

**UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM MEDICINA
REGENERATIVA E QUÍMICA MEDICINAL**

MARIA LUISA DE OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE UM FILME À BASE DE POLIURETANA IMPREGNADO
COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA PARA APLICAÇÃO EM CATETER
VENOSO**

**ARARAQUARA, SP
2024**

MARIA LUISA DE OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE UM FILME À BASE DE POLIURETANA IMPREGNADO
COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA PARA APLICAÇÃO EM CATETER
VENOSO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal da Universidade de Araraquara – UNIARA – como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Orientador: Prof. Dr. Maurício Cavicchioli
Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Eliane Trovatti

**ARARAQUARA, SP
2024**

FICHA CATALOGRÁFICA

O48d Oliveira, Maria Luisa de

Desenvolvimento de um filme à base de poliuretana impregnado com nanopartículas de prata para aplicação em cateter venoso/Maria Luisa de Oliveira. – Araraquara: Universidade de Araraquara, 2024.
104f.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química medicinal – UNIARA

Orientador: Prof. Dr. Maurício Cavicchioli

1. Dispositivo médico. 2. Biofilme. 3. Resistência antimicrobiana.
4. Antimicrobiano. 5. Staphylococcus Aureus. I. Título.

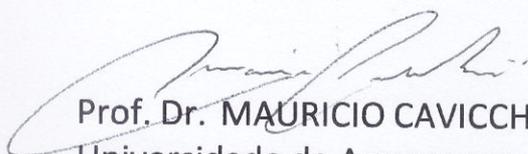
CDU 577.1

MARIA LUISA DE OLIVEIRA

Tese apresentada a Universidade de Araraquara - UNIARA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Araraquara, 27 de setembro de 2024.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. MAURICIO CAVICCHIOLI (Orientador)
Universidade de Araraquara – UNIARA

Documento assinado digitalmente

gov.br

EDUARDO JOSE NASSAR
Data: 10/10/2024 12:36:01-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. EDUARDO JOSÉ NASSAR
Universidade de Franca – UNIFRAN

Documento assinado digitalmente

gov.br

ALINE NATALIA DOMINGUES
Data: 10/10/2024 10:32:41-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a Dr^a ALINE NATALIA DOMINGUES
Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto - USP

Documento assinado digitalmente

gov.br

RENAN LIRA DE FARIAS
Data: 07/10/2024 14:25:11-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. RENAN LIRA DE FARIAS
Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro - PUC

Documento assinado digitalmente

gov.br

WANESSA FERNANDA ALTEI
Data: 04/10/2024 08:28:34-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr^a WANESSA FERNANDA ALTEI
Hospital de Amor de Barretos - SP

DEDICATÓRIA

Aos pesquisadores e professores que dedicaram sua vida em prol do conhecimento e da evolução da humanidade, pois cada parte da presente pesquisa tem um pouco da contribuição de cada um destes.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me guiar durante a vida!

Aos meus pais, ainda que ausentes, mas que me educaram e tornaram a minha trajetória possível para o alcance deste curso e desta pesquisa.

As minhas queridas filhas, Cláudia e Carolina, que não mediram esforços ficando distantes no Estado de Minas Gerais, para que eu pudesse realizar este curso e esta pesquisa em Araraquara (SP).

Ao meu orientador Prof. Dr. Maurício pelas orientações, ensinamentos, paciência e dedicação.

À minha coorientadora Profa. Dra. Eliane Trovatti pelas orientações, confiança e estímulos.

A pesquisadora Dra. Laís Roncalho pela cooperação e ensino durante os ensaios nos laboratórios multiusuários de análises químicas e de biomateriais.

A todos da minha família, que de forma direta ou indireta, sempre me incentivaram na vida acadêmica, especialmente a minha sobrinha Kelly Guidotti pela revisão gramatical desta tese.

Ao coordenador André Amaral, às secretarias Sandra Pavanelli e Rosana Pazini, que sempre estiveram à disposição para tirarem minhas dúvidas.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação, que sempre apoiaram e se disponibilizaram para a realização dos ensaios nos diversos laboratórios da Universidade de Araraquara - UNIARA.

