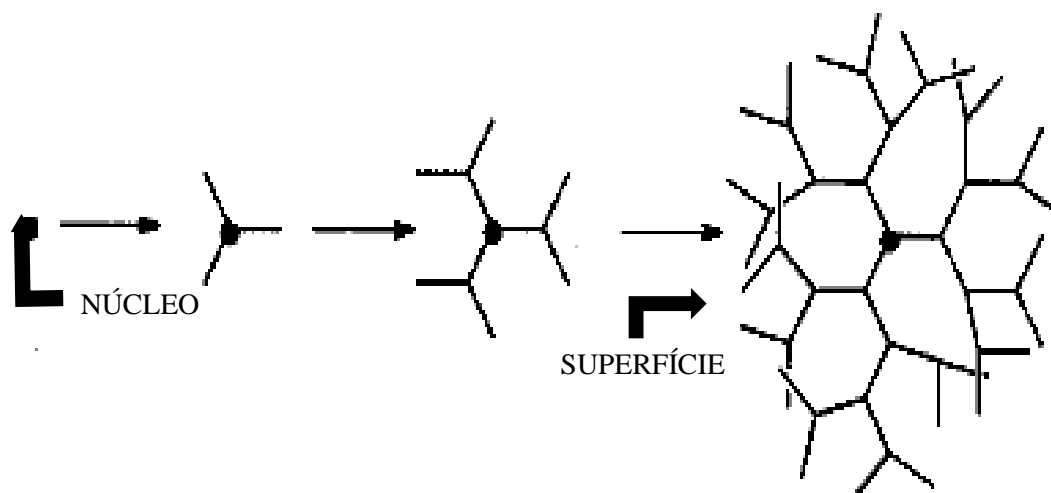


Figura II.16 – Representação do método divergente de síntese. (MONTANARI *et al*, 1998).

É importante salientar que, apesar do método divergente ter se apresentado bem sucedido para a produção em larga escala de dendrímeros, algumas dificuldades ainda podem ser encontradas. Durante o processo podem ocorrer reações laterais, ou ainda, as reações dos grupos externos podem ficar incompletas; conseqüentemente, o resultado será uma estrutura defeituosa, acarretando dificuldades na purificação do produto final.

Com o objetivo principal de minimizar os problemas encontrados na síntese divergente, o método convergente teve que ser desenvolvido. A síntese pelo método convergente (Figura II-17) se inicia pelos grupos terminais, em direção ao núcleo, onde os segmentos de dendrímeros, chamados de dendrômeros, são ligados entre si (HAWKER e FRECHET, 1990).

O método de síntese convergente para a obtenção de dendrímeros tem diversas vantagens. É relativamente fácil purificar o produto desejado e a ocorrência dos defeitos na estrutura final é minimizada. Entretanto, o processo de síntese convergente não permite a formação de elevadas gerações de dendrímeros.

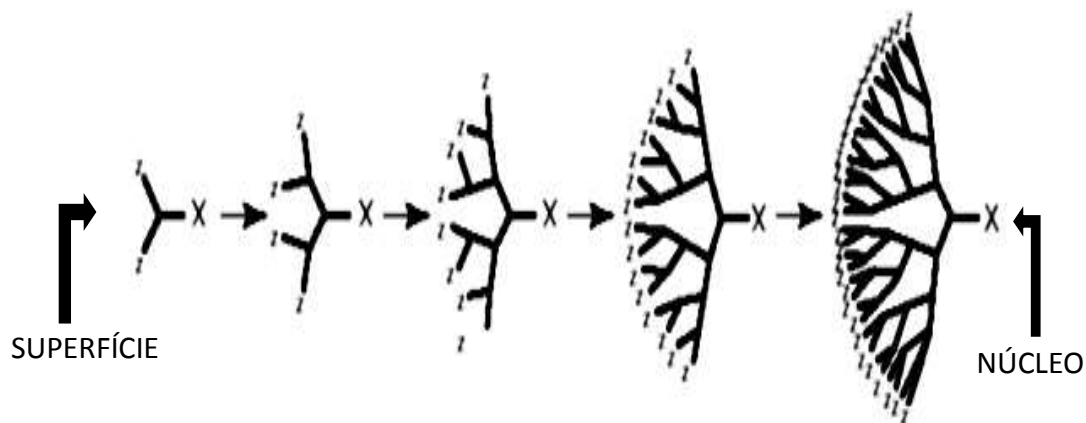


Figura II.17 – Representação do método convergente de síntese (VIEIRA, 2006).

A uniformidade molecular dos dendrímeros e sua superfície multifuncional, além da presença de cavidades internas, fazem dessas macromoléculas sistemas interessantes para uma gama de aplicações. Na Medicina, por exemplo, existem estudos sobre a entrega de drogas através de dendrímeros (PATRI *et al*, 2002).

O dendrímero poli(amidoamina) (PAMAM) é o mais conhecido e referenciado literatura (ESFAND *et al*, 2011). O PAMAM é constituído de um núcleo de amônia (NH_3) ou etilenodiamina ($\text{C}_2\text{H}_8\text{N}_2$), ligado a ramificações de grupamentos amida (R-CONH_2) e amina (R-NH_2).

A Figura II-18 ilustra a estrutura química de um dendrímero PAMAM de primeira geração com um núcleo de etilenodiamina.

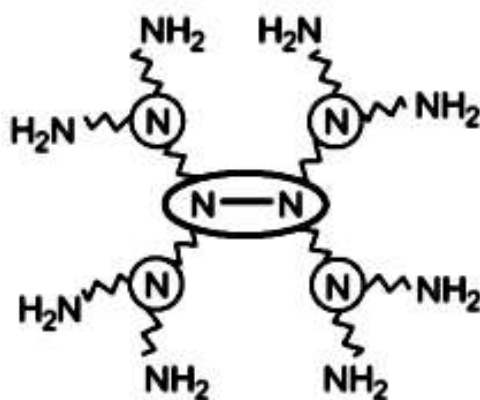


Figura II-18 - Estrutura de um dendrímero PAMAM de primeira geração (G1) (VIEIRA, 2006).

A organização de sua estrutura possibilita a proteção de fármacos, muito ou pouco solúveis, e outros solutos no interior de suas cavidades quimicamente bem definidas, formando complexos via encapsulamento molecular, com ligações covalentes e não covalentes. A alta densidade de cargas superficiais presente, devido aos múltiplos grupos ionizáveis na periferia, possibilita também a interação eletrostática com diferentes fármacos (CHAUHAN, *et al*, 2003); além disso, os diversos grupos da superfície podem ser seletivamente construídos e modificados para promover um preciso espaçamento na superfície das moléculas, característica que nem sempre se encontra em nanopartículas convencionais (FLORENCE, 2005). Estudos microbiológicos demonstram que os dendrímeros são capazes de potencializar a atividade antibacteriana em até oito vezes (MA *et al*, 2007).

CAPÍTULO III

METODOLOGIA

Considerando a necessidade de se desenvolver metodologias atrativas e alternativas para a caracterização e/ou identificação de micobactérias, iniciou-se este trabalho buscando demonstrar a eficiência da técnica neutronográfica para a caracterização morfológica de Micobactérias Não Tuberculosas (MNT).

Para demonstrar a viabilidade da técnica, foi utilizado protocolo semelhante ao adotado em teses anteriores (WACHA, 1999; LOPES, 2001; LIMA, 2009). Os parâmetros adotados foram: concentração da solução de ^{10}B para incubação igual a 5,0 mg/ml; tempo de exposição ao feixe de nêutrons térmicos igual a 30 minutos; revelação realizada com NaOH (6,25 N) durante 60 min numa temperatura constante e igual a 90°C. Variou-se o tempo e a temperatura de incubação.

O protocolo microbiológico adotado seguiu os padrões tradicionais; este procedimento foi escolhido com o objetivo de assegurar que o número de micro-organismos fosse conhecido e que as micobactérias estivessem na fase exponencial de crescimento, pois é nesta fase que os micro-organismos se encontram na sua atividade metabólica máxima o que significa maior possibilidade de absorção de substâncias essenciais para a sua sobrevivência; conseqüentemente, espera-se uma maior interação com o boro.

As amostras laboratoriais escolhidas pertencem, de acordo com a classificação de Runyon, ao grupo I (crescimento lento) e IV (crescimento rápido), sendo elas, respectivamente, *M. marinum* (ATCC 927) e *M. fortuitum* (ATCC 6841). Como são conhecidos o comportamento biológico e a forma das micobactérias escolhidas, aumenta-se o grau da confiabilidade dos resultados.

Para registrar as imagens neutronográficas utilizou-se o detector de traços nucleares CR-39 PM355 de espessura 625 micra, fabricado pela empresa inglesa Page Moulding (Pershore) Ltda, cortado em lâminas de, aproximadamente, 1 cm x 1 cm sobre as quais pipetou-se 5,0 µl das amostras de MNT incubadas com boro. A incubação foi realizada de duas formas: somente com o boro ou utilizando o dendrímero PAMAM de quarta geração (G4) para carrear o boro às micobactérias; a dopagem foi realizada durante o cultivo e após a inativação.

Após depósito e secagem das amostras no CR-39, partiu-se para a irradiação com nêutrons no reator Argonauta IEN/CNEN. Finalizada a irradiação as lâminas de CR-39 passaram por ataque químico para tornar possível a visualização das imagens num microscópio ótico. As imagens foram capturadas por uma câmara digital e armazenadas no computador.

Visando a biossegurança, as micobactérias foram inativadas por processos físicos ou químicos; é importante ressaltar que, a dopagem foi realizada antes e após da inativação dos micro-organismos visando avaliar a absorção do boro na micobactéria; Outro dado relevante foi a realização de controles negativos em todos os experimentos, ou seja, depositou-se nas lâminas apenas solução de boro, com ou sem PAMAM, na expectativa de se observar somente imagens de traços nucleares, danos e defeitos do CR-39.

A figura III.1 apresentam o roteiro seguido, desde o cultivo na micobactérias até a obtenção das imagens neutrongráficas com realização de dopagem após inativação dos micro-organismos.

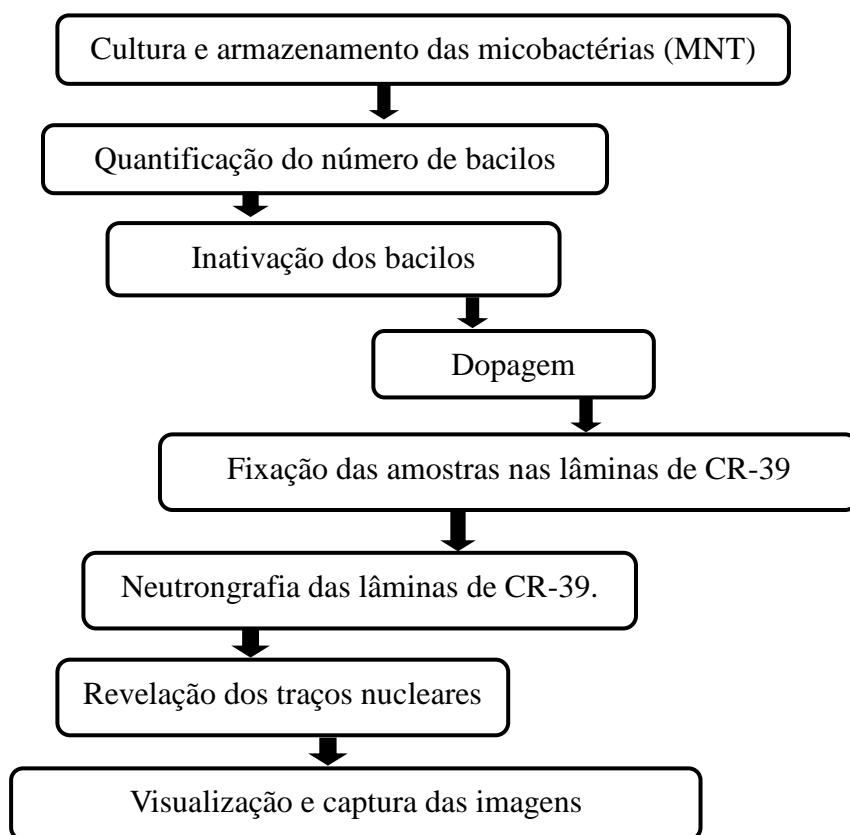


Figura III.1 – Roteiro do procedimento para a obtenção da imagem neutrongráfica de micobactérias com realização de dopagem após inativação dos micro-organismos.

III.1 – Cultura e armazenamento de micobactérias

Utilizaram-se amostras laboratoriais de *M. marinum* (ATCC 927) e *M. fortuitum* (ATCC 6841) do Laboratório de Micobactérias do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes/UFRJ.

Em período característico de cada espécie cultivada, submeteram-se as amostras de MNT numa estufa, à temperatura ótima de crescimento de 37°C, dentro de tubos de ensaios contendo o meio de cultura Lowenstein-Jensen (LJ). Concluído este procedimento, pipetou-se 1,5 ml da solução de H₂O + glicerol a 15% em um tubo de ensaio com pérolas de vidro. Transferiu-se, com espátula de madeira estéril, uma fração da amostra para um tubo de ensaio contendo a solução tampão e as pérolas de vidro. Após agitação, colocou-se o tubo de ensaio em estante para sedimentar. Concluída a sedimentação, transferiu-se 1,0 ml do material contido no tubo de ensaio para um criotubo estéril, sendo este armazenado no freezer à -20 °C.

Além do meio LJ, utilizou-se, em alguns experimentos, o meio de cultivo líquido Middlebrook 7H9; os procedimentos com este meio estão descritos na seção III.7.1.

É importante ressaltar que, todas as manipulações com as micobactérias foram realizadas no interior de um sistema bioprotetor (capela) e de acordo com as normas vigentes de biossegurança.

III.2 – Quantificação do número de bacilos e diluições sucessivas

Preparou-se, após cultura das micobactérias, uma suspensão em água destilada com pérolas de vidro estéril para obter o grau de turvação equivalente ao tubo 1 da escala McFarland, que corresponde a $3,0 \times 10^8$ UFC/ml. Diluiu-se seriadamente esta suspensão bacteriana até $3,0 \times 10^5$ UFC/ml. A figura III.2 apresenta o método das diluições sucessivas.

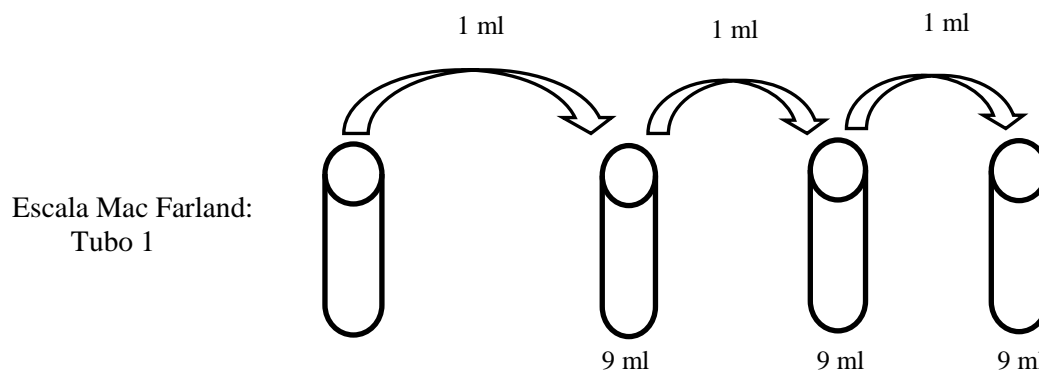


Figura III.2 – Esquema do método de diluições sucessivas do meio contendo a suspensão de micobactéria, na escala McFarland.

III.3 – Método de inativação das micobactérias

As micobactérias foram inativadas, visando erradicar risco de contaminação biológica; com este intuito, dois métodos de inativação foram adotados: o físico e o químico.

No método físico, submeteu-se 5,0 ml das amostras, diluídas até a turvação equivalente a visualizada no tubo 1 da escala McFarland, a uma agitação automática, por 30 segundos. Finalizou-se esta etapa, colocando-se as amostras numa autoclave, a uma temperatura de 121°C, por 60 minutos.

No método químico, após procedimento com o agitador automático, adicionou-se, volume a volume, o agente químico hipoclorito de sódio (cloro livre com concentração de 1% a 2%) com tempo de repouso igual a 60 minutos, em temperatura ambiente; também foi utilizado outro agente esterilizante: o formaldeído (CH₂O). O procedimento consistiu em colocar as amostras sob agitação automática por 30s e deixá-las repousar, em temperatura ambiente, por 60 minutos, após a adição, volume a volume, de 5,0 ml de formaldeído a 10%.

III.4 - Dopagem com ¹⁰B e fixação térmica das micobactérias nas lâminas de CR-39

Iniciou-se a dopagem com ¹⁰B, após a diluição das soluções e a inativação dos bacilos; esse procedimento consiste em: colocar 50 µl da amostra em suspensão, com concentração conhecida, em um microtubo; adicionar 5,0 µl de uma solução contendo 5,0 mg/ml de ¹⁰B (borato de sódio diluído em solução salina 0,9%) e incubar em estufa

a 37°C por 30 minutos. Durante esse período, fixaram-se as lâminas de CR-39 numa placa de alumínio com fita adesiva. Decorrido esse período, depositou-se 5,0 µl da amostra em cada lâmina de CR-39 para se realizar, por 10 minutos, a secagem forçada a 50°C; esta secagem evita a aglutinação dos micro-organismos; a cristalização do agente conversor e, ainda, é muito mais rápida que a secagem natural.

Em alguns experimentos, utilizaram-se duas substâncias para se fixar as micobactérias nas lâminas de CR-39, a saber: caseína a 1% e glutaron.

Após a dopagem com boro e a fixação das MNT nas lâminas, submeteu-se a placa de alumínio contendo as amostras ao feixe neutrônico do canal J-9 do reator Argonauta instalado no Instituto de Engenharia Nuclear (IEN/CNEN). Finalizada a irradiação as lâminas de CR-39 passaram por ataque químico para tornar possível a visualização das imagens num microscópio ótico. As imagens foram capturadas por uma câmara digital e armazenadas no computador. Como os procedimentos de irradiação, ataque químico e visualização foram os mesmos em todos os experimentos, optou-se por descrevê-los nas páginas finais deste capítulo.

III.5 – Procedimentos do uso da caseína para fixar as amostras de *M. marinum*

Manteve-se 0,1 ml da amostra armazenada de *M. marinum* num tubo de LJ, durante 14 dias, a 37°C. Após esse período, adicionou-se 50 µl desta amostra em dois microtubos: adicionou-se no primeiro 50 µl de água destilada e, após agitação, o mesmo foi colocado em autoclave, a uma temperatura de 121°C, por 60 minutos; no segundo, adicionou-se volume a volume, o agente químico hipoclorito de sódio, que, após agitação, foi mantido em repouso, por 60 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida, colocou-se, em cada microtubo, 5,0 µl de caseína e realizou-se agitação automática das amostras usando o Agitador Phoenix - modelo AP-56. Após a centrifugação, depositou-se 5,0 µl da amostra inativada em autoclave sobre a lâmina de CR-39, fixa na placa de alumínio. Realizou-se o mesmo procedimento com a amostra inativada pelo método químico. Incubou-se, a 37°C, cada amostra, por 30 minutos, com 5,0 µl de boro. Em seguida, visando secagem, as lâminas de CR-39 foram colocadas numa estufa, durante 10 minutos, sob a temperatura de 50°C.

III.6 – Procedimentos de uso do glutaraldeído para fixar as amostras de MNT

Após o período de crescimento no meio LJ, colocou-se 5,0 ml da amostra de *M. marinum* num tubo de ensaio. Preparou-se uma solução de 10 ml contendo, volume a volume, formaldeído e glutaraldeído; adicionou-se 5,0 ml desta solução no tubo de ensaio contendo a micobactéria; deixou-o em repouso, por 60 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, realizou-se a agitação automática. Colocou-se 5,0 µl da solução na lâmina de CR-39, duas gotas de glutaraldeído e 5,0 µl de boro; deixou-se em repouso por 30 minutos, a 37°C. Em seguida, aqueceu-se a lâmina fixada na placa de alumínio, por 10 minutos a 50°C.

III.7 – Procedimento para cultivo de *M. fortuitum* utilizando Agar Middlebrook 7H9 base A

Utilizou-se 0,1 ml da amostra de *M. fortuitum* pré-cultivada, à 37°C, por sete dias, no meio de cultura 7H9. Após o cultivo e diluição até $3,0 \times 10^5$ UFC/ml, conforme III.2, iniciou-se a inativação da amostra; colocou-se 50 µl da solução bacteriana num microtubo, contendo a mesma quantidade de formaldeído a 10%. Após agitação automática por 30s, deixou-se a amostra em repouso, em temperatura ambiente, por 60 minutos. Decorrido esse período, realizou-se a dopagem com o conversor, adicionando-se 10 µl de borato de sódio; as temperaturas de incubação utilizadas foram 4°C e 37°C e cada uma delas submetida aos tempos de incubação de: 30, 60 e 120 minutos. Finalizado o processo de dopagem, depositou-se 5,0 µl da amostra em cada lâmina de CR-39, secando-a a 50°C, por 10 minutos.

III.8 – Dopagem durante a fase exponencial

Como foi descrito anteriormente, o roteiro dos procedimentos foi modificado para avaliarmos a influência da dopagem antes e após inativação. A figura III.3 apresentam o roteiro seguido, desde o cultivo das micobactérias até a obtenção das imagens neutrongráficas com realização de dopagem ocorrendo, simultaneamente, com a fase exponencial. Nesse experimento, utilizou-se amostra de *M. fortuitum* crescidas no meio de cultura Agar Middlebrook 7H9.

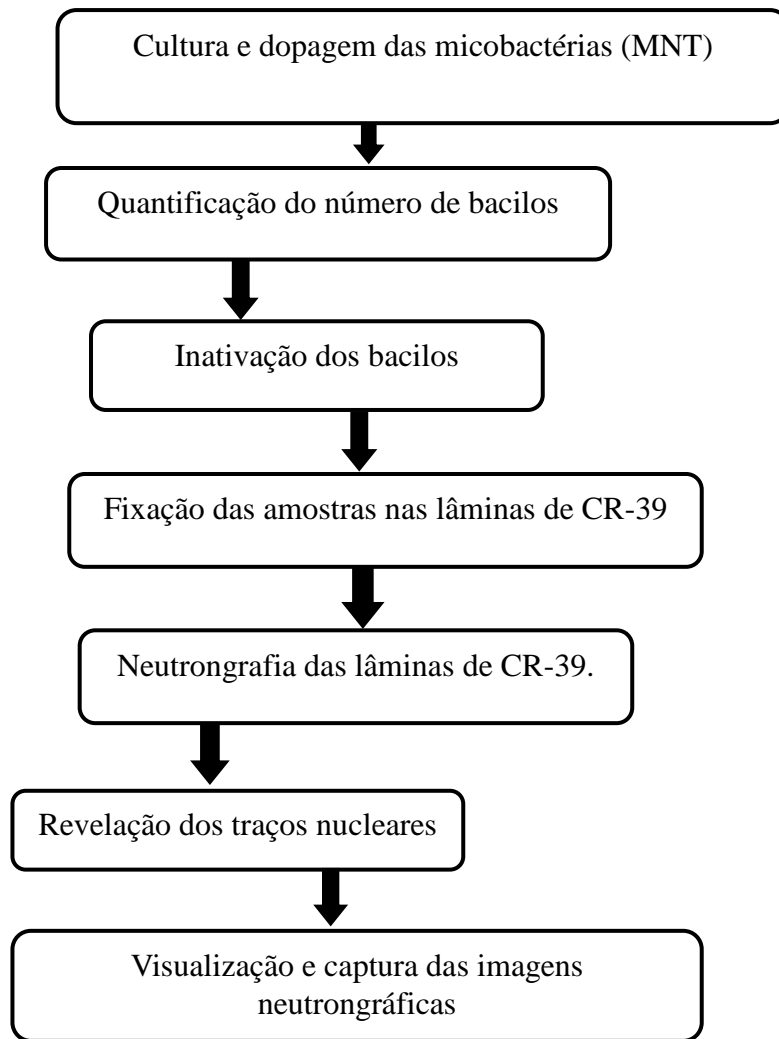


Figura III.3 – Roteiro do procedimento para a obtenção da imagem neutronográfica da *M. fortuitum* com realização de dopagem durante o período de cultura (fase exponencial).

III.8.1 – Procedimento para dopagem de *M. fortuitum* durante cultivo em Agar Middlebrook 7H9 base A

Preparou-se 4 amostras de *M. fortuitum* para crescimento no Agar Middlebrook 7H9 base A (cultivo), submetendo-as a diferentes composições do meio de cultura, apresentados na tabela III.1.

Tabela III.1 – Composição de meio de cultura da *M. fortuitum*.

Cultivo 1	Cultivo 2	Cultivo 3	Cultivo 4
5,0 ml de 7H9	4,0 ml de 7H9	4,0 ml de 7H9	4,0 ml de 7H9
0,1 ml de <i>M. fortuitum</i> .	0,1 ml de <i>M. fortuitum</i>	0,1 ml de <i>M. fortuitum</i>	0,1 ml de <i>M. fortuitum</i>
1,0 ml de Boro	1,0 ml de Boro	1,0 ml de Boro	1,0 ml de Boro
Glicose	Glicose	CFA 0,2 %	Zinco
-----	-----	Glicose	Glicose

Cultivou-se as amostras por 7 dias, em estufa, a 37°C. Concluído o período de crescimento, colocou-se 5,0 µl do cultivo 1 em 100 µl de hipoclorito de sódio num microtubo, mantendo-o em repouso por 30 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, centrifugou-o a 10000 rotações por minutos; retirou-se a solução em suspensão; adicionou-se 100 µl de água destilada e 100 µl de fucsina; aqueceu-se por 5 minutos a 100 °C. Depositou-se 5,0 µl da amostra na lâmina de CR-39, fixou-a em uma placa de alumínio. A seguir, aqueceu-se a placa à 50°C por 10 minutos. Realizou-se este procedimento, concomitantemente, com os demais cultivos. Realizou-se o mesmo experimento, modificando apenas a temperatura de crescimento, neste caso, utilizou-se 30°C.

III.9 – Dendrímeros como carreadores de boro

Considerando que os dendrímeros podem atuar como carreadores e que a interação do agente conversor com as micobactérias é fundamental para a obtenção das imagens neutronográficas, utilizou-se o dendrímero PAMAM de quarta geração (G4) para transportar o boro até os micro-organismos. As etapas desta metodologia estão descritas na figura III.4.

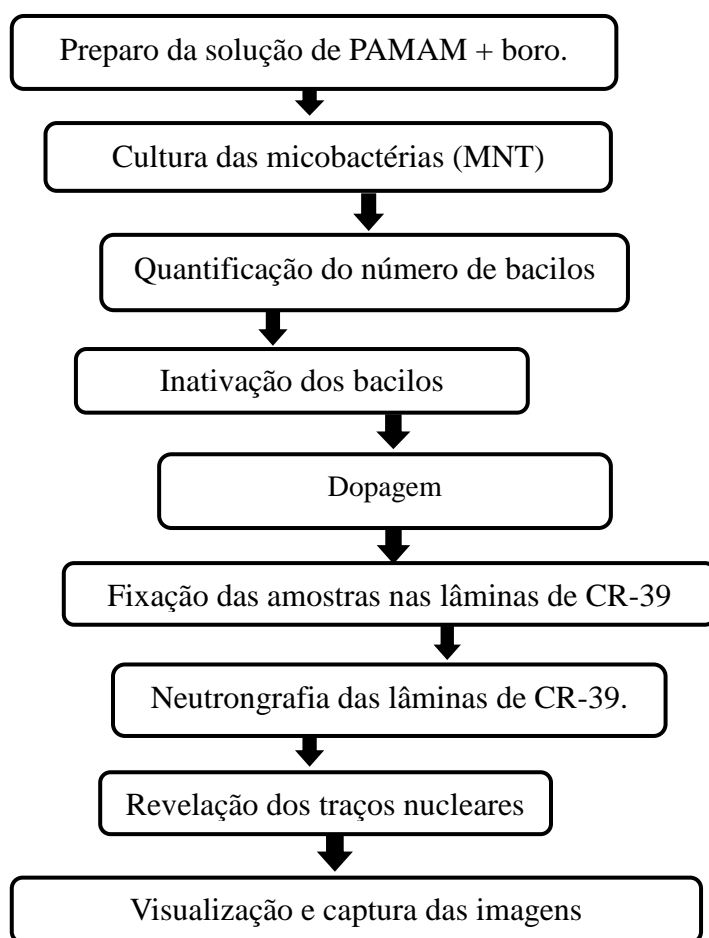


Figura III.4 – Roteiro do procedimento para a obtenção da imagem neutronográfica da *M. fortuitum* utilizando o dendrímero de quarta geração para fazer a dopagem com o boro durante o período de cultura (fase exponencial), ou seja, antes da inativação.

III.9.1 – Preparação da solução de complexo PAMAM G4 com borato de sódio

Dissolveu-se 2,0 mg de borato de sódio em 250 µl de água destilada. Transferiu-se 28,4 µl da solução de PAMAM G4 para um frasco de 3,0 ml com tampa rosqueada e batoque de teflon, retirou-se o metanol a pressão reduzida; em seguida, retornou-se o resíduo em 250 µl de água destilada. Transferiu-se a solução de borato para o frasco contendo a solução de PAMAM e, por 48 horas, manteve-se a solução final em agitação em atmosfera de nitrogênio.

A proporção molar borato de sódio/PAMAM com os valores citados acima é igual a 20:1. Além desta, também foi realizado um procedimento semelhante para obter a proporção 10:1, ou seja, com a metade da concentração de boro; assim, pode-se

avaliar a quantidade de boro necessária para realizar a dopagem utilizando o PAMAM como carreador.

III.9.2 - PAMAM G4 e borato de sódio na dopagem de *M. fortuitum* cultivadas no meio de cultura 7H9

Neste experimento, utilizou-se 0,1 ml da amostra armazenada de *M. fortuitum* cultivada, à 37°C, por sete dias, no meio de cultura 7H9. Após cultivo, preparou-se uma suspensão em água destilada com pérolas de vidro estéril para obter o grau de turvação equivalente ao tubo 1 da escala Mac Farland; em seguida diluiu-se esta suspensão até $3,0 \times 10^5$ UFC/ml.

Colocou-se 50 µl da solução bacteriana num microtubo contendo a mesma quantidade de formaldeído a 10%; após agitação automática por 30 s, deixou-se repousar, em temperatura ambiente, por 60 minutos; decorrido esse período, realizou-se a dopagem adicionando 10 µl da solução de complexo PAMAM G4 com borato de sódio de proporção molar, borato de sódio/PAMAM, igual a 20:1; também foi realizado um procedimento para a proporção 10:1. As temperaturas de incubação utilizadas foram 4°C e 37°C e para cada uma delas os tempos de incubação, em minutos, foram 30, 60 e 120. Finalizada a dopagem, depositou-se 5,0 µl da amostra em cada lâmina de CR-39 para se realizar, por 10 minutos, a secagem forçada a 50°C.

III.9.3 – PAMAM G4 e borato de sódio na dopagem de *M. fortuitum* e *M. marinum* cultivadas no meio de cultura 7H9, CFA 0,2% e Glicose

Manteve-se 0,1 ml de *M. fortuitum* numa cultura idêntica ao cultivo 3 da tabela III.1 por um período de 7 dias a uma temperatura de 37°C. A quantificação do número de bacilos e a inativação foram realizadas com o mesmo procedimento descrito na seção III.9.2; Após inativação, realizou-se a dopagem com as mesmas proporções molares da solução de complexo PAMAM G4 com borato de sódio utilizadas no procedimento anterior, ou seja, 10:1 e 20:1. As temperaturas de incubação utilizadas foram 30°C e 37°C num período de 30 minutos. Após a dopagem, depositou-se 5,0 µl da amostra em cada lâmina de CR-39 e a secagem foi realizada, por 10 minutos, a 50°C.

Considerando o período e a temperatura de cultivo específicos de cada micobactéria, repetiu-se esse procedimento trocando a *M. fortuitum* pela *M. marinum*.

III.10 – Ensaios neutrongráficos

Para a realização das neutrongrafias utilizou-se o arranjo experimental instalado no reator Argonauta do IEN/CNEN. O arranjo neutrongráfico, as condições e o tempo de irradiação serão descritos nas próximas seções.

III.10.1 – Arranjo neutrongráfico

Dois cilindros concêntricos de alumínio compõem o núcleo do reator Argonauta/IEN/CNEN. A coluna térmica interna é formada pela grafita que preenche o interior do cilindro de menor diâmetro, sendo este mais conhecido como tanque interno. Nesta coluna térmica encontram-se cinco orifícios com o objetivo de possibilitar medidas experimentais. A região de combustível onde ficam as placas de elemento combustível está localizada na coroa formada pelos cilindros. Os refletores, interno e externo, são compostos, respectivamente, por cunhas e blocos de grafita nuclearmente pura. A figura III.5 mostra o núcleo do reator Argonauta.

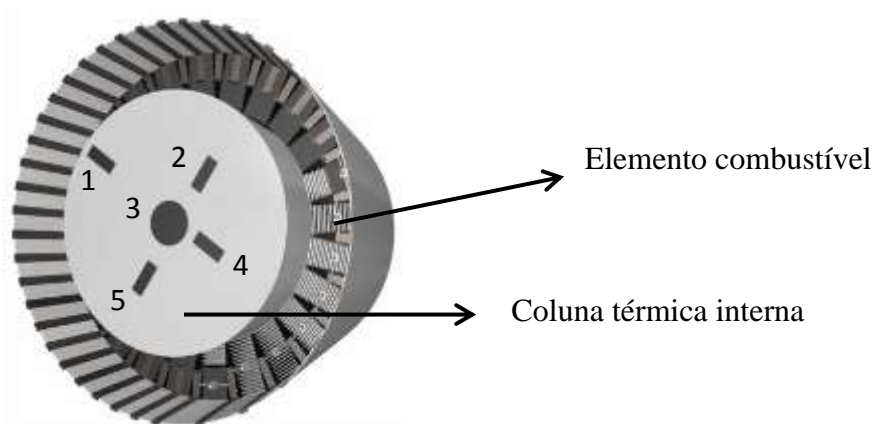


Figura III.5 – Representação do núcleo do reator Argonauta/IEN/CNEN. Os cinco orifícios possibilitam as medidas experimentais.

O arranjo experimental foi instalado no canal de irradiação principal, chamado de J-9, localizado na coluna térmica externa que se encontra na parte frontal do reator Argonauta. O J-9 possui a maior intensidade de fluxo de nêutrons uma vez que alcança o tanque de alumínio externo, à meia altura dos elementos combustíveis. Na figura III.6

é possível visualizar os componentes essenciais para a obtenção do feixe de nêutrons térmicos que existem na parte interna do canal J-9.

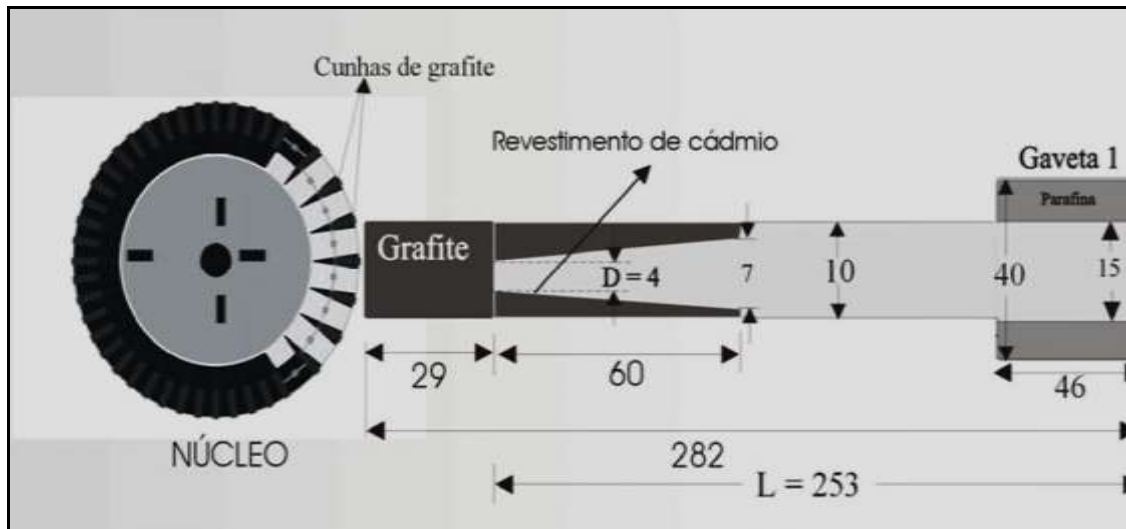


Figura III.6 – Esquema do interior do canal de irradiação J-9 instalado no reator Argonauta – medidas em cm. (SILVANI, 2001).

Encontra-se acoplado ao moderador, de grafita nuclearmente pura, um colimador divergente construído com placas de grafita, com uma moldura de alumínio, em forma de um tronco de pirâmide quadrangular; cujas dimensões são: 60 cm de comprimento, 16 cm² e 49 cm² de áreas seccionais; o colimador tem divergência angular muito pequena e é parcialmente revestido com cádmio na borda mais externa. Além do alinhamento do feixe de nêutrons térmicos, a configuração apresentada assegura uma boa resolução neutrongráfica. Com o objetivo de melhorar o alinhamento do feixe neutrônico no plano de imagem existem, na saída do canal J-9, um colimador de geometria cilíndrica moldado com grafita e encamisado com alumínio e uma gaveta na saída do canal de irradiação J-9.

A placa de alumínio, contendo as amostras de micobactérias dopadas com boro e fixadas nas lâminas de CR-39, foi exposta ao feixe neutrônico térmico provindo do canal de irradiação J-9, conforme ilustra a figura III.7.

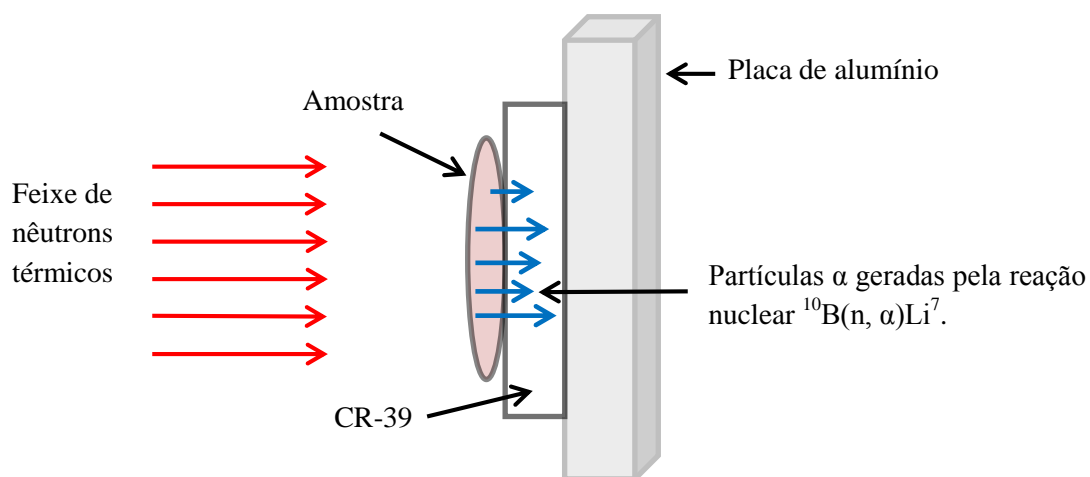


Figura III.7 Representação da montagem experimental da irradiação da amostra depositada no CR-39 que se encontra fixado na placa de alumínio.

III.10.2 – Condições de irradiação

O reator Argonauta foi mantido no estado de criticalidade e com potência nominal de 340 W em todos os ensaios neutrongráficos. As características do feixe neutrônico provindo do núcleo encontram-se listadas na tabela III.2.

Tabela III.2 – Características do feixe de nêutrons provindos do reator Argonauta (CRISPIM & SILVA, 1996).

ENERGIA MÉDIA (meV)	FLUXO DE NÊUTRONS TÉRMICO (n.cm ² .s ⁻¹)	RAZÃO DE COLIMAÇÃO (L/D)	RAZÃO n/γ (n.cm ² .mrem ⁻¹)
30	4,46x10 ⁵	70	3,0x10 ⁶

III.10.3 – Tempo de irradiação

O tempo de irradiação ou tempo de exposição da amostra (TE) foi determinado após análise da curva característica do detector de traços CR-39 (WACHA, 1999). De acordo com os dados apresentados na figura III.8 a curva característica do filme se divide em três diferentes regiões: a região 1 apresenta uma contagem reduzida de traços indicando uma baixa interação dos nêutrons com o agente conversor; a região 3 é caracterizada pela saturação no número de traços; a região 2, localizada no intervalo de 15 a 32 minutos, é a única que exibe uma linearidade de resposta e, conseqüentemente, é a mais indicada para a operação.