“Há homens que lutam um dia e são bons, há outros que lutam um ano e são melhores, há os que lutam muitos anos e são muito bons. Mas há os que lutam toda a vida e estes são imprescindíveis”. Bertolt Brecht.

RESUMO

O atendimento à saúde, muitas vezes, pode exigir não apenas medicamentos, mas também necessitar do uso de dispositivos como cateteres em geral. No entanto, biofilmes bacterianos podem se formar nestes dispositivos levando à ocorrência de infecções. Por outro lado, sabe-se que partículas metálicas, por exemplo, nanopartículas de prata (Ag-NPs) têm propriedade antimicrobiana reconhecida pela comunidade científica. As Ag-NPs podem ser adicionadas a diversos polímeros como, por exemplo, as poliuretanas, para proporcionar uma atividade antimicrobiana por contato a estes materiais. Logo, neste trabalho foi desenvolvido um revestimento a partir de dispersão aquosa de poliuretana (PU) à base de óleo de mamona e contendo Ag-NPs com o objetivo de reduzir a adesão bacteriana. A preparação do revestimento (filmes finos) envolveu a adição de Ag-NPs em dispersões aquosas de PU (WBPU-1 e WBPU-2), fornecidas pela empresa Terra Azul LTDA e, posterior a secagem, foram formados filmes de WBPU-1 com concentrações de Ag-NPs de 0,05% , 0,08%, 0,1%, 0,2% e 0,4% m/m. Todos os filmes foram caracterizados por ensaios físico-químicos (espectroscopia na região do infravermelho e termogravimetria) e ensaios de citotoxicidade e antimicrobianos (testes de adesão e antibiofilme). Os filmes da WBPU-1 contendo 0,4% de Ag-NPs apresentaram maior inibição de biofilme, 20,47%. E da WBPU-2, o filme contendo 6400 ppm de Ag-NPs apresentou atividade antibiofilme significativa, $p < 0,05$, além de não ser citotóxico. Portanto, por meio desta pesquisa, obteve-se filmes antimicrobianos à base de óleo vegetal contendo Ag-NPs com potencial aplicação em dispositivos médicos.

Palavras-chaves: dispositivo médico; biofilme; resistência antimicrobiana; filme antimicrobiano; *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

Health care can often require not only medication, but also the use of devices such as catheters in general. However, bacterial biofilms can form on these devices, leading to infections. On the other hand, metallic particles, for example silver nanoparticles (Ag-NPs), are known to have antimicrobial properties recognized by the scientific community. Ag-NPs can be added to various polymers, such as polyurethanes, to provide these materials with antimicrobial activity on contact. Therefore, in this work a coating was developed from an aqueous dispersion of polyurethane (PU) based on castor oil and containing Ag-NPs with the aim of reducing bacterial adhesion. The preparation of the coating (thin films) involved adding Ag-NPs to aqueous PU dispersions (WBPU-1 and WBPU-2) supplied by the company Terra Azul LTDA and, after drying, WBPU films were formed with Ag-NPs concentrations of 0.05%, 0.08%, 0.1%, 0.2% and 0.4% m/m. All the films were characterized by physicochemical tests (infrared spectroscopy and thermogravimetry) and cytotoxicity and antimicrobial tests (adhesion and antibiofilm tests). WBPU-1 films containing 0.4% Ag-NPs showed greater biofilm inhibition, 20.47%. And for WBPU-2, the film containing 6400 ppm of Ag-NPs showed significant antibiofilm activity, $p < 0.05$, as well as not being cytotoxic. Therefore, through this research, antimicrobial films based on vegetable oil containing Ag-NPs were obtained with potential application in medical devices.

Keywords: medical device; biofilm; antimicrobial resistance; antimicrobial film; *Staphylococcus aureus*.