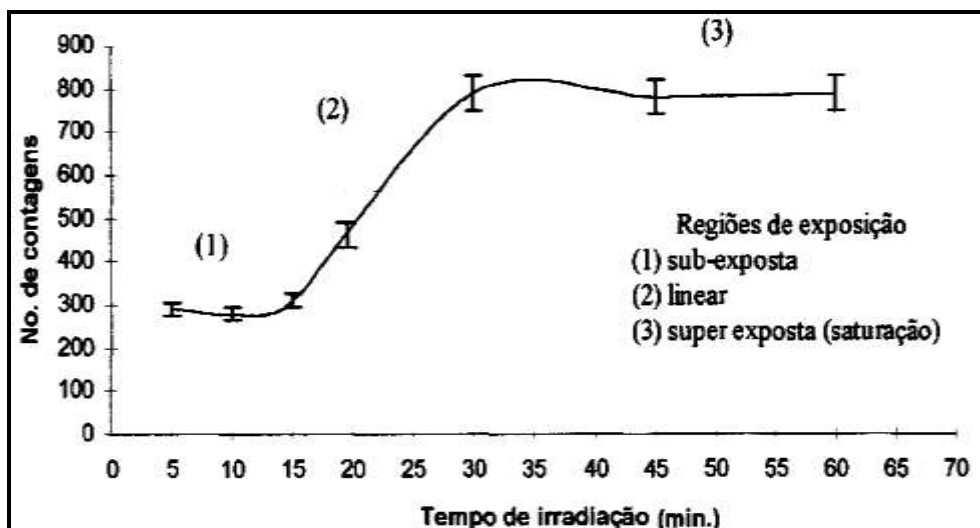


Figura III.8 - Curva característica do detector de traços CR-39 (WACHA, 1999).

Adotou-se o tempo de irradiação igual a 30 minutos visando a eficiência na detecção dos micro-organismos e a facilidade de medição.

III.11 – Revelação dos traços nucleares registrados nas lâminas de CR-39

Como as partículas α originadas da reação nuclear $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$ produzem danos (traços) da ordem de 50 - 100 Å (angstrom) nos detectores sólidos de traços nucleares foi necessário revelá-los utilizando-se tratamento químico adequado, de forma a ampliá-los, tornando-os visíveis num microscópio óptico comum.

Finalizada a irradiação, realizou-se o tratamento químico que consiste em mergulhar as lâminas de CR-39 em tubos de ensaio contendo solução de NaOH, a 6,25 N, submetendo-os, por 1 hora, a um banho termoestatizado à 90°C; neste processo as regiões danificadas são degradadas mais rapidamente que aquelas onde o material não foi danificado; além disso, os íons formados ao redor do traço latente são removidos encerrando a reação de recombinação dos mesmos.

Escolheu-se o tempo (TR) e a temperatura (T) de revelação, respectivamente, iguais a 1 hora e 90°C, visando obter as melhores condições de revelação: traços com geometria adequada e menor tempo possível de revelação (WACHA, 1999). Todo este processo confere a imagem obtida (traços revelados) uma conservação por tempo indeterminado.

Para cessar o processo de revelação, entornou-se o revelador dos tubos, lavando-os em água corrente; em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente destilada

para a remoção de impurezas que pudessem interferir na análise das imagens neutronográficas das MNT registradas no CR-39. Em seguida, secaram-se as lâminas de CR-39 com o auxílio de um secador de cabelo.

III.12 – Visualização e captura das imagens neutronográficas num microscópio óptico acoplado a uma câmara CCD.

Para a visualização das imagens neutronográficas das micobactérias registradas pelo CR-39, utilizou-se o microscópio óptico de transmissão, Nikon E400, alinhado para a iluminação de Köhler, e acoplado a uma ocular de 10x e objetiva de 40x. Acoplou-se ao microscópio uma câmara digital Coolpix 995 da Nikon, para se obter as imagens digitais. Além da ampliação fornecida pelo microscópio óptico, utilizou-se também o zoom da câmara digital, o que permitiu uma ampliação, máxima, de 4 vezes.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A visualização dos micro-organismos pode ser realizada, utilizando-se um microscópio óptico ou um microscópio eletrônico. Em geral, microscópios ópticos, cujo limite de resolução é de aproximadamente $0,2 \mu\text{m}$, são utilizados na observação de células intactas, enquanto os eletrônicos são indicados para se observar as estruturas internas ou detalhes das superfícies celulares. Outra grande diferença entre os microscópios eletrônicos e os ópticos está na forma de apresentação da imagem: no primeiro, a imagem é tridimensional e, no segundo, bidimensional.

Neste trabalho, as imagens foram obtidas com o auxílio de um microscópio óptico cujas lentes, ocular e objetiva, com um aumento de 10x e 40x, respectivamente. O zoom da câmera digital Coolpix 995 variou conforme o tamanho e a visibilidade requerida da imagem. É importante destacar que as imagens registradas foram ampliadas em 1000x, devido ao processo de revelação dos traços nucleares por ataque químico e é este o motivo pelo qual se pode visualizar as imagens por microscopia óptica.

As imagens neutrongráficas, registradas nas lâminas de CR-39 e observadas por microscopia óptica, apresentaram, além dos micro-organismos, danos ou defeitos do detector. O processo de fabricação, o transporte e o manuseio em laboratório podem ser as causas dos defeitos ou danos encontrados nas lâminas de CR-39. Para evitar que tais danos sejam confundidos com as imagens das micobactérias, realizou-se ensaios neutrongráficos com lâminas virgens, após submetê-las aos mesmos procedimentos utilizados com as lâminas contendo Micobactérias Não Tuberculosas, ou seja, dopagem com boro, irradiação por nêutrons térmicos, revelação química e captura da imagem neutrongráfica. A figura IV.1 apresenta imagens de defeitos ou danos observados nas lâminas virgens de CR-39.

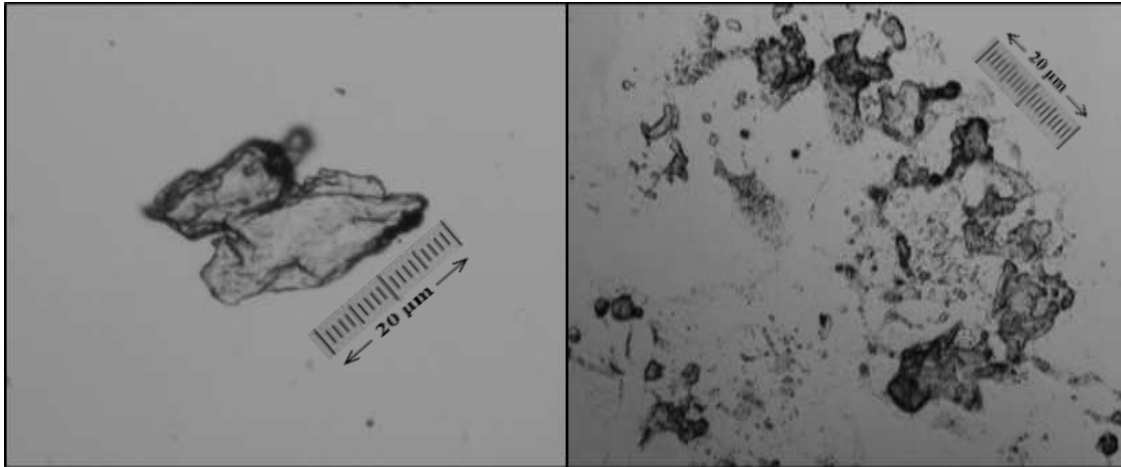


Figura IV.1 – Imagens bidimensionais de defeitos ou danos na superfície do CR-39 devido ao processo de fabricação, transporte ou manuseio no laboratório.

A reação $^{10}\text{B}(n, \alpha)^7\text{Li}$ gera partículas alfa e íons de Li que também provocam danos na superfície do CR-39, que têm, entretanto, formas características, uma vez que resultam da penetração delas no detector, em função da energia e da inclinação de incidência. A imagem bidimensional dos danos (traços nucleares) têm as formas circular ou elíptica, características das incidências delas sobre o CR-39: normal ou oblíqua, respectivamente, conforme descrito na seção II.2.7. A figura IV.2 ilustra traços de partículas alfa, produtos da reação nuclear $^{10}\text{B}(n, \alpha)^7\text{Li}$ decorrentes de incidências normais ou oblíquas.

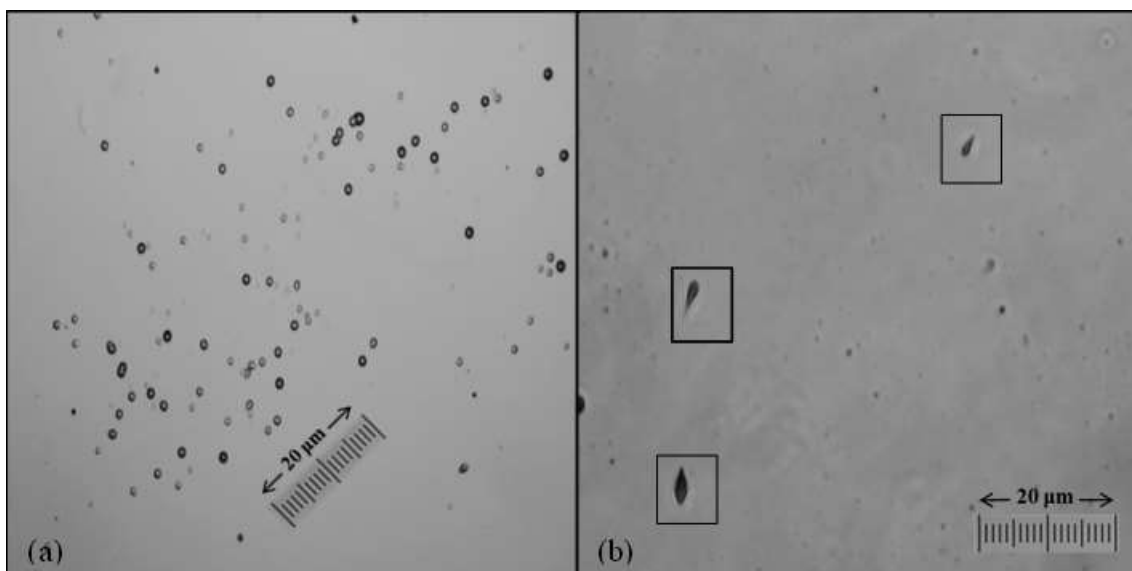


Figura IV.2 – Imagens de traços de partículas alfa, produto da reação $^{10}\text{B}(n, \alpha)^7\text{Li}$ registrados no detector sólido de traços nucleares, CR-39: a) Imagens de traços circulares; b) Imagens de traços elípticos.

As irradiações das lâminas de CR-39 desprovidas de micobactérias permitiram se distinguir as imagens neutronográficas dos defeitos ou danos no CR-39, decorrentes do processo de fabricação, transporte e manuseio em laboratório, vistas na figura IV.1, daquelas relacionadas aos traços latentes provenientes das ionizações causadas pelas partículas α , originadas das reações $^{10}\text{B} (n,\alpha)^7\text{Li}$, no CR-39, observadas na figura IV.2. Os resultados dos experimentos utilizando *M. marinum* (ATCC 927) e *M. fortuitum* (ATCC 6841) serão apresentados nas próximas seções.

IV.1 – Dopagem de *M. marinum* após inativação

Para se evitar a contaminação biológica, durante a preparação dos experimentos, as micobactérias foram inativadas, conforme citado no item III.3. Inicialmente, utilizaram-se dois métodos: físico e químico. É importante ressaltar que, independente do método, os protocolos de irradiação, revelação química e captura de imagem, descritos nos itens III.10, III.11 e III.12, respectivamente, foram mantidos; entretanto, variou-se, em alguns experimentos, a ordem da dopagem. O processo de dopagem foi realizado após a inativação ou durante o cultivo dos micro-organismos.

No primeiro experimento, utilizou-se amostra de *M. marinum* cultivada, durante 14 dias, em meio L.J. e inativada pelos dois métodos de inativação. Após essas etapas, realizou-se a dopagem com 5,0 μl de uma solução contendo 5,0 mg/ml de ^{10}B . Os protocolos de inativação e dopagem foram descritos, respectivamente, nos itens III.3 e III.4.

No método físico, a amostra de *M. marinum* foi colocada em autoclave, a uma temperatura de 121°C, por 60 minutos. A figura IV.3 ilustra imagens capturadas pela câmera digital Coolpix 995 da Nikon.

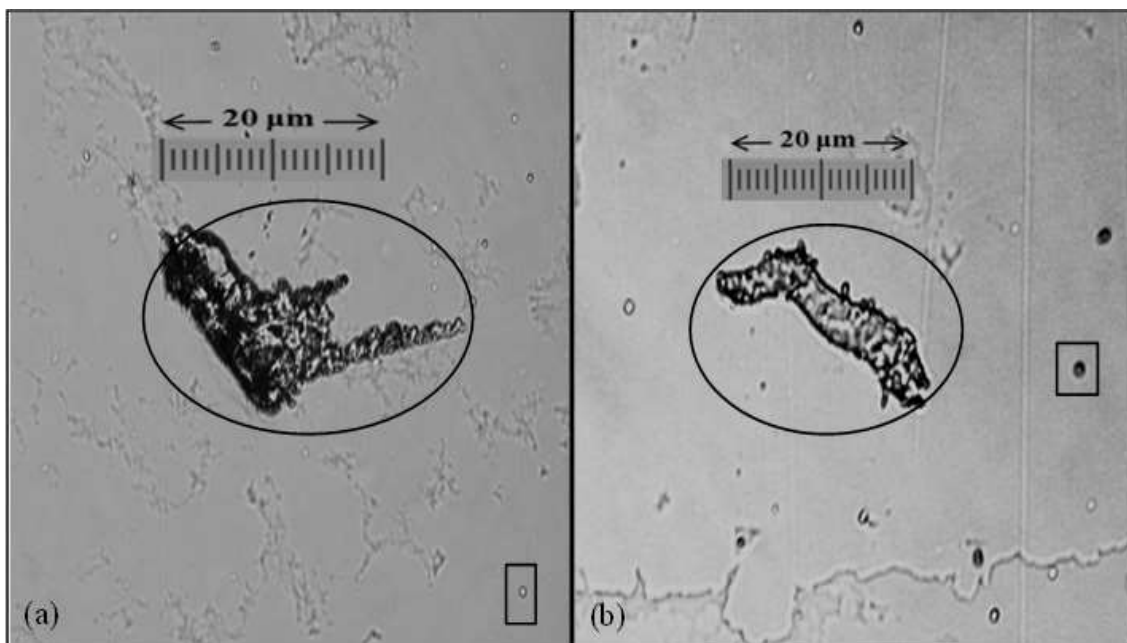


Figura IV.3 – Imagens neutrongráficas obtidas, após utilização do método físico para inativação da *M. marinum*. As figuras (a) e (b) mostram as imagens de danos, destacados com elipses, e traços de partículas α presentes nas lâminas, destacados com quadrados.

No primeiro ensaio com micobactérias, figura IV.3, não foi possível visualizar imagens semelhantes a bacilos isolados ou aglomerados; uma das possíveis causas pode ser a incorreta realização do ataque químico e da lavagem com água dos CR-39, pois, nas figura IV.3 (a) e (b), é possível se observar manchas semelhantes as encontradas em plásticos ou vidros com resíduo de água ou outro líquido transparente.

No segundo método, utilizaram-se duas substâncias esterilizantes: hipoclorito de sódio e formaldeído (CH_2O). Nesse procedimento, após a adição dos agentes esterilizantes, as amostras permaneceram em repouso por 60 minutos à temperatura ambiente, conforme item III.3. Na figura IV.4, estão as imagens resultantes, após a inativação da *M. marinum* pelo método químico.

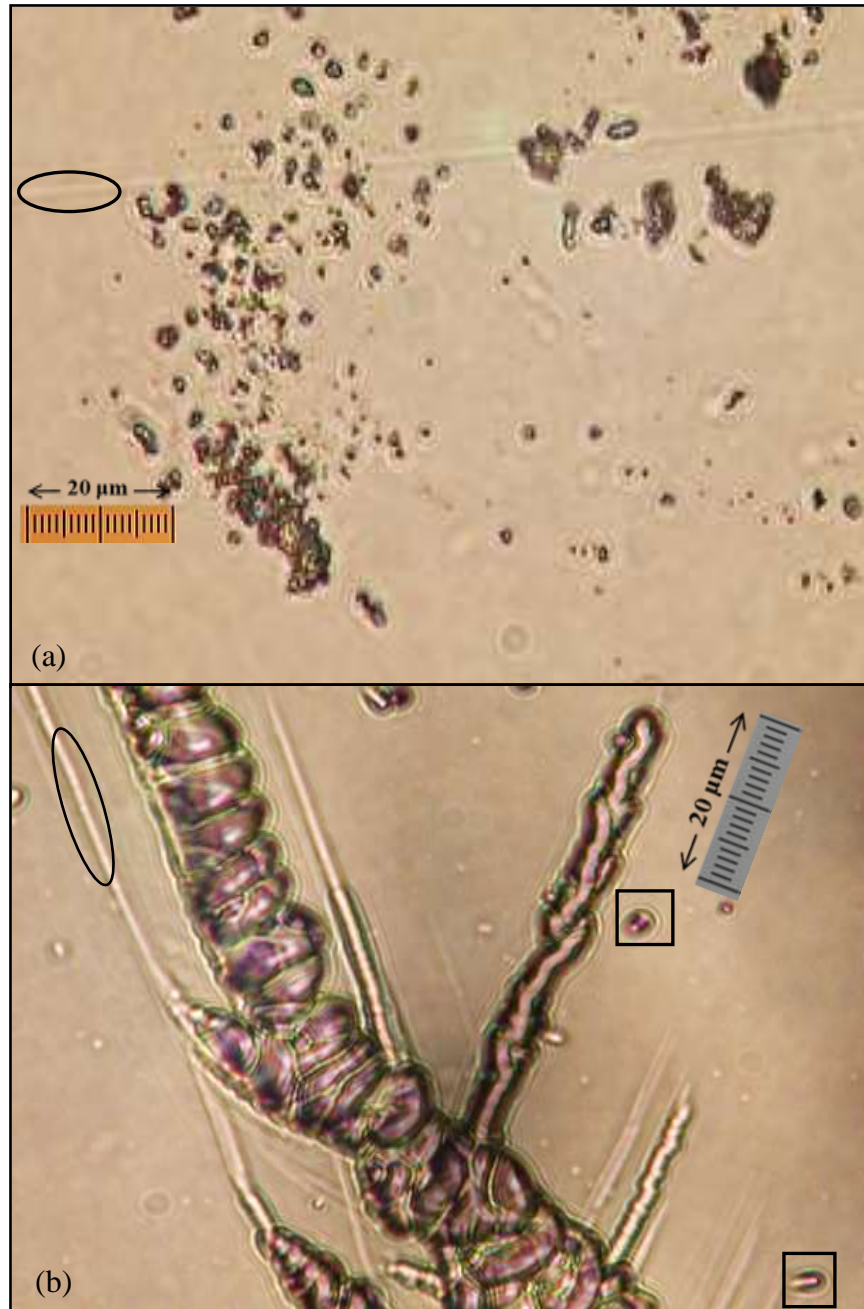


Figura IV.4 – Imagens neutrongráficas obtidas após utilização do método químico, utilizando hipoclorito de sódio e formaldeído, figuras (a) e (b), respectivamente, para inativação da *M. marinum*. Nas duas imagens são visualizados danos, destacados com elipses, e traços de partículas α presentes nas lâminas, destacados com quadrados.

Analisando-se as figuras IV.4 (a) e IV.4 (b), observaram-se a ausência de manchas semelhantes às encontradas na figura IV.3, uma vez que foram tomados os devidos cuidados na realização do ataque químico e na lavagem das lâminas. Na figura IV.4 (a),

resultante do processo de inativação pelo uso do hipoclorito de sódio, observam-se possíveis fragmentos internos das *M. marinum*; a visualização destes fragmentos

ou seja, este agente esterilizante pode ter ocasionado o lise da membrana e da parede celular das micobactérias; A imagem vista na IV.4 (b) foi a única que registrou um aglomerado de micobactérias, entretanto, nenhuma conclusão pode ser tirada quanto à relação entre o número de bacilos na imagem obtida e o depositado de *M. marinum* na lâmina de CR-39.

Objetivando-se realizar ensaios neutrongráficos que resultassem em imagens com características de bacilos isolados ou aglomerados, adicionaram-se substâncias às suspensões das MNT. As substâncias selecionadas foram: glutaron, caseína a 1%, fucsina fenicada a 0,3%, Citrato de Ferro Amoniacal (CFA - $C_6H_{11}FeNO_7$) a 0,2%, glicose 0,2% e Zinco em pó. A adição dessas substâncias poderia resultar em: melhor fixação dos micro-organismos nas lâminas do CR-39; desgrumes dos bacilos; coloração das micobactérias; aumento no número de bacilos nas imagens neutrongráficas; maior absorção ou adsorção do boro. Além disso, o tubo 1 da escala de McFarland foi utilizado como referência em todos os experimentos. As amostras de MNT foram diluídas a uma concentração de $3,0 \times 10^5$ bacilos/ml. Considerando que se depositou 5,0 μ l de suspensão da amostra em cada lâmina de CR-39, esperava-se encontrar 1500 bacilos nas imagens capturadas pela câmera digital Coolpix 995. É importante salientar que o período de incubação, irradiação e revelação, assim como a concentração do boro, a adição de substâncias e a micobactéria em estudo, interferem significativamente no número de bacilos visualizados.

Como se utilizou duas espécies de MNT: *M. marinum* e a *M. fortuitum*, as imagens resultantes em cada ensaio realizado serão analisadas separadamente.

IV.2 – Caseína como fixador de *M. marinum*

Considerando que a *M. marinum* é classificada como micobactéria de crescimento lento, seu cultivo ocorreu num período de 14 dias, no meio de cultura Lowenstein-Jensen (LJ).

Nas figuras IV.5 e IV.6, observam-se imagens neutrongráficas de *M. marinum* inativadas, respectivamente, em autoclave e com o agente esterilizante hipoclorito de sódio, tendo sido usados: boro para dopagem e caseína para fixar as micobactérias nas

lâminas de CR-39, conforme descrito no item III.5. Além dos bacilos, também foram observados traços nucleares espúrios.

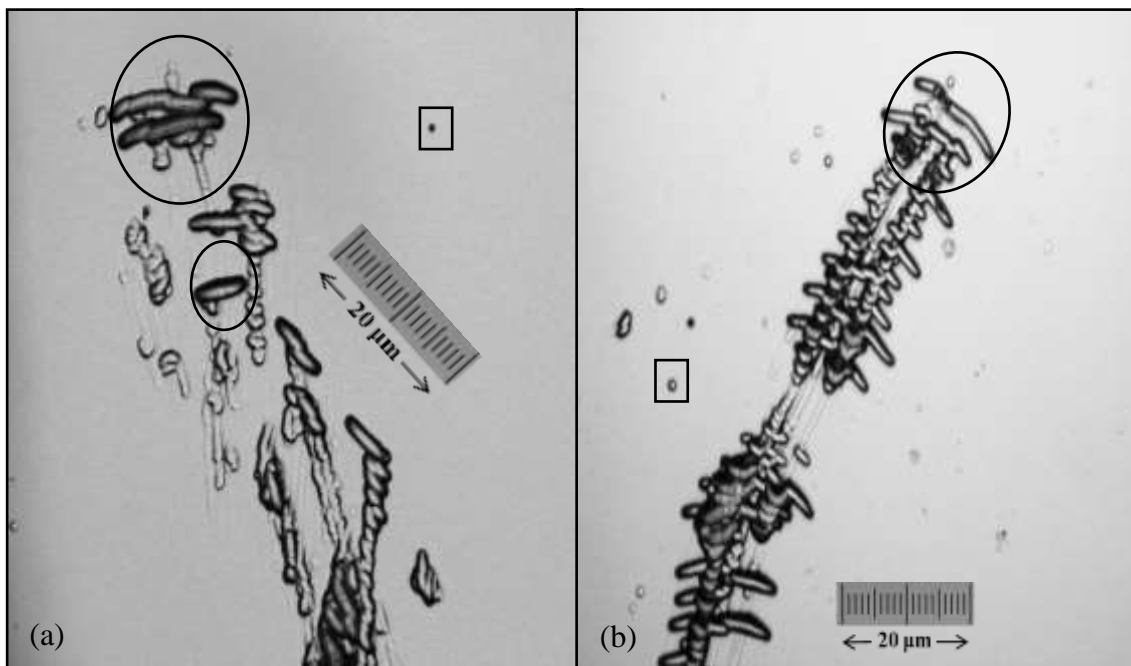


Figura IV.5 - Caracterização morfológica por Neutronografia de *M. marinum*, inativadas por autoclave e fixadas na lâmina de CR-39 com caseína. Os destaques circulares representam bacilos e os quadrangulares, traços nucleares isolados.

A utilização da caseína como fixador proporcionou imagens de *M. marinum* aglomeradas sem uma orientação preferencial, entretanto, analisando as figuras IV.5 e IV.6 é possível se observar bacilos com contornos bem melhor definidos. Além disso, apesar de não ser possível contar, o número de bacilos visualizados foi maior.

A imagem IV.6(b) foi ampliada para melhor visualização dos contornos dos bacilos.

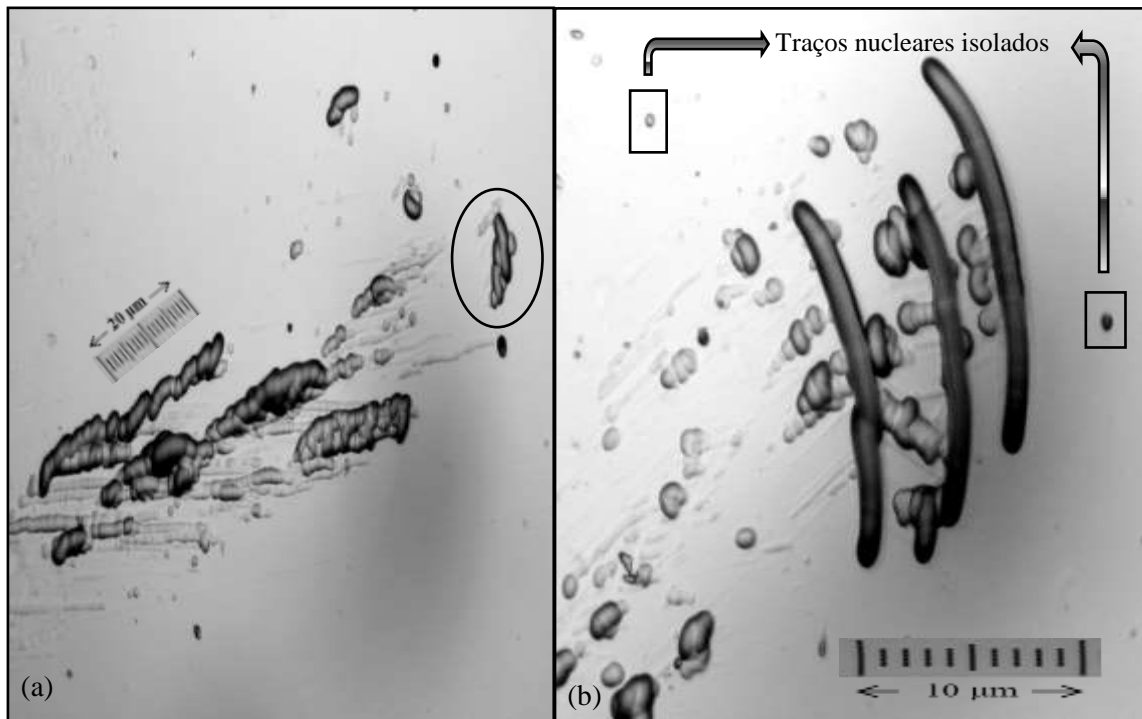


Figura IV.6 - Caracterização morfológica de *M. marinum*, quando submetida à ação de hipoclorito de sódio e caseína, por imagem neutronográfica. Na figura (a) o destaque circular representa aglomerações de bacilos, enquanto que na (b) os destaques retangulares referem-se aos traços nucleares isolados.

IV.3 – Formaldeído como fixador de *M. marinum*

Neste procedimento, o Formaldeído foi utilizado na fixação das micobactérias nas lâminas de CR-39, assim como, na inativação, atuando com o Glutaraldeído, conforme descrito na seção III.6. Na figura IV.7, observam-se imagens neutronográficas de aglomerados de *M. marinum*.

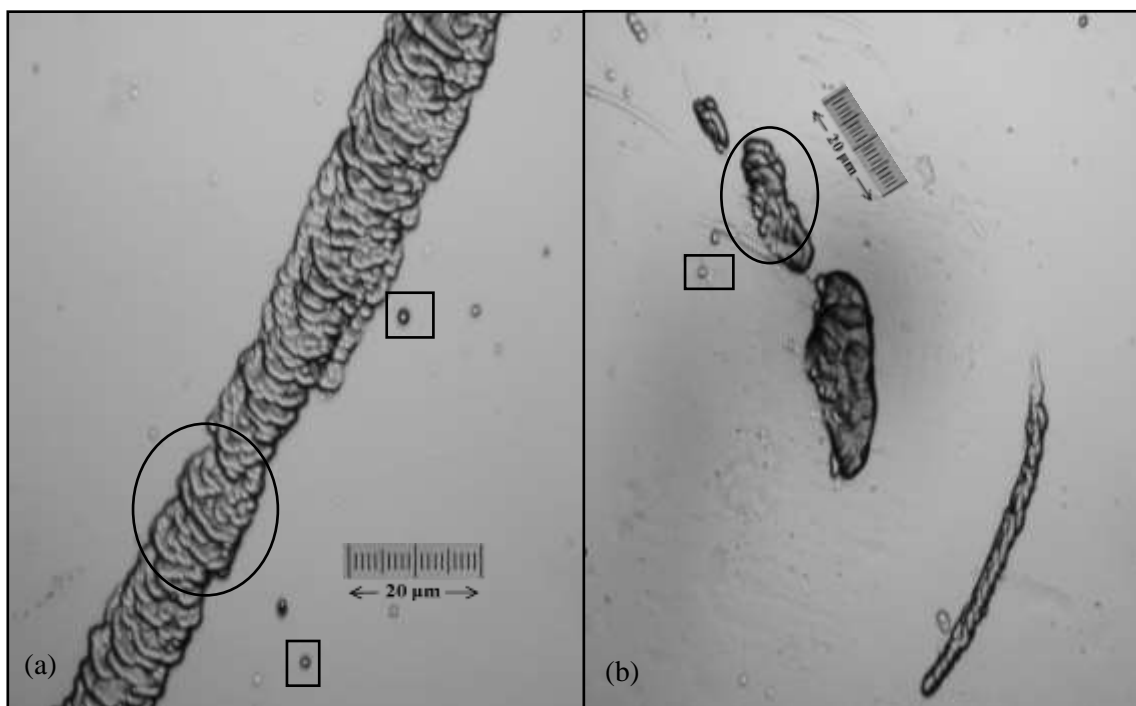


Figura IV.7 - Caracterização morfológica de *M. marinum*, quando submetida à ação de glutaron e formaldeído, por imagem neutronográfica. Nas figuras (a) e (b) os destaques circulares representam os aglomerados de bacilos e os retangulares são imagens de traços nucleares.

Na figura IV.7, são vistos bacilos muito agrupados. As imagens, embora não sejam tridimensionais, indicam que as micobactérias podem estar sobrepostas. Além disso, diferentemente das figuras IV.5 e IV.6, os contornos das micobactérias não ficaram bem definidos. As imagens neutronográficas obtidas das amostras *M. marinum* mostradas nas figuras IV.5, IV.6 e IV.7, respectivamente, têm características morfológicas bem diferenciadas das observadas na figura IV.1, nas quais se depositou apenas o boro, sendo mantidas as condições de irradiação, revelação química e captura de imagens.

As imagens neutronográficas das *M. marinum* resultaram bem semelhantes às encontradas na literatura, onde são definidas como micro-organismos retos ou ligeiramente curvos que apresentam forma bacilar. Essas características ficam ainda mais evidentes, quando se obtém uma imagem tridimensional por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), conforme a disposta na figura IV.8(b).

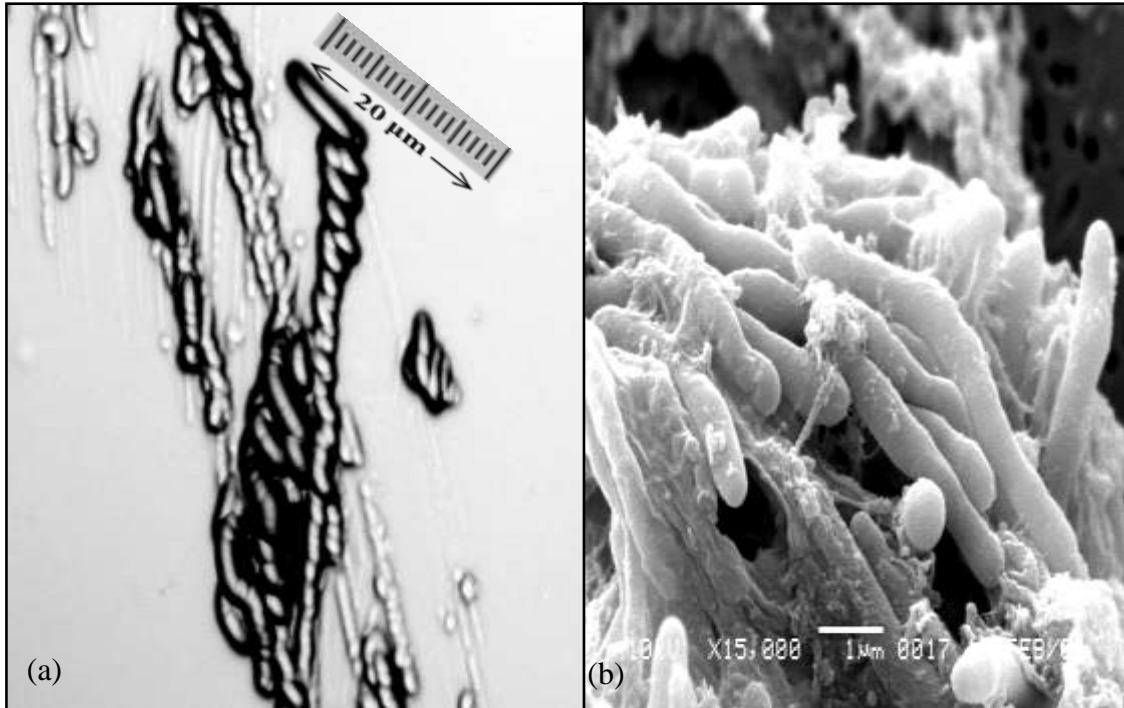


Figura IV.8 – Aglomerados de *M. marinum* visualizadas por: (a) Microscopia Óptica; (b) Microscopia Eletrônica de Varredura [http://www.laurentian.ca/Laurentian/Home/Departments/Biology/Photo+Gallery/htms/microbiology/M.marinum2.htm?Laurentian_Lang=en-CA]

Comparando-se as figuras IV.8(a) e IV.8(b) nota-se que as imagens neutrongráficas de bacilos, observadas num microscópio óptico, se assemelham às visualizadas por MEV.

IV.4 – Dopagem após inativação de *M. fortuitum* cultivadas em Agar Middlebrook 7H9 base A

Neste experimento, utilizou-se somente o borato de sódio para a dopagem dos bacilos. A expectativa era de se observar cerca de 1000 micobactérias em cada lâmina de CR-39. Para se avaliar a influência da temperatura e do tempo de incubação, utilizaram-se os valores de 4°C e 37°C e 30, 60 e 120 minutos, respectivamente.

Na figura IV.9, assinalam-se as imagens neutrongráficas das *M. fortuitum*, após dopagem com borato de sódio a 4°C.

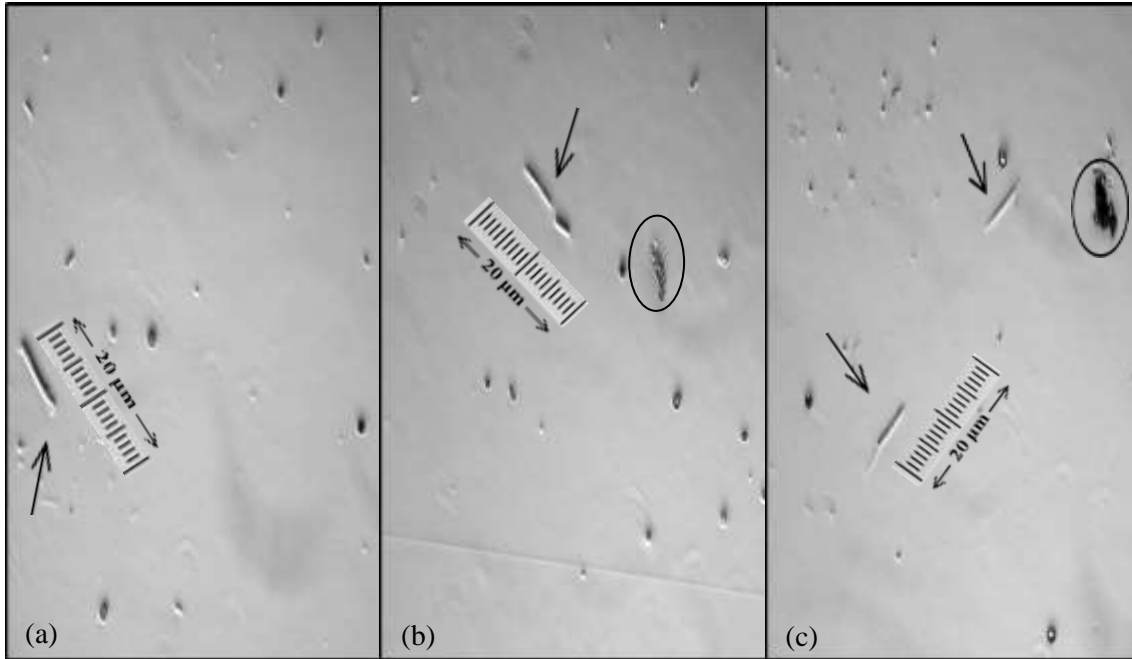


Figura IV.9 – Imagens de *M. fortuitum* depositadas no CR-39, dopadas com 10 µl de borato de sódio e incubadas na temperatura de 4°C, em tempos variáveis: (a) 30 minutos, (b) 60 minutos e (c) 120 minutos. As setas indicam bacilos isolados e os círculos, danos ou defeitos no CR-39.

As imagens da figura IV.9 apresentam estruturas morfológicamente semelhantes às de bacilos, mas numa quantidade menor que a esperada, provavelmente, porque a temperatura de incubação não favoreceu a dopagem dos micro-organismos com o boro.

As imagens neutronográficas decorrentes da dopagem com borato de sódio a 37°C, nos intervalos de tempo iguais a 30, 60 e 120 minutos, estão apresentadas na figura IV.10.

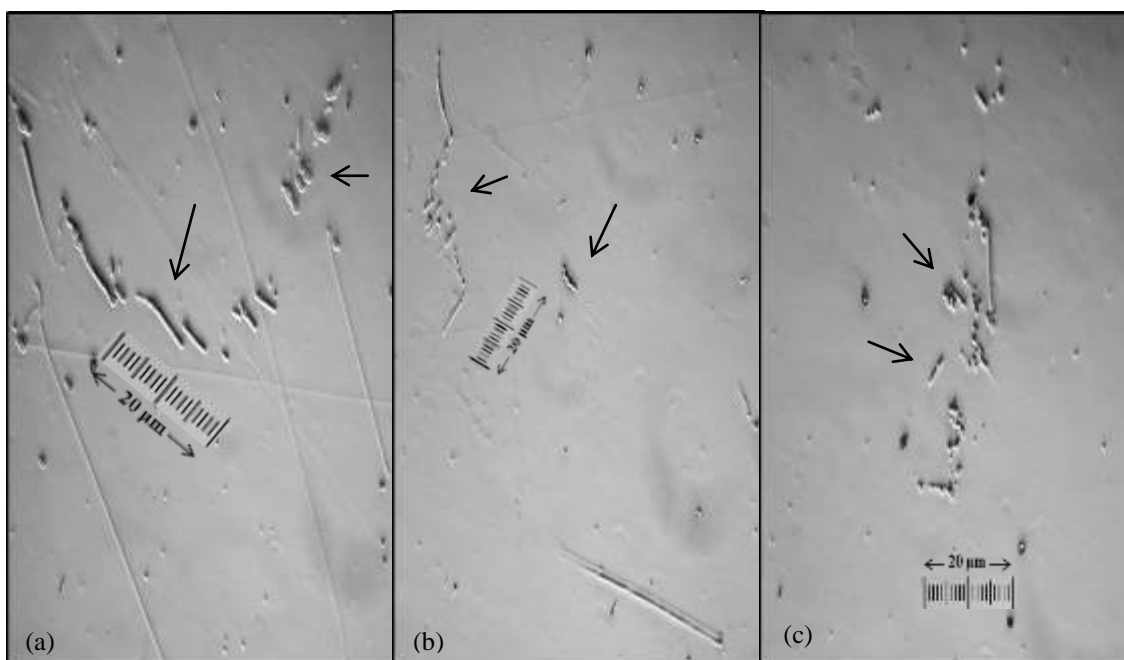


Figura IV.10 – Imagens de *M. fortuitum* depositadas no CR-39, dopadas com 10 μ l de borato de sódio e incubadas na temperatura de 37°C, em diferentes tempos de incubação: (a) 30 minutos, (b) 60 minutos e (c) 120 minutos. As setas destacam alguns bacilos isolados ou aglomerados.