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1- Cateter intravenoso periférico, disposição em cores.....</i>	<i>6</i>
<i>Figura 2 - Imagem das partes do dispositivo intravascular (cateter flexível).....</i>	<i>7</i>
<i>Figura 3 - Dimensões do cateter indicado por cor.....</i>	<i>7</i>
<i>Figura 4- Reação de formação da poliuretana.....</i>	<i>11</i>
<i>Figura 5- Fisiopatogenia da infecção da corrente sanguínea.....</i>	<i>16</i>
<i>Figura 6- Biofilm.....</i>	<i>20</i>
<i>Figura 7- Biofilme na superfície de cateter venoso central.....</i>	<i>20</i>
<i>Figura 8- Nano Topografias a,b, c e d.....</i>	<i>30</i>
<i>Figura 9- Nanoestrutura média, (a) E.coli, (b) S.aureus.....</i>	<i>31</i>
<i>Figura 10- Imagens da E.coli em contato com a nanoestrutura de comprimento curto e alta densidade. A célula E. coli deformada (Figura 10A). Duas nanoestruturas (NS1 e NS2) interagiram com o lado da célula de E. coli na mesma posição sem penetrar (Figuras 10C e 10D).....</i>	<i>31</i>
<i>Figura 11- Imagem dos discos de WBPU impregnados com Ag-NPs nas concentrações I (0,05%), II (0,08%), III (0,1%), IV (0,2%) e V (0,4%). Secagem de 24 horas.....</i>	<i>41</i>
<i>Figura 12- Esquema de síntese da Poliuretana.....</i>	<i>46</i>
<i>Figura 13- Imagens dos filmes de PUs puras formadas após 24 horas de secagem das respectivas dispersões aquosas. Essas poliuretanas foram selecionadas em relação às características ópticas, aderência e fragilidade.....</i>	<i>47</i>
<i>Figura 14- Imagens dos filmes de PU puras formados após 96 horas de secagem de respectivas dispersões aquosas.....</i>	<i>49</i>
<i>Figura 15- Espectroscopia FTIR da película de WBPU na região do infravermelho com a técnica de refletância atenuada total da poliuretana pura e impregnada com AgNPs. Em A) WBPU, B), WBPU-Ag0,05, C) WBPU-Ag0,08, D) WBPU-Ag0,1, E) WBPU-Ag0,2 e F) WBPU-Ag0,4, respectivamente.....</i>	<i>50</i>
<i>Figura 16- Curva termogravimétrica das amostras: A) WBPU-1; B) WBPU-1-Ag0.05; C) WBPU-1-Ag0.08; D) WBPU-1-Ag0.1; E) WBPU-1-Ag0.2 and F) WBPU-1-Ag0.4.....</i>	<i>52</i>
<i>Figura 17- (a,b) - Microscopia eletrônica de varredura (MEV). a) Imagem da superfície da película de poliuretana incorporada com nanopartículas de prata; b) Microscopia eletrônica de varredura (MEV). Imagem da película de poliuretana, seção transversal, incorporada com nanopartículas de prata.....</i>	<i>53</i>
<i>Figura 18- Etapas dos testes de adesão e antibiofilme. As últimas imagens em paralelo, são representativas de uma das etapas finais do experimento. Os pontinhos claros nas placas de Petri correspondem a UFC das diluições seriadas das amostras.....</i>	<i>55</i>
<i>Figura 19- Resultados de carga microbiana de S. aureus para o teste de adesão expressos em Log₁₀ UFC/mL.....</i>	<i>56</i>
<i>Figura 20- Resultados de carga microbiana de S.aureus para o teste antibiofilme expressos em Log₁₀ UFC/mL.....</i>	<i>57</i>
<i>Figura 21- Ensaio de viabilidade celular dos filmes de PU impregnados com nanopartículas de Ag.....</i>	<i>60</i>
<i>Figura 22- Viabilidade celular x Métodos de desinfecção de amostras de poliuretanas.....</i>	<i>61</i>