Nas imagens neutrográficas das *M. fortuitum* dopadas, a 37°C, com borato de sódio, nos três intervalos de tempo: 30, 60 e 120 minutos, mostram um número de bacilos superior ao encontrado na figura IV.9, quando os micro-organismos foram dopados a 4°C, mantidos os demais parâmetros. Na figura IV.10, é possível se visualizar bacilos isolados ou aglomerados, enquanto que, na figura IV.9, foram observados apenas um ou dois bacilos isolados.

IV.5 - Dopagem durante o cultivo de *M. fortuitum* utilizando Agar Middlebrook 7H9 base A

O experimento com a *M. fortuitum* foi dividido em quatro ensaios distintos, descritos na tabela III.1. Para a inativação das micobactérias, utilizou-se hipoclorito de sódio e, na expectativa de se observar imagens de bacilos corados, adicionou-se fucsina fenicada. É importante ressaltar que, para todos os ensaios, o tempo de cultura foi de 7 dias. Para facilitar a compreensão, os resultados de cada cultivo serão apresentados separadamente.

a) Cultivo 1: adição de boro e glicose ao meio de cultura, 7H9

As figuras IV.11 e IV.12 apresentam as imagens neutrongráficas das *M. fortuitum* registradas nas lâminas de CR-39, quando submetidas ao cultivo 1 e crescidas a 30°C e 37°C, respectivamente.

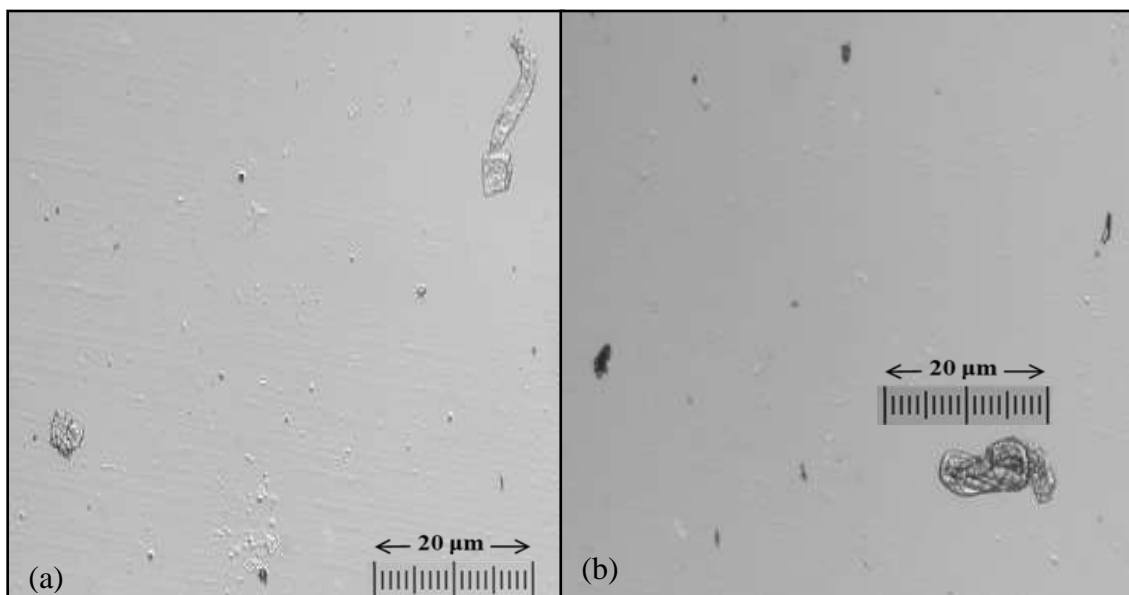


Figura IV.11 – Imagens neutrongráficas obtidas com amostra contendo *M. fortuitum* crescidas no meio 7H9 com boro e glicose, a 30°C, durante 7 dias e inativadas com hipoclorito de sódio. As figuras (a) e (b) apresentam apenas defeitos ou danos das lâminas do CR-39 e traços nucleares.

Nas figuras IV.11 (a) e (b), as imagens registradas não apresentaram a forma de bacilos, mas, sim, de defeitos de fabricação ou danos causados pelo manuseio do CR-39. Esse resultado era esperado, uma vez que a temperatura utilizada não é a mais indicada para o crescimento, em laboratório, da *M. fortuitum*, conforme descrito no item II.7. Entretanto, na figura IV.12, são vistas imagens neutrongráficas características de bacilos da *M. fortuitum*. Registra-se também a formação alinhada dos bacilos, “orientados” sob uma direção preferencial, semelhante a um comportamento padronizado.

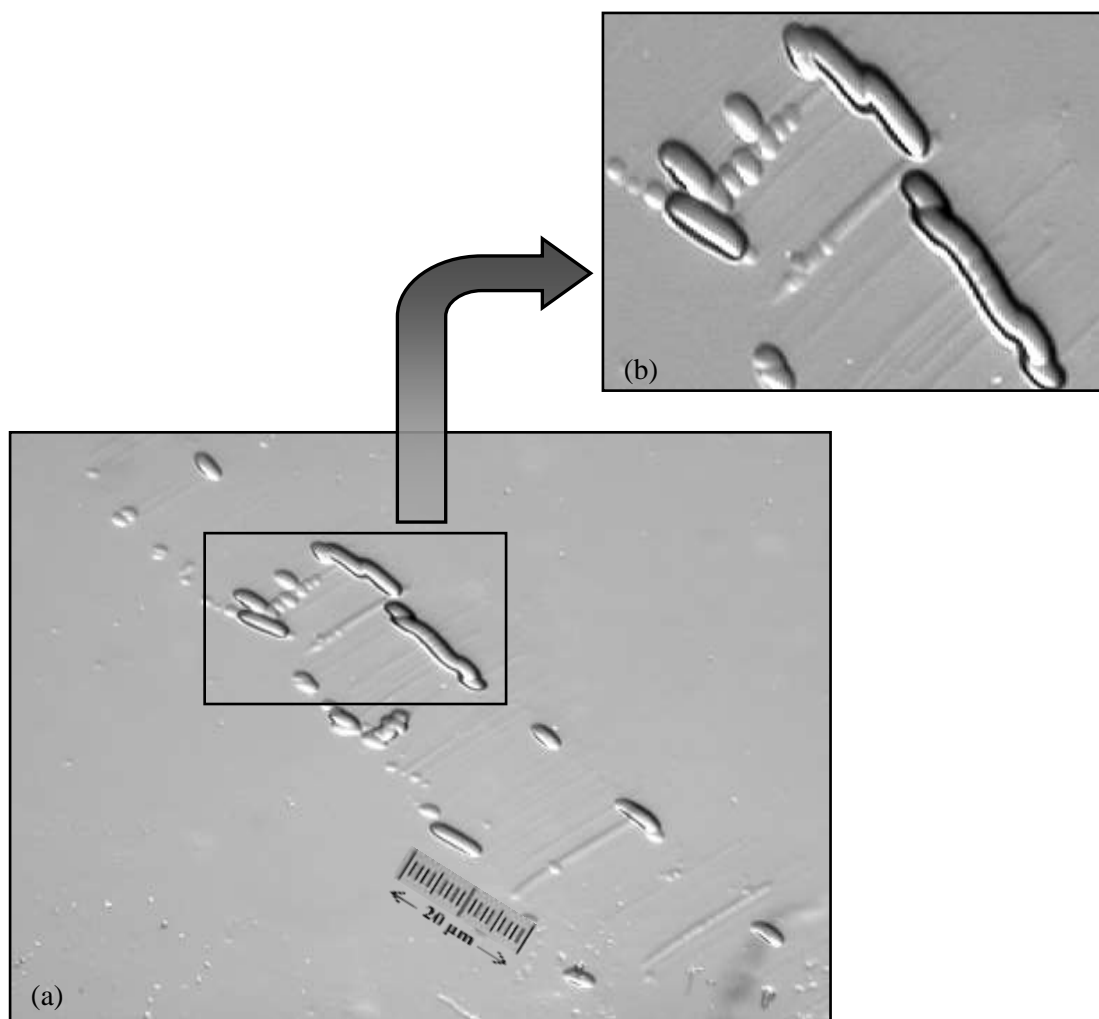


Figura IV.12 – Imagens neutrongráficas obtidas com amostra contendo *M. fortuitum* crescidas no meio 7H9 a 37°C e inativadas com hipoclorito de sódio: (a) imagens características de bacilos; (b) ampliação parcial da imagem selecionada em (a) que se assemelha aos bacilos em análise.

Ao se analisar a figura IV.12(b), percebe-se que, aparentemente, ocorreu um processo de fissão binária, ou seja, provavelmente, registrou-se o momento de separação de dois bacilos, após a divisão celular.

b) Cultivo 2: adoção dos mesmos procedimentos utilizados no ensaio 1, diferenciado apenas pela quantidade do 7H9, reduzida para 4 ml.

As imagens registradas nas lâminas do CR-39 com a amostra crescida a 30°C também não resultaram conclusivas, quanto a serem de bacilos, como pode ser visto na figura IV.13, reproduzindo, assim, o comportamento verificado no primeiro ensaio,

figura IV.11. Na figura IV.13, observam-se apenas defeitos ou danos existentes nas lâminas do CR-39 e traços nucleares espúrios resultantes da reação nuclear $^{10}\text{B}(n, \alpha)^7\text{Li}$.

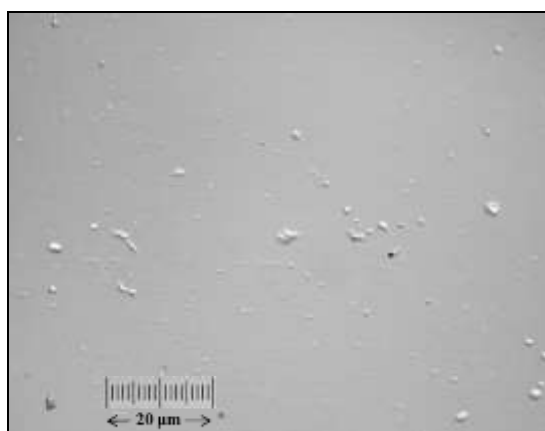


Figura IV.13 – Imagem neutrográfica revelando a ausência das *M. fortuitum* crescidas no meio 7H9 com boro e glicose, a 30°C, durante 7 dias e inativadas com hipoclorito de sódio.

Imagens diferentes de defeitos (ou danos) e traços nucleares apresentados na figura IV.1 foram observadas na figura IV.14.

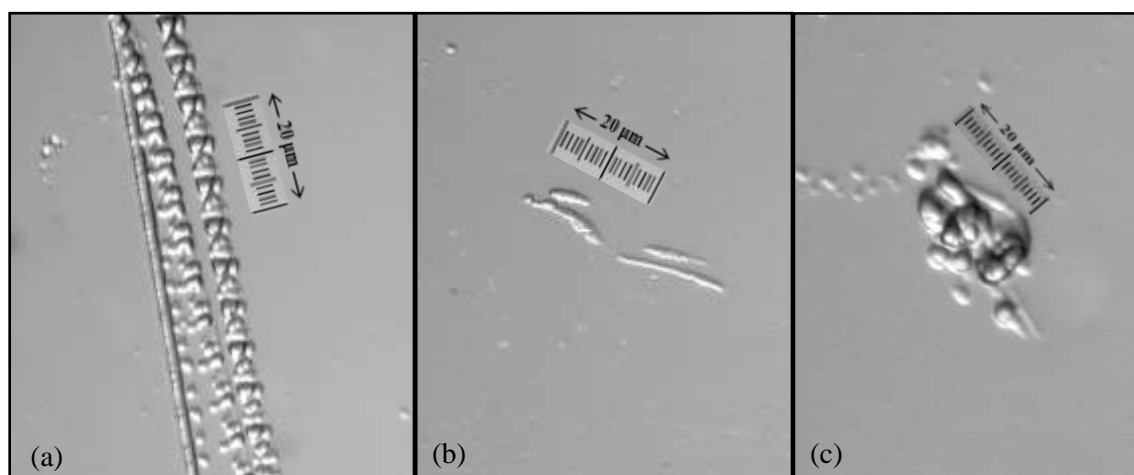


Figura IV.14 – Imagens neutrográficas obtidas com amostra contendo *M. fortuitum* crescidas no meio 7H9 a 37°C e inativadas com hipoclorito de sódio. Nas imagens (a) e (c) são observados bacilos aglomerados e na (b) imagens conclusivas de bacilos isolados.

As imagens (a), (b) e (c) da figura IV.14 pertencem a uma única lâmina de CR-39 e apresentam uma quantidade total de bacilos, isolados ou grumados, superior ao

visualizado na figura IV.12. Uma possível causa desse aumento de bacilos é a redução do meio de cultura, 7H9, o que facilitaria o contato do agente conversor, boro, com os micro-organismos, entretanto, esta redução pode ter causado a diminuição de tamanho das micobactérias.

c) Cultivo 3: adição do boro, glicose ao meio de cultura 7H9 e Citrato de Ferro Amoniacal (CFA) a 0,2%. Os demais procedimentos foram mantidos.

Na figura IV.15, diferentemente dos resultados relacionados aos cultivos 1 e 2, foram encontradas imagens semelhantes a de bacilos isolados ou aglomerados no cultivo 3, realizado a 30°C.

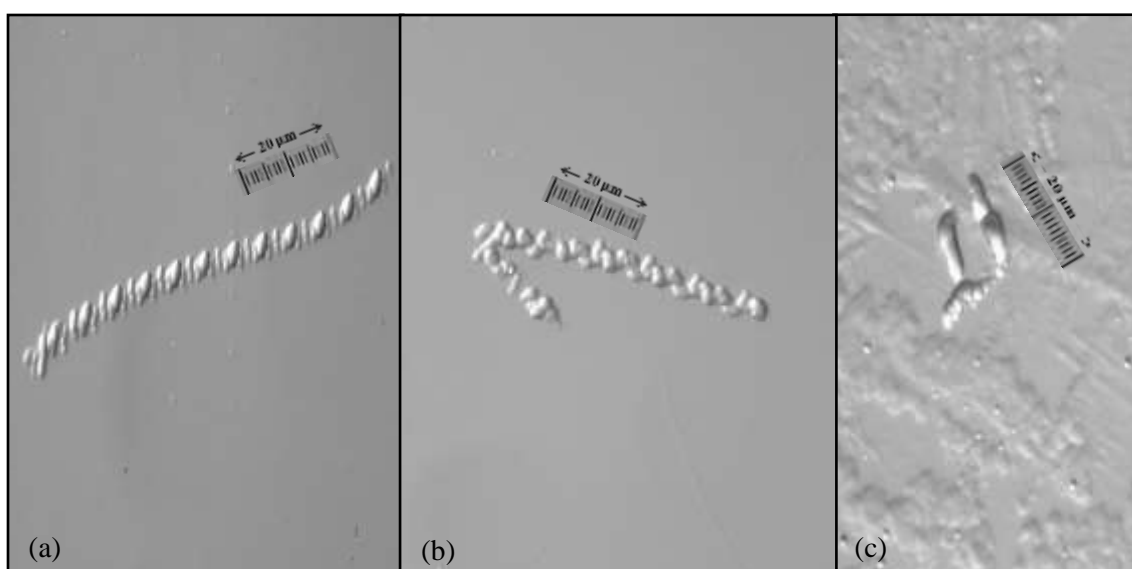


Figura IV.15 – Imagens neutrongráficas obtidas com uma amostra contendo *M. fortuitum* crescidas no meio 7H9, a 30°C, com adição de boro, glicose e CFA 0,2%, e inativadas com hipoclorito de sódio. A imagem (c) se diferencia da (a) e (b), pois não existem aglomerações de bacilos.

O primeiro e o segundo cultivos de *M. fortuitum*, a 30°C, figuras IV.11 e IV.12 respectivamente, não apresentaram imagens semelhantes a de bacilos, entretanto, o ensaio 3, na mesma temperatura de crescimento, resultou em imagens de micobactérias isoladas ou aglomerados. Numa das possíveis causas foi a adição da glicose e do Citrato de Ferro de amoniacal (CFA) ao meio de cultura, pois a glicose é uma fonte de energia e, portanto, pode ter contribuído para o crescimento e visualização dos micro-

organismos. É importante lembrar que, conforme descrito no item II.4.8.2, o cultivo propicia a nutrição, o crescimento e a multiplicação dos micro-organismos.

Se o crescimento da *M. fortuitum* a 30°C resultou em imagens de bacilos, sendo esta a temperatura menos indicada para tal procedimento, esperava-se que fossem visualizados bacilos cultivados a 37°C, conforme os vistos na figura IV.16.

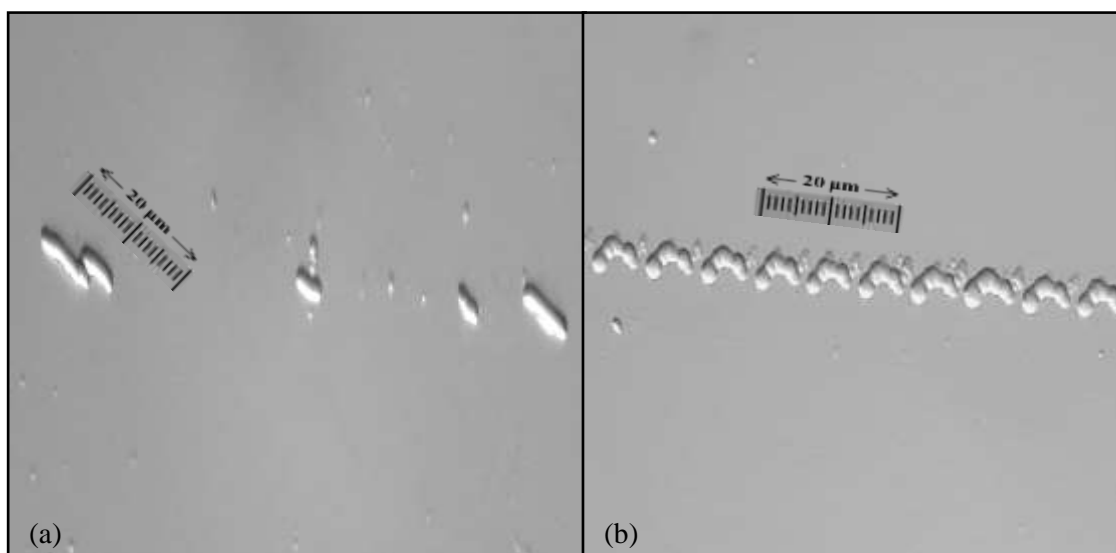


Figura IV.16 – Imagens neutrongráficas obtidas de uma lâmina contendo amostra de *M. fortuitum* crescidas no meio 7H9, a 37°C, com adição de boro, glicose e CFA 0,2%, inativadas com hipoclorito de sódio: (a) imagens de bacilos isolados; (b) imagem de bacilos posicionados numa única direção.

A figura IV.16(a) apresenta imagens de *M. fortuitum* isoladas e alinhadas semelhantes as mostradas na figura IV.12. Por outro lado, na imagem IV.16(b), são observados bacilos alinhados, porém mais próximos uns dos outros, assemelhando-se às imagens vistas nas figuras IV.14(a) e IV.15(a). Os bacilos visualizados na figura IV.16(b), além de alinhados, apresentam-se encurvados e igualmente distanciados.

d) Cultivo 4: adição de boro, zinco e glicose ao meio de cultura 7H9.

Na figura IV.17, não foi observada nenhuma imagem semelhante às visualizadas nas figuras IV.12, IV.14, IV.15 e IV.16, respectivamente.

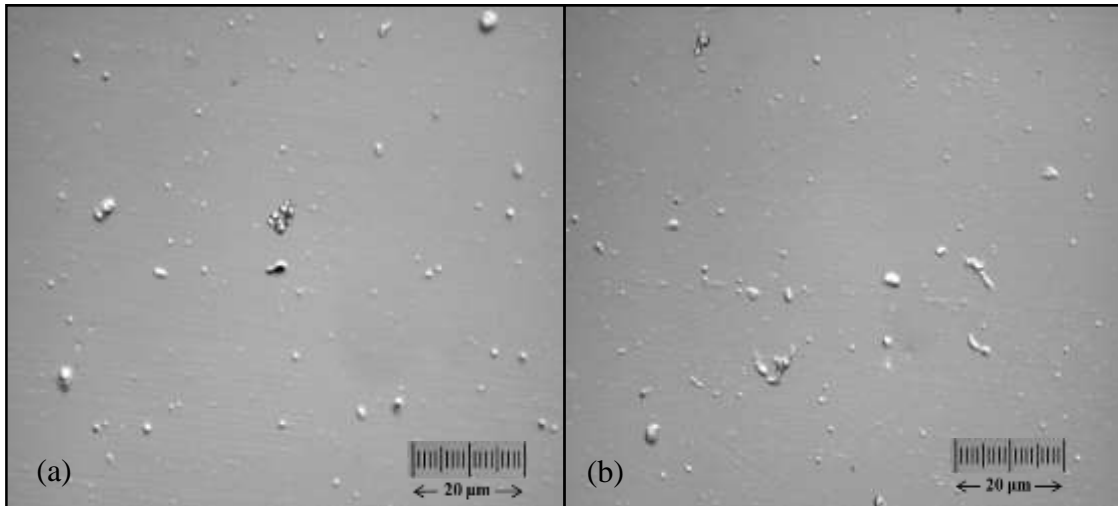


Figura IV.17 – Imagens de defeitos ou danos no CR-39 e traços de partículas alfa registrados no detector sólido de traços nucleares. Nas figuras (a) e (b) não foram encontradas imagens semelhantes à de bacilos.

Além dos ensaios contendo *M. fortuitum*, realizou-se um procedimento para se registrar imagens neutronográficas de CR-39, denominado controle. Com este objetivo, adicionou-se apenas a solução do boro, e se seguiu os demais protocolos: irradiação, revelação química e captura da imagem. Várias imagens foram obtidas sem nenhuma característica de bacilos isolados ou aglomerados, tais como a mostrada na figura IV.18.



Figura IV.18 – Imagem neutronográfica de uma lâmina de CR-39, sem depósito de MNT, dopada com boro.

A ausência de imagens semelhantes a bacilos na figura IV.18 era esperada, uma vez que não foi depositada nenhuma amostra de MNT no CR-39. Além disso, este

resultado indica que não houve contaminação das lâminas durante a manipulação no laboratório.

IV.6 – PAMAM G4 e borato de sódio na dopagem de *M. fortuitum* cultivadas no meio de cultura 7H9

Neste ensaio, foram utilizadas *M. fortuitum*, cultivadas à 37°C, por sete dias, no meio de cultura 7H9 e mantidas em repouso por 60 minutos, após cultura, com formaldeído a 10%, a temperatura ambiente para inativação, e dopadas com 10 µl da solução de complexo PAMAM G4 com borato de sódio, nas proporções molares 10:1 e 20:1 de borato de sódio/PAMAM. As temperaturas de incubação utilizadas foram 4°C e 37°C e, para cada uma delas, os tempos de incubação, em minutos, foram 30, 60 e 120, respectivamente.

Na figura IV.19, observam-se imagens de *M. fortuitum*, dopadas com solução na proporção molar 10:1, a 4°C, durante 30 e 120 minutos, respectivamente.

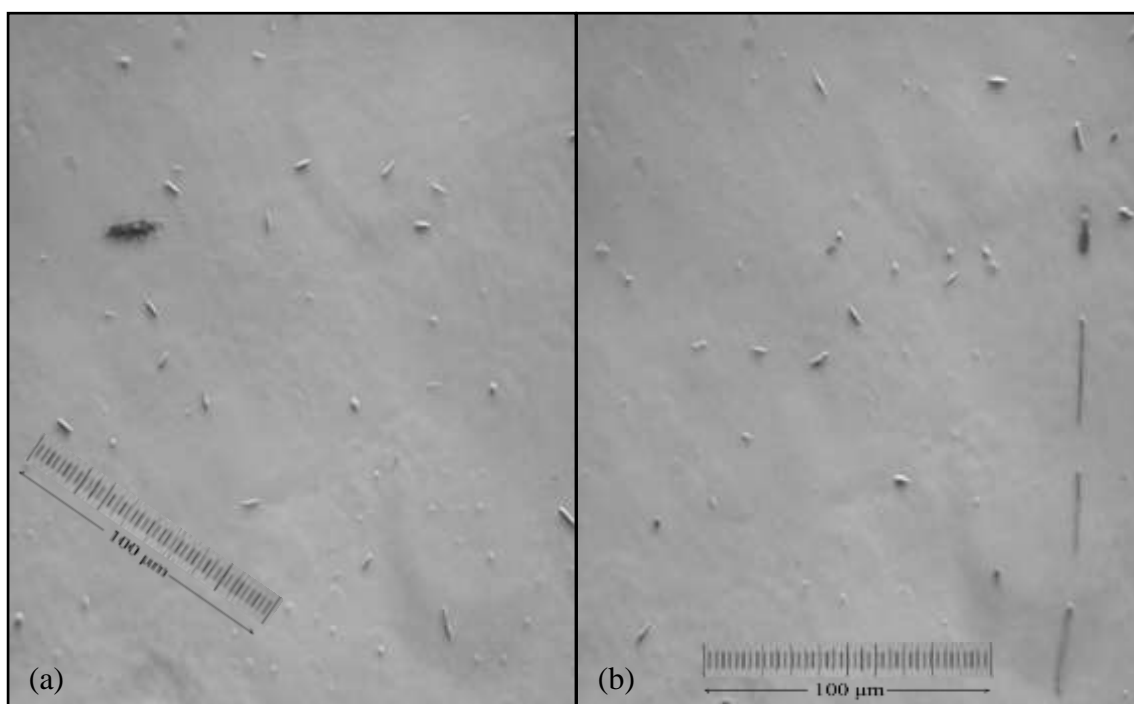


Figura IV.19 – Caracterização morfológica de *M. fortuitum*, dopadas com a solução na proporção molar 10:1 de borato de sódio/PAMAM, na temperatura de 4°C e tempos de incubação: (a) 30 minutos e (b) 120 minutos.

Na figura IV.19, observou-se bacilos desaglomerados com diferentes comprimentos e contornos bem definidos. Verificou-se o mesmo resultado, ao se utilizar o tempo de incubação igual a 60 minutos; esperava-se obter um número de micobactérias superior para 120 minutos, entretanto este resultado foi encontrado para 60 minutos, conforme mostra a figura IV.20.



Figura IV.20 – Caracterização morfológica de *M. fortuitum*, quando dopadas com a solução de borato de sódio/PAMAM, na proporção molar 10:1. A temperatura e o tempo de incubação foram iguais a 4°C e 60 minutos, respectivamente.

Na figura IV.20, observam-se dezenas de bacilos desaglomerados, o que possibilitaria a contagem das micobactérias. Nas figuras IV.19 e IV.20 o número de micro-organismos é visualmente superior ao encontrado em todos os experimentos anteriores, ratificando o potencial dos dendrímeros como carreador de boro e, conseqüentemente, aumentando a qualidade das imagens neutrongráficas.

Nos procedimentos realizados nas concentrações 10:1 e 20:1, nas temperaturas, respectivamente, iguais a 37°C e 4°C não foram encontradas imagens semelhantes às

apresentadas nas figuras IV.19 e IV.20, ou seja, não foi possível se visualizar bacilos isolados na quantidade esperada, conforme mostra a figura IV.21.

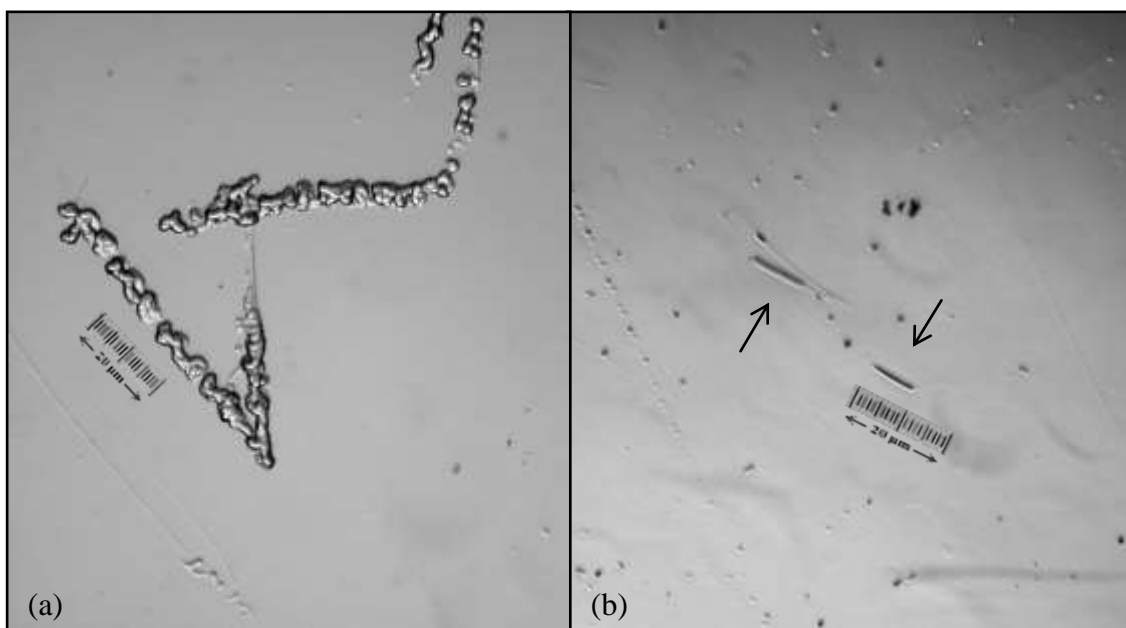


Figura IV.21 – Caracterização morfológica de *M. fortuitum*, quando dopadas com solução de complexo PAMAM G4 e borato de sódio de proporções molares de 10:1 e 20:1: (a) encontram-se aglomerados de *M. fortuitum* dopadas na proporção molar 10:1, na temperatura e tempo de incubação de 37°C e 60 minutos, respectivamente; (b) visualizam-se bacilos isolados dopados na proporção molar 20:1, na temperatura e tempo de incubação de 4°C e 30 minutos, respectivamente.

Um procedimento na proporção molar, borato de sódio/PAMAM, igual 20:1 também foi realizado nas condições utilizadas no ensaio anterior. Nessa concentração, um maior número de bacilos foi encontrado nos ensaios em que as dopagens ocorreram a 37°C nos períodos de 30 e 120 minutos, conforme mostram as imagens neutrongráficas dispostas nas figuras IV.22 e IV.23, respectivamente.

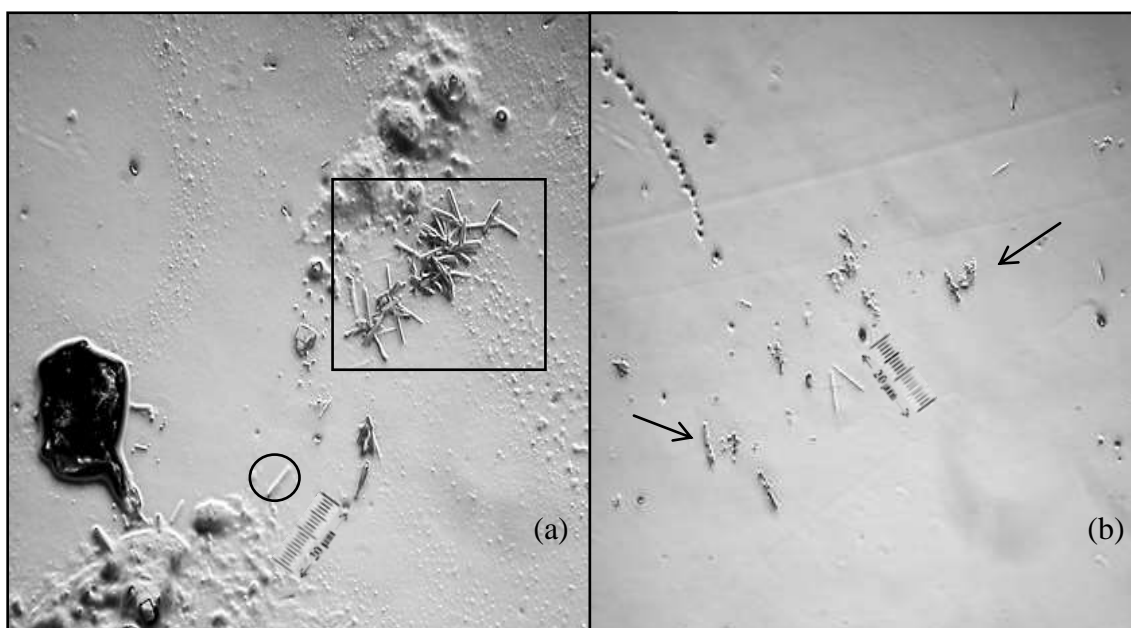


Figura IV.22 – Caracterização morfológica de *M. fortuitum*, dopadas com a solução borato de sódio/PAMAM, na proporção molar 20:1, na temperatura e no tempo de incubação de 37°C e 30 minutos, respectivamente: (a) o destaque circular representa bacilo isolado e o quadrado, aglomeração de bacilos; (b) as setas indicam imagens de bacilos com a parede celular rompida.

Nas imagens da figura IV.22, observam-se, além dos bacilos aglomerados e isolados com parede celular rompida ou não, danos no CR-39 e traços de partículas alfa. Uma possível causa dos danos ao filme e às paredes celulares das *M. fortuitum* foi o aumento inesperado da temperatura de revelação, ocasionado por um defeito temporário, na unidade de banho termostático.

Após a detecção do defeito da unidade de banho termostático, realizou-se os procedimentos seguintes com um maior controle da temperatura, para se evitar possíveis danos ao CR-39 e às paredes dos micro-organismos.

Na figura IV.23, são apresentadas as imagens de *M. fortuitum*, dopadas à 37°C por 120 minutos.

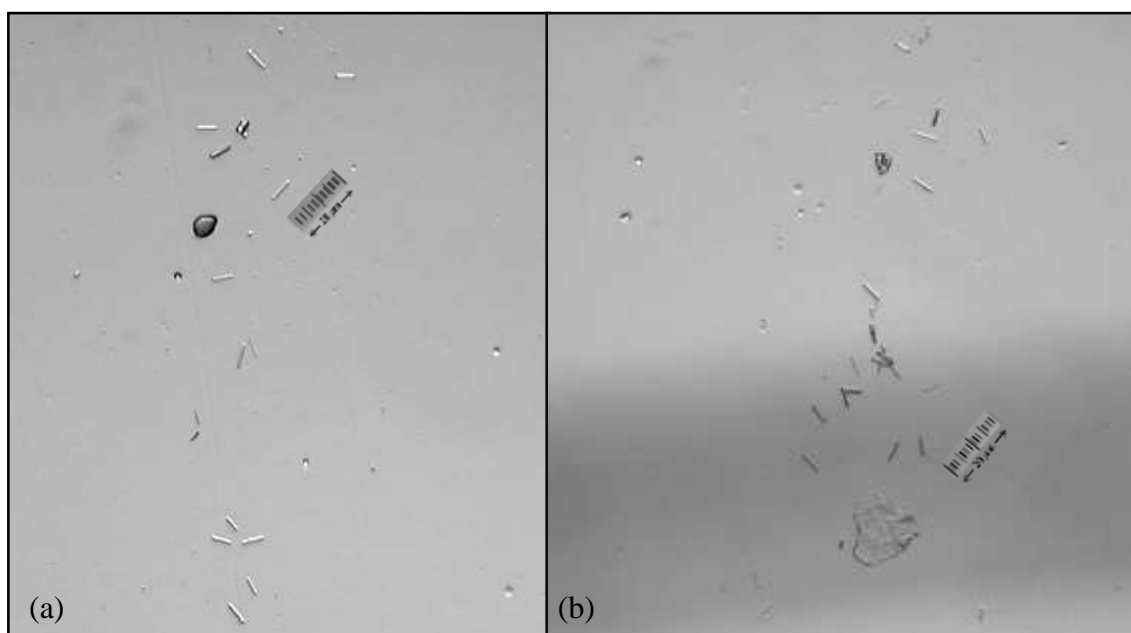


Figura IV.23 – Caracterização morfológica de *M. fortuitum*, quando dopadas com a solução de complexo PAMAM G4 e borato de sódio, na proporção molar 20:1 de borato de sódio/PAMAM. A temperatura e o tempo de incubação foram iguais, respectivamente, a 37°C e 120 minutos.

Na figura IV.23, verifica-se, assim como nas IV.19 e IV.20, imagens de *M. fortuitum* isoladas com paredes celulares bem definidas, sem sinais de danos. Além disso, não apareceram grandes defeitos na superfície do CR-39 como os observados na imagem disposta na figura IV.22(a). Esse resultado era esperado, uma vez que se procedeu a um maior controle dos parâmetros; especialmente o da temperatura da unidade de banho termostatizado, durante o processo de ataque químico.

IV.7 – PAMAM G4 e borato de sódio na dopagem de *M. fortuitum* cultivadas no meio de cultura 7H9, CFA 0,2% e Glicose

Considerando os bons resultados obtidos no experimento descrito na seção III.8.1 (cultivo 3) foram realizados novos ensaios com as *M. fortuitum* cultivadas a 37°C, durante 7 dias, no meio de cultura 7H9 com adição de glicose e Citrato de Ferro Amoniacal (CFA) a 0,2 %. Entretanto, a dopagem foi realizada com as soluções de dendrímero do tipo PAMAM G4 e borato de sódio visando-se melhorar a nitidez das imagens e se verificar uma contagem maior de micro-organismos, pelo efeito esperado da desaglomeração deles.

Nas figuras IV.24 e IV.25, encontram-se as imagens das *M. fortuitum* dopadas com soluções de borato de sódio/PAMAM, nas proporções molares 10:1 e 20:1, respectivamente. As temperaturas de incubação utilizadas foram 30°C e 37°C, num período de 30 minutos.

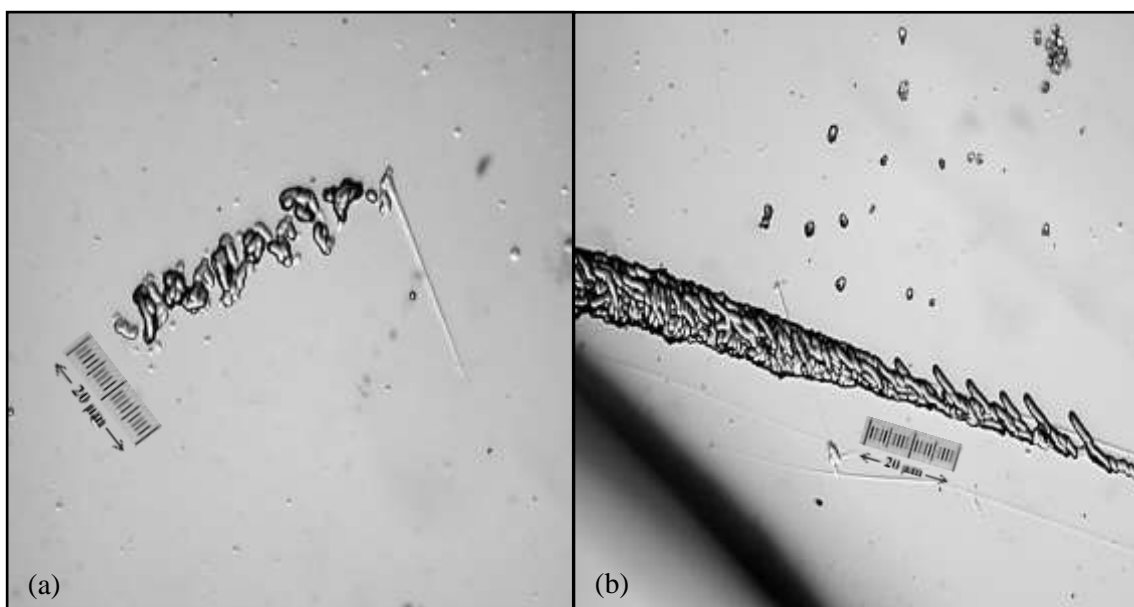


Figura IV.24 – Caracterização morfológica de *M. fortuitum* cultivadas em 7H9 com adição de glicose e Citrato de Ferro Amoniacal (CFA) a 0,2 % e dopadas com a solução de borato de sódio/PAMAM, na proporção molar 10:1. Nas figuras (a) e (b) as temperaturas de incubação utilizadas foram 30°C e 37°C, respectivamente, ambas realizadas num período de 30 minutos.

A figura IV.24 apresenta bacilos aglomerados, além dos traços nucleares e defeitos no detector. As micobactérias observadas na figura IV.24(b) apresentam contornos mais definidos, comprimentos variados e em maior número, quando comparadas às visualizadas na figura IV.24(a). Este resultando indica uma influência da temperatura de incubação, uma vez que foi o único parâmetro de diferenciação.

Na figura IV.25, são apresentadas as imagens das *M. fortuitum* dopadas com a solução de borato de sódio/PAMAM, na proporção molar 20:1, tendo sido mantidos os parâmetros de incubação.