<i>Figura 23- Terceiro ensaio de citotoxicidade: PU) WBPU-1; 1) WBPU-1-Ag0.05; 2) WBPU-1-Ag0.08; 3) WBPU-1-Ag0.1; 4) WBPU-1-Ag0.2 e 5) WBPU-1-Ag0.4.</i>	<i>62</i>
<i>Figura 24- Porcentagem de viabilidade celular de Fibroblastos Humanos Dérmicos (HDF-Ad) na presença de amostras de poliuretana.</i>	<i>66</i>
<i>Figura 25- Placas de Petri com filmes de WBPU-2 impregnadas com Ag-NPs (secagem no primeiro dia).</i>	<i>68</i>
<i>Figura 26- Espectrofotômetro Bruker Vertex 70.....</i>	<i>68</i>
<i>Figura 27-Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier da WBPU2 exibindo as bandas dos filmes com as concentrações WBPU2-Ag3.2 (6400 ppm), WBPU2-1.6 (3200 ppm), WBPU2-Ag0.4 (800 ppm) e a PU pura (WBPU2).</i>	<i>69</i>
<i>Figura 28- Espectro de termogrametria da WBPU-2 pura e impregnada com Ag-NPs nas concentrações de WBPU2-Ag0.1 (200 ppm), WBPU2-Ag0.4 (800 ppm), WBPU2-Ag1.6 (3200 ppm) e WBPU2-Ag3.2 (6400 ppm). Inserido: Visão ampliada da curva de tg entre 450 e 600 °C.</i>	<i>70</i>
<i>Figura 29- Imagens representativas de amostras dos filmes da PU sintetizada impregnados com Ag-NPs nas concentrações de 800 ppm (mais amarelada) e 200 ppm (mais clara) cortados para ensaios microbiológicos e físico-químico (DRX).....</i>	<i>71</i>
<i>Figura 30- Espectro de DRX das amostras de WBPU pura e impregnada com Ag-NPs com as concentrações de 200 ppm, 800 ppm e 3200 ppm de Ag-NPs (correspondentes as WBPU pura e impregnadas, WBPU-Ag0.1, WBPU-Ag0.4 e WBPU-Ag1.6, respectivamente).....</i>	<i>71</i>
<i>Figura 31- Espectro de DRX das amostras de WBPU2 pura e impregnada com Ag-NPs com as concentrações de 200 ppm, 800 ppm e 3200 ppm de Ag-NPs (correspondentes as a WBPU-2 pura e impregnadas, WBPU2-Ag0.1, WBPU2-Ag0.4 e WBPU2-Ag1.6, respectivamente).</i>	<i>72</i>
<i>Figura 32- Percentual de viabilidade celular em relação aos filmes de PU com diferentes concentrações de Ag-NPs, expostos ao meio de cultura em 24 horas.</i>	<i>73</i>
<i>Figura 33- Amostras de WBPU-2 em quatro concentrações com viabilidade acima de 70%, e, amostra de WBPU-1 com viabilidade abaixo de 70%.</i>	<i>73</i>
<i>Figura 34- Gráfico de mediana do ensaio de adesão com valores mínimo e máximo em forma de box-plot ilustrando os resultados significativos identificados pelo teste múltiplas comparações de Dunn.</i>	<i>75</i>
<i>Figura 35- Gráfico de mediana do ensaio de biofilme com valores mínimo e máximo em forma de box-plot ilustrando os resultados significativos identificados pelo teste múltipla comparações de Dunn.....</i>	<i>75</i>

ÍNDICE DE TABELAS

<i>Tabela 1 - Variação de massa seca durante o período de 6 dias de 4 tipos de poliuretanas:</i>	<i>48</i>
<i>Tabela 2 - Teste de adesão</i>	<i>56</i>
<i>Tabela 3 - Teste de antibiofilme</i>	<i>57</i>

ÍNDICE DE QUADROS

<i>Quadro 1- Nomes dos filmes de WBPU-1 correspondentes as respectivas concentrações</i>	<i>37</i>
<i>Quadro