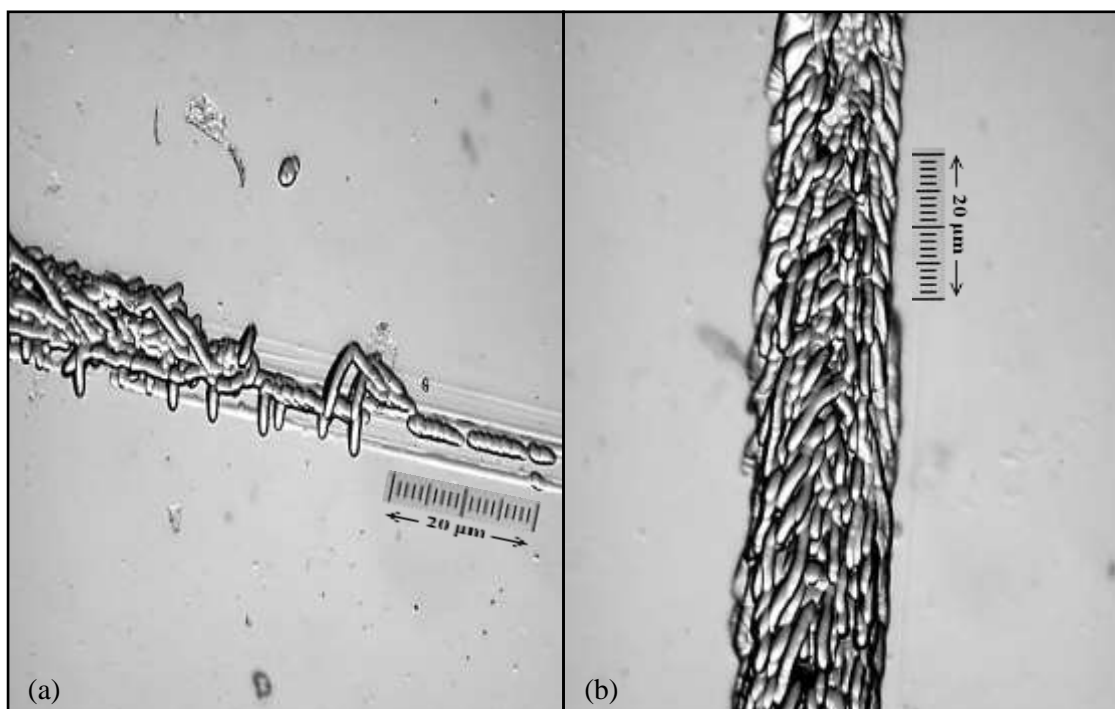


Figura IV.25 – Caracterização morfológica de *M. fortuitum* cultivadas em 7H9 com adição de glicose e Citrato de Ferro Amoniacal (CFA) a 0,2 % e dopadas, durante 30 minutos, com a solução de borato de sódio/PAMAM, na proporção molar 20:1. Temperaturas de incubação: (a) 30°C e (b) 37°C.

Comparando-se as figuras IV.24(a) e IV.25(a), verifica-se que as imagens com o maior número de bacilos aglomerados e com contornos mais definidos foram obtidas, ao se utilizar a proporção molar 20:1 de borato de sódio/PAMAM no processo de dopagem. Os resultados referentes à dopagem, na proporção molar 10:1 de borato de sódio/PAMAM foram semelhantes aos verificados na proporção 20:1, quando se procedeu à incubação a 37°C, conforme ilustram as imagens neutrongráficas vistas nas figuras IV.24(b) e IV 25(b).

IV.8 – PAMAM G4 e borato de sódio na dopagem de *M. marinum* cultivadas no meio de cultura 7H9, CFA 0,2% e Glicose

Visando-se analisar a ação dos dendrímeros no processo de dopagem aplicado a tipos diferentes de micobactéria, além de se comparar os resultados obtidos com as *M. fortuitum*, foram realizados experimentos utilizando *M. marinum*. As condições de cultivo, inativação, dopagem, tempo e temperaturas de incubação, irradiação e revelação

foram os mesmos descritos na seção anterior; mas utilizou-se um período de cultivo de 14 dias.

Encontram-se nas figuras IV.26 e IV.27 as imagens das *M. marinum* dopadas com soluções de borato de sódio/PAMAM, nas proporções molares 10:1 e 20:1, respectivamente.

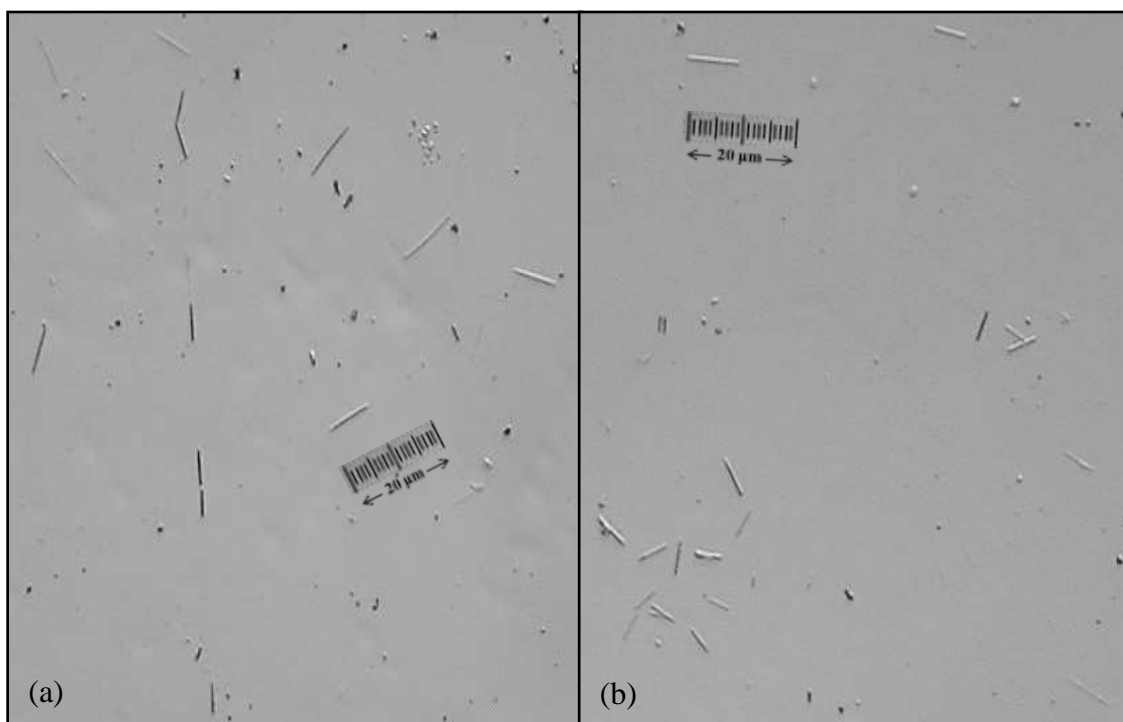


Figura IV.26 – Caracterização morfológica de *M. marinum* cultivadas no meio de cultura 7H9 com adição de glicose e Citrato de Ferro Amoniacal (CFA) a 0,2 % e dopadas, durante 30 minutos, com solução de borato de sódio/PAMAM, nas proporção molar 10:1. Temperaturas de incubação: (a) 30°C e (b) 37°C.

As imagens neutrográficas dos experimentos com a *M. marinum*, vistas na figura IV.26, diferem das obtidas com a *M. fortuitum*, mostradas na figura IV.24, pois apresentam bacilos isolados, nas duas temperaturas de incubação, 30°C e 37°C.

Na figura IV.27, são apresentadas as imagens das *M. marinum* dopadas com a solução de borato de sódio/PAMAM, na proporção molar 20:1.

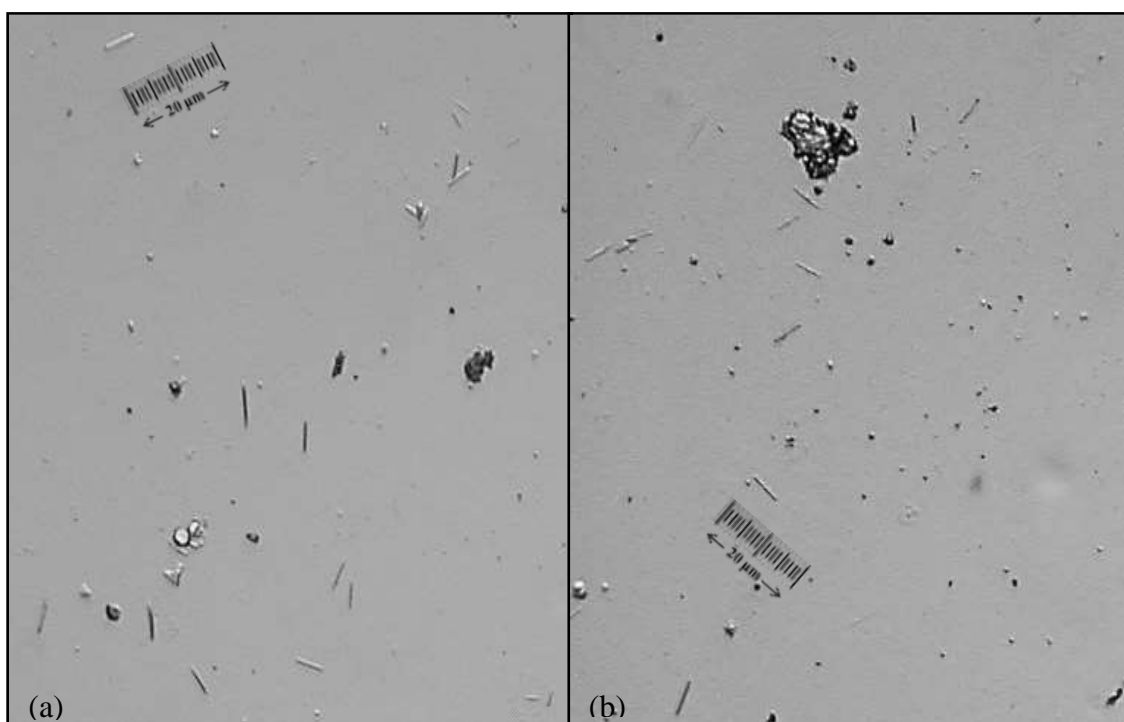


Figura IV.27 – Caracterização morfológica de *M. marinum* cultivadas no meio de cultura 7H9 com adição de glicose e Citrato de Ferro Amoniacal (CFA) a 0,2 % e dopadas, durante 30 minutos, com solução de borato de sódio/PAMAM, na proporção molar 20:1. Temperaturas de incubação: (a) 30°C e (b) 37°C.

As figuras IV.26 e IV.27 apresentam bacilos isolados de contornos definidos sem grandes diferenças na quantidade de micro-organismos visualizados. Este resultado sugere que a dopagem utilizando as soluções de borato de sódio/PAMAM, nas proporções molares 10:1 e 20:1 resultam em imagens neutronográficas de boa qualidade, apesar da redução do número de micobactérias quando comparado ao resultado obtido com *M. fortuitum*.

A observação das figuras IV.24, IV.25, IV.26 e IV.27 indica que a *M. fortuitum* forma aglomerados nas condições de cultivo e dopagem adotados no item III.9.3, entretanto a *M. marinum* se mantém isolada, independentemente dos parâmetros utilizados.

Os resultados dos experimentos com o PAMAM (G4) ratificaram a utilidade dos dendrímeros como carreadores do boro para as micobactérias *marinum* e *fortuitum* e, independente do estado isolado ou aglomerado dos micro-organismos, as imagens neutronográficas obtidas permitiram a visualização dos bacilos com nitidez e boa definição.

CAPÍTULO V

CONCLUSÕES E SUGESTÕES

V.1 – Conclusões

A técnica neutronográfica permitiu uma ampliação adicional de 1000x nas imagens latentes, facilitando a caracterização morfológica das micobactérias sem a necessidade de equipamentos mais sofisticados como, por exemplo, um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV).

O tempo gasto para essa caracterização demonstrou ser curto, quando comparado ao necessário em outras metodologias, uma vez que a etapa de cultivo da colônia não se faz necessária.

As imagens neutronográficas obtidas com e sem a presença *M. marinum* ou *M. fortuitum* resultaram bem distintas, permitindo-se concluir que a técnica caracterizou bem a morfologia dos micro-organismos, dos defeitos de fabricação do detector e dos traços nucleares.

A técnica mostrou possuir uma excelente resolução e alcançou expectativas em termos da visualização das imagens, pois, mesmo nas imagens onde se caracterizou aglomerados de bacilos, foi possível se delinear cada micobactéria.

Entretanto, é importante ressaltar que as imagens neutronográficas não permitem identificar as espécies de micobactérias, mas, sim, caracterizá-las.

Temperaturas superiores a 90°C causam danos ao CR-39.

Os ensaios com *M. marinum* dopadas após inativação pelos métodos físico e químico resultaram em imagens neutronográficas bem distintas: somente danos ou defeitos das lâminas de CR-39 foram visualizados, após inativação com o método físico; entretanto, observaram-se bacilos, provavelmente, lisados, após inativação com o hipoclorito de sódio, ou em aglomerados, quando se utilizou formaldeído como agente

esterilizante. A inativação das micobactérias utilizando o formaldeído foi mais eficiente, pois favoreceu a fixação dos micro-organismos na placa de CR-39 e a obtenção de imagens mais nítidas das micobactérias.

A adição de Citrato de Ferro Amoniacal (CFA) a 0,2%, boro e glicose ao meio de cultura 7H9 possibilitou a visualização de *M. fortuitum* cultivadas em estufa, a 30°C, mesmo não sendo a temperatura mais indicada para o crescimento desta MNT.

Obtiveram-se imagens neutrongráficas com alta resolução de *M. fortuitum*, crescidas no meio de cultura 7H9 com adição de boro e glicose, a 37°C, com ou sem acréscimo de CFA. Nessa temperatura, visualizaram-se bacilos isolados ou aglomerados, retos ou curvos, alinhados segundo uma direção preferencial ou dispersos e com contornos bem definidos.

Nenhuma imagem semelhante a bacilos foi observada no cultivo em que se acrescentou zinco ao meio de cultura 7H9.

O uso da caseína como fixador das *M. marinum* resultou em imagens neutrongráficas com um número considerável de bacilos aglomerados, mas com contornos definidos, o que possibilitaria a contagem dos micro-organismos. Comparando-se as figuras IV.5 e IV.6, verificou-se que o uso do hipoclorito de sódio no processo de inativação propiciou imagens de bacilos com contornos mais definidos que os inativados com formaldeído.

A inativação de *M. marinum* com formaldeído e glutaraldeído resultou em imagens neutrongráficas de bacilos agrupados. Esta aglomeração reduziu a visualização dos contornos das micobactérias, entretanto, observou-se que o número de bacilos foi superior ao visualizado nas imagens das *M. marinum* fixadas com caseína.

A etapa de dopagem das *M. fortuitum*, quando realizada a 37°C com borato de sódio, é mais recomendada, em relação à feita a 4°C, pois propiciou a visualização de um maior número de bacilos, quer isolado ou aglomerado.

A maioria das imagens neutronográficas de *M. fortuitum* dopadas com a solução do complexo PAMAM G4 e borato de sódio apresentou um número de bacilos isolados ou aglomerados superior ao encontrado nas imagens obtidas sem o uso desse dendrímero, ratificando seu emprego como carreador de boro.

A temperatura e o tempo de incubação, que resultaram em imagem com o maior número de bacilos isolados foram, respectivamente, iguais a 4°C e 60 minutos, e, neste caso, a proporção molar de borato de sódio/PAMAM foi de 10:1. Entretanto, a imagem com o maior número de bacilos aglomerados foi gerada com *M. fortuitum* dopadas a 37°C, durante 30 minutos com esta solução na proporção 20:1.

Os ensaios com *M. fortuitum*, cultivadas no meio de cultura 7H9 com adição de CFA 0,2% e Glicose e dopadas com a solução de borato de sódio e PAMAM, resultaram em imagens neutronográficas de bacilos aglomerados, porém, bem definidos. O processo de dopagem que se mostrou mais eficiente, à 30°C, foi aquele realizado com a proporção molar 20:1 de borato de sódio/PAMAM, enquanto que, à 37°C, as imagens apresentaram semelhanças quanto a quantidade, nitidez e contorno dos bacilos nas duas proporções, 10:1 e 20:1.

Imagens neutronográficas de *M. marinum*, cultivadas no meio de cultura 7H9 com adição de CFA 0,2% e Glicose, e dopadas com a solução de borato de sódio e PAMAM (G4), nas proporções molares 10:1 e 20:1 de borato de sódio/PAMAM, apresentaram bacilos isolados de contornos definidos, pouco diferindo, em relação ao número de micobactérias, nas duas temperaturas de incubação, 30°C e 37°C.

V.2 – Sugestões

Com base nos resultados aqui apresentados, sugere-se dar continuidade ao estudo, no que tange a:

- Determinação do nível de contaminação de um meio ambiente submetido à ação de MNT.
- Lima, em sua tese de doutorado (Lima, 2009) concluiu que as MTB contidas nas amostras reais de pacientes não foram morfologicamente caracterizadas porque o

boro não as atingiu. Sugere-se a realização de ensaios neutronográficos com amostras laboratoriais e reais de *Mycobacterium tuberculosis*, dopadas com solução de PAMAM (G4) e borato de sódio. Este dendrímero demonstrou ser um excelente carreador do boro, característica de supra importância nos ensaios com amostras reais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, M.; AMANO. K.; KITAMURA. K.; TATEISHI, J, 1993, *Boron-10 distribution in rat bran tumors*. In: Fairchild, R.G., Brownell G. L. eds. *Neutron Capture Therapy: procdtoge*, of the international symposium on hekt in Cambridge 12-14 October. NY. Brookhaven National Laboratory. p.155-8. (BNL-51730).

ADOLF LUTZ, 2005, *Micobacterioses: Recomendação para o Diagnóstico e Tratamento*. São Paulo. Disponível em: <ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/tb/MNT_Final_9-12-05a.pdf>. Acesso em: 20/5/ 2010.

ALBAN, S. M., 2006, *Caracterização Molecular de Micobactérias Isoladas de Hansenomas*. Tese de MSc., UFPR, Paraná, Brasil.

AMABIS, J. M., MARTHO, G. R., 2009, *Biologia dos Organismos*. 3 ed. São Paulo, Moderna.

AMERICAN THORACIC SOCIETY, 1997, *Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria*. Am J Respir Crit Care Med; 156:S1-S25.

ANDRADE, M. L. G., 2008, *Radiografia com Elétrons Induzida por Nêutron*. Tese de DSc., IPEN, São Paulo, Brasil.

ANDREUCCI, R., 2010, *Radiologia Industrial, Ensaio Não-Destrutivos das Radiações Ionizantes*, Abendi, São Paulo. Disponível em: <http://www.abende.org.br>. Acesso em 20/09/2010.

ANVISA, 2004, *Detecção e Identificação de Micobactérias de Importância Médica*, mod.VI, Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde Pública, versão preliminar, 1ª edição. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/microbiologia.asp>>. Acesso em: 05/07/2010.

AUBRY, A., CHOSIDOW, O., *et al*, *Sixty-three Cases of Mycobacterium marinum Infection Clinical Features, Treatment, and Antibiotic Susceptibility of Causative Isolates*. *Arch Intern Med.*; 162(15):1746-1752. Disponível em: <http://archinte.jamanetwork.com/article.aspx?articleid=754060> Acesso: 20 de junho de 2012.

BEEZER, E., KING, A. S. H., *et al*, 2003, *Dendrimers as potential drug carries; encapsulation of acidic hydrophobes within water soluble PAMAM derivatives*. *Tetrahedron*. V. 59, p. 3873-3880.

BENTON, E. V. and NIX, W.D., 1969, “The Restricted Energy Loss Criterion for Registration of Charged Particles in Plastic”. In: *Nuclear Instruments And Methods*, v. 67, pp. 343-347.

BENTON, E. V. and CASSOU, R. M., 1978, “Properties and Applications of CR-39 Polimeric Nuclear Track Detector”. In: *Nuclear Track Detection*, vol. 2, pp 173-179.

BERGER, H., 1963, *Resolution Study of Photographic Thermal Neutron Image Detectors*, *J. Appl. Phys.*, 34(4): 914-18.

BERGER, H., 1965, *Neutron radiography, methods, capabilities and applications*. New York, N.Y., Elsevier.

BERNHARDSSON, J., SHISHOO, R., 2003, “Dendritic coupling agents in GF/PP composites”, *Journal of Thermoplastic Composite Materials*. V.16, pp. 59-74.

BIER, O., 1970, *Microbiologia e Imunologia*. 15 ed. São Paulo, Melhoramentos.

BLATT, J. N., WEISSKOPF V. F., 1957, *Theoretical Nuclear Physics Dover Publication*, Inc. New Graw Hill, Book Company, Inc. New York, USA.

BLUE, T. E., 1987, *Boron-10 concentration measurements using the solid-state nuclear track detector CR-39 and automatic image analysis*. *Nucl. Technol.*, 53:220-6.

BOAS U., HEEGAARD P. M., 2004, *Dendrimers in Drug Research*. In: *Chem Soc Rev*. v. 33, pp 43-63.

BRASIL, 1998, *Manual de Bacteriologia da Tuberculose*. Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, Centro de Referencia Professor Hélio Fraga, 2 ed. Rio de Janeiro.

BRENNER, J. D., KRIEG, R. N., STALEY, T. J., 2005, *Bergey's manual of systematic bacteriology: The proteobacteria: introductory essays*, v.2. 2 ed. New York, Springer.

BROSCH, R, GORDON, S. V., *et al*, 2002, *A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex*. Proc Natl Acad Sci., USA.

BRUNELLO, F., LIGOZZI, M., *et al*, 2001. *Identification of 54 mycobacterial species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene*. v. 39, *J Clin Microbiol*, pp. 2799-806.

CAMPOS, T. P. R., 2000, *Considerações sobre a Terapia De Captura de Nêutrons pelo Boro*. Revista Brasileira de Cancerologia. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/rbc/n_46/v03/pdf/artigo4.pdf>. Acesso em: 10/9/2010.

CARTWRIGHT, B. G., SHIRK, E. K., PRICE, P. B., 1978, "A Nuclear Tracks Recording Polymer of Unique Sensitivity and Resolution". In: *Nuclear Instruments and Methods*. v.153, pp. 457-460.

CERCA, P. A. R., 2010, *Identificação de Micobactéria não Tuberculosas através de Métodos Moleculares Não Comerciais*. Tese de MSc., Universidade Nova de Lisboa, Portugal.

CHAUHAN, A. S., SRIDEVI, S., *et al*, 2003, "Dendrimer-mediated transdermal delivery: enhanced bioavailability of indomethacin". In: *Journal Control Release*, v.90[3], pp 335-343.

CNEN-NN-3.01: 2011. Diretrizes Básicas de Proteção Radiológica. Disponível em: <http://www.cnen.gov.br/seguranca/normas/pdf/Nrm301.pdf> Acesso em: 05/2011.

COLLINS, C. H, GRANGE J. M, YATES M. D, 1997, *Tuberculosis Bacteriology – Organization and Practice*. 2 ed. Oxford, Butterworth-Heinemann.

CRECCHI, C. e STOTZKY, G., 1998, “Insecticidal and biodegradation of the toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* bound to humic acids from soil”. In: *Soil Biology & Biochemistry*, v. 30 [4], pp. 463-470.

CRISPIM, V. R., 1993, *Desenvolvimento de Ensaio Não-Destrutivos com Neutronografia*, Tese de DSc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

CRUZ, J. C., 1938, *Mycobacterium fortuitum um novo bacilo ácido resistente patogênico para o homem*. *Acta Med*; 1:297-301.

DAFFÉ, M., ETIENNE, G., 1999, “The Capsule of *Mycobacterium tuberculosis* and its Implications for Pathogenicity”. In: *Tubercle and Lung Disease*, v. 79(3), pp. 153-169.

DAILLOUX, M., LAURIAN, C., *et al*, 1998, *Water and nontuberculous mycobacteria*. *Wat. Res.* 33:2219-2228.

DAVIDSON P. T, 1989, “The diagnosis and management of disease caused by *M. avium* complex, *M. kansasii*, and other mycobacteria”. In: *Clinics Chest. Medicine*. v. 10[3], pp. 59-63.

DOMANUS, J. C., 1992, *Practical Neutron Radiography, Commission of the European Communities Neutron Radiography, Working Group Kluwer Academic Publishers*. 1 ed. Boston, Kluwer Academic Publishers. **ACADEMIC PUBLISHERS**

DONLAN, R. M., 2002, “Biofilms: microbial life on surfaces”. In: *Emerging Infectious Diseases*, v. 8[9], pp. 881-890.

DROSTEN, C., PANNIG, M. and KRAMMEAFF, S., 2003, "Detection of Mycobacterium tuberculosis by Real-Time PCR Using Pan-Mycobacterial Primers and a Pair of Fluorescence Resonance Energy Transfer Probes Specific for the M. tuberculosis Complex". In: *Clinical Chemistry*. v. 49, pp. 1659-1661.

DUDERSTAD, J. J. & HAMILTON, L. J., 1942, *Nuclear reactor analysis*. United States of America, John Wiley & Sons.

ENGE, W., 1980, "Introduction to plastic nuclear track detectors". In: *Nuclear Track*. v. 4[4], pp.283-308.

ESFAND, R., TOMALIA, D. A., 2001, "Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications". In: *Research Focus Reviews*. v. 6[8], pp. 427-436.

FALKINHAM, J. O., 1996, "Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria". In: *Clin Microbiol Reviews*. v. 9, pp. 177-215.

FERREIRA, F. J. O., 2003, *Estudo para Implantação de um Sistema Eletrônico para Aquisição de Imagens Neutronográficas no Reator Argonauta do IEN/CNEN*. Tese de MSc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

FERREIRA, F. J. O., 2008, *Detecção de Explosivos Plásticos e Narcóticos, Aplicando Neutronografia em Tempo Real, Aliada à Tomografia Computadorizada por Transmissão*. Tese de DSc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

FLEISCHER, R. L., 1998, *Tracks to Innovation: Nuclear Tracks in Science & Technology*. 1 ed. New York, Springer-Verlag.

FLORENCE, A. T., 2005, "Dendrimers: a versatile targeting platform". In: *Advanced Drug Delivery Reviews*. v.57, pp. 2104-2105.

FORBES, B. A.; SAHM, D. F.; WEISSFELD, A. S., 1998, *Bailey & Scott's: diagnostic microbiology*. 3 ed. Mosby, St. Louis.

HAWKER, C.J. e FRECHET, J.M.J., 1990, "Preparation of polymers with controlled molecular architecture. A new convergent approach to dendritic macromolecules". In: *Journal of the American Chemical Society*. v. 112, pp. 7638-7647.

GAMOW, G., 1963, *Biografia da Física*, Rio de Janeiro, Zahar Editores.

GARCIA M. H. O., 2007, *Investigação de surto de infecção hospitalar associado a micobactérias de crescimento rápido*, Rio de Janeiro. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde.

GEBRE N, KARLSSON U, JÖNSSON G, *et al*, 1995, "Improved Microscopical Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis", *Journal Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* v. 89, pp.191-193.

GRIFFITH, D. E., AKSAMIT, T., *et al*, 2007. "An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases". *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. v. 175, n 4 (Fev), pp. 367-416.

HACIDUME, L. R., 1999, *Detecção de Explosivos plásticos por Neutronografia Térmica*. Dissertação de M. Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

HARDT. P. von DER & ROETTGER, H., 1981, *Neutron Radiography Handbook: Nuclear Science and technology*, Dordrecht, D. Reidel.

HARMS, A. A.; BLAKE, T. G.; MARTON, J. P., 1973, Neutron Imaging Thin Gadolinium Converters. In: *Nuclear Instruments and Methods in Physics*. v. 109, pp. 253-255.

HARMS A.A.; ZELLINGER A., 1977, "A New Formulation of Total Unsharpness in Radiography". *Physics in Medicine and Biology*, v. 22, n 1, pp. 70-80.

HATANAKA.H. & SWEET.W.H, 1975, “Slow-neutron capture therapy for malignant tumors - Its history and recent development”. In: *Biochemical Doaimatry*. International Atomic Energy Agency. Vienna. p. 147-78. (IAEA-SM-193/79).

HATANAKA. H, 1986, *Boron-Neutron capture therapy for tumora*. Niigata. Nishimura. pp. 1-28.

HAWKESWORTH, M. R., 1977, *Neutron radiography: Equipaments and Methods*. Atom. Energy Ver. v. 152, pp. 169-220.

HUGHES, D. J., 1959, *The Neutron Story*. Garden City, NY, Anchor Books.

HUSSEIN, Z., LANDT, O., WIRTHS, B. & WELLINGHAUSEN, N., 2009, **Detection of non-tuberculous mycobacteria in hospital water by culture and molecular methods**. *International Journal of Medical Microbiology*, v. **299**, n. 4, pp. 281-290.

ISHIKAWA, C. M., *et al*, 2001, “Micobacteriose em Peixes”. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 27, n. 2, pp. 231-242. Disponível em: <ftp://ftp.sp.gov.br/ftppeca/27%5B2%5D-art_13.pdf>. Acesso em: 15/06/2011.

KANAI, K. Y., 2006, *Detecção e Identificação de Micobactéria em Corpos de Água Destinados à Captação para Abastecimento Urbano da Cidade de São Carlos-SP*. Tese de M.Sc., UFSCar, São Carlos, SP.

KAPLAN, I., 1978, *Física Nuclear*. 2 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Dois.

KATOCH, V.M., PARASHAR, D., *et al*, 2007. “Rapid identification of mycobacteria by gene amplification restriction analysis technique targeting 16S-23S ribosomal RNA internal transcribed spacer & flanking region”. *Indian Journal of Medical Research*, v. 125, n. 2, pp. 155-162.

KUBICA, G. P., WAYNE, L. G., 1984, *The Mycobacteria: A sourcebook*. 15 ed. New York: Marcel Dekker, Inc. v. 15, pp. 1313-1332.

LAMARSH, J. R., 1978, *Introduction Nuclear Reactor Theory*, Addison-Wesley Publishing, Company Inc.

LEÃO, S. C., MARTIN, A., *et al*, 2004. *Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria*. Brugges, Vanden Broelle.

LIMA, C. T. dos S., 2009, *Ensaio Neutronográfico para Estudos Morfológicos de Micobactérias*. Tese de DSc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

LINELL, F. & NORDEN, A., 1954, *Mycobacterium balnei; new acidfast bacillus occurring in swimming pools and capable of producing skin lesions in humans*. *Acta tuberc. scand.*, (Suppl. 33), pp. 1-84.

LOPES, J. D. R., 2001, *Caracterização Morfológica e Análise Quantitativa de Bactérias in vitro por Técnicas Nucleares de Medidas*. Tese de DSc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

LUIZ, L. da C., 2007, *Visualização de Escoamento Bifásico em Tubulações Metálicas por Neutronografia em Tempo Real*. Tese de MSc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

MA, M., CHENG, Y., *et al*, 2007, “Evaluation of Polymidoamine (PAMAM) dendrimers as drug carries of anti-bacterial drugs using sulfamethoxazole (SMZ) as a model drug”. *European Journal of Medicinal Chemistry*. v. 42, pp. 93-98.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J., 2004, *Microbiologia de Brock*. 10 ed. São Paulo, Prentice Hall.

MARASHI, M. K., 2000, “Analysis of absorbed dose distribution in head phantom in boron neutro capture therapy”. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, A 440, pp. 446-452.

MATOS, E. D., *et al.*, 2004, “Nontuberculosis Mycobacteria at a Multiresistant Tuberculosis. Reference Center in Bahia: Clinical Epidemiological Aspects”. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*; v. 8, n 4, pp. 296-304. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-86702004000400005&script=sci_arttext> Acesso em: 5/2011.

MENEZES, M. O., 1994, *Desenvolvimento e Aplicação da Técnica da Radiografia com Nêutrons por Conversão Direta e Indireta*. Tese de MSc., IPEN/CNEN, São Paulo, SP, Brasil.

MONTANARI, M. L. C., MONTANARI, C. A., PILÓ-VELOSO, D., 1998, “Sistemas transportadores de drogas”. *Química Nova*, São Paulo, v. 21, n. 4 (jul/ago).

NEUMANN, M, SCHULZE-RÔBBECKE, R., *et al*, 1997, “Comparison of method for isolation of mycobacteria from water”. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 70, pp. 3751-3753.

NEWKOME, G. R., YAO, Z. O., *et al*, 1985. “Cascade Molecules: A New Approach to Micelles”. *Journal of Organic Chemistry*. v. 50, pp. 2003-2006.

NIKEZIC, D., YU, K. N., 2004, “Formation and Growth of the Tracks in Nuclear Tracks Materials”. In: *Mat. Sci. and Eng.* R 26, pp. 51-123.

NOBEL PRIZE, 1938. Disponível em: <http://nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1938/fermi-bio.html> Acesso em: 11/2010.

OLIVEIRA, K. A. M., 2011, *Estudo de um Sistema de Imagem em Tempo Real para Radiografias com Nêutrons Rápidos*. Tese de DSc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

PADOVEZE, M. C, FORTALEZA, C. M, *et al*, 2007. “Outbreak of surgical infection caused by non-tuberculous mycobacteria in breast implants in Brazil”. *Journal of Hospital Infection*, v. 67, n. 2, pp. 161-167.

PALWADE, P. K., et al., 2006, "Chronic cutaneous disease caused by the rapid growers *Mycobacterium fortuitum* and *chelonae*", *British Journal of Dermatology*. v. 154, n. 4, pp. 774-775.

PATRI, A. K., MAJOROS I. J., BAKER J. R., 2002, "Dendritic polymer macromolecular carriers for drug delivery". *Current Opinion in Chemical Biology* 6, pp. 466-471.

PEIXOTO, E. M. A., 1996, **Elemento Química: Boro**. Disponível em: <<http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc04/elemento.pdf>>. Acesso em: 07-2011.

PELCZAR J. M. J., CHAN E. C. S, KRIEG N. R., 1996, **Microbiologia: conceitos e aplicações**. São Paulo, Makron Books.

PERNG, C-L., CHEN, H-Y., *et al*, 2012, "Identification of non-tuberculous mycobacteria by real-time PCR coupled with a high-resolution melting system". *Journal of Medical Microbiology*. v. 61, pp. 944-951.

PESSÔA, R. M, 1980, *Estudo de Resolução em Neutronografia com Nêutrons Térmicos*. Tese de Mestrado, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

PIERSIMONI, C., SCARPARO, C., 2008, "Pulmonary infections associated with non-tuberculous mycobacteria in immunocompetent patients". *The Lancet Infectious Diseases*, v. 8, n. 5, pp. 323-334.

PINHEIRO, R. L. N., 1979, *Neutronografia Aplicada ao Dimensionamento de Objetos Cilíndricos*, Tese de M.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro.

PFYFFER, G. E.; BROWN-ELLIOT, B. A.; WALLACE JR., R. J., 2003, "Mycobacterium: general characteristic, isolation, and staining procedures". In: MURRAY, R. R., BARON, E., *et al.* (eds), *Manual of Clinical Microbiology*. Washington, D. C.: American Society for Microbiology. pp. 531-559

PRICE, W. J., 1958, *Nuclear radiation detection*. New York, McGraw-Hill Book Company.

PRIMM, T. P., LUCERO, T. P., FALKINHAM, J. O., 2004, “Health impacts of environmental mycobacteria”, *Clinical Microbiology Reviews*, v. 17, n. 1, pp. 98-106.

QUAGLIANO, J. V e VALLARINO, L. M., 1969, *Chemistry*, 3 ed. New Jersey, Prentice-Hall.

REZWAN, M., LANEELLE, M. A., SANDER, P., *et al.* “Breaking Down the Wall: Fractionation of Mycobacteria”, *Journal of Microbiological Methods*, v. 68(1), pp.32-39, 2007.

RIEDER H. L., CHONDE T. M., MYKING H., *et al.*, 1998, “The Public Health Service National Tuberculosis Reference Laboratory and the National Laboratory Network: Minimum Requirements, Role and Operation in a Low-income Country”. In: *International Union Against Tuberculosis and Lung Disease*, Paris, France.

RUNYON E H., 1959, “Anonymous mycobacteria in pulmonary disease”. *Medical Clinics of North America*. v. 43, pp. 273-290.

RUNYON, E. H., WAYNE, L. G., KUBICA, G. P., 1974, “Family II Mycobacteriaceae”. In: BUCHANAN, R. E., GIBBONS, N. E. (eds), *Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology*, 8 ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.

SAMPAIO J. L., VIANA-NIERO C., *et al.*, 2006. “Enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR is a useful tool for typing Mycobacterium chelonae and Mycobacterium abscessus isolates”. *Diagnostic Microbiology and Infections Disease*. v. 55, n. 2, pp. 107-118.

SANTOS, J. E. S. C., 1977, *Neutronografia com Nêutrons Térmicos*. Tese de M.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

SANTOS, R. C., 1988, *Detecção de Fragmentos de Fissão e Partículas Alfa Utilizando o Detector Sólido de Traços CR-39*, Tese de M.Sc., CBPF, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

SCHIRM, J., OOSTENDORP, L. A., MULDER, J. G., 1995, “Comparison of Amplicor, in-house PCR, and Conventional Culture for Detection of Mycobacterium Tuberculosis in Clinical Samples”. *Journal of Clinical Microbiology*. v.33, pp. 3221-3224.

SILK E. C. H. e BARNES R. S., 1959, “Examination of Fission Fragments Tracks with an Electron Microscope”, *Philosophical Magazine*. v. 4, pp. 970-971.

SILVANI, M. I., 2001, *Tomografia Computadorizada com Nêutrons Térmicos e Detector Sensível a Posição*. Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

SIVASANKARI, P., KHYRIEM, A. B., *et al*, 2006, “Atypical mycobacterial infection among HIV seronegative patients in Pondicherry”. *The Indian Journal of Chest Diseases & Allied Sciences*, v. 48, pp. 107-109.

SOLAR, M. DEL, SALOMÓN, M., *et al*, 2005, “Rapidly growing mycobacteria-related skin infection after cosmetic mesotherapy”. *Folia Dermatológica*, v. 16, n. 3, pp. 127-135.

SOUZA, P. V. S., 2001, *A Criminalidade Genética*. São Paulo, RT.

STANNARD L. M., 1996. Disponível em : <http://web.uct.ac.za/depts/mmi/lsteyn/cellwall.html>. Acesso: 11/2010.

TAUHATA, L. *et al*, 2003, **Radioproteção e Dosimetria: Fundamentos**. 5 ed. Rio de Janeiro, IRD/CNEN.

TRABULSI, L. R., ALTERTHUM, F., GOMPERTZ, *et al*, 2002, *Microbiologia*. 3 ed. São Paulo, Atheneu.

TRABULSI, L. R. e ALTERTHUM, F., 2004, *Microbiologia*. 4 ed. São Paulo, Atheneu.

TOMALIA, D. A, *et al*, 1985, “Architectural Copolymers: Rod-Shaped, Cylindrical Dendrimers”, *Polymer Journal*. v.17, pp. 117-132.

TORTOLI, E., 2003, “Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s”. *Clinical Microbiology Reviews*. v.16, pp. 319-354.

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C. L., 2005, *Microbiologia*. 8 ed. Porto Alegre, Brasil, Artmed.

UEKI, S. Y. M., MARTINS, M. C., *et al*, 2005. “Nontuberculous mycobacteria: species diversity in São Paulo state, Brazil”. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. v. 41, n.1. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1676-24442005000100003>> Acesso: 21/06/2012.

USLAN D. Z., KOWALSKI T. J., *et al*, 2006, “Skin and soft tissue infections due to rapidly growing mycobacteria: comparison of clinical features, treatment, and susceptibility”. *Arch Dermatol*. v.142, n. 10, pp. 1287-1292.

VIANA-NIERO C., LIMA K.V., *et al*, 2008. “Molecular characterization of Mycobacterium massiliense and Mycobacterium bolletii in isolates collected from outbreaks of infections after laparoscopic surgeries and cosmetic procedures”. *Journal Clinical Microbiology*. v. 46, n. 3, pp. :850-855.

VIEIRA, N. C. S., 2006, *Biossensores de Glicose Nanoestruturados Baseados em Dendrímeros PAMAM e Filmes finos de In₂O₃:Sn*. Tese de M.Sc., Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Materiais Departamento de Física e Química/Instituto de Ciências Exatas- UNIFEI, Itajubá, MG, Brasil.

VÖGTLE, F.; GESTERMANN, S.; HESSE, R., 2000, “Functional dendrimers”. *Progress in Polymer Science*, Washington, v. 25, n. 7, pp. 987–1041.

WACHA, R., 1999, *Detecção de Microorganismos em Meios de Cultura pela Técnica Neutronográfica*, Tese de MSc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

YAM, W.C., YUEN, K.Y., 2006, “Diagnostic application of genotypic identification of mycobacteria”, *Journal of Medical Microbiology*. v. 55, pp. 529-536.

YOUNG, D. A., *et al*, 1958, “Etching of Radiation Damage in Lithium Fluoride”, *Nature*. v. 182, pp. 375-377.

ZAMBONI, C. B., 2007, *Fundamentos da Física dos nêutrons*. 1ª ed. São Paulo, Brasil, Livraria da Física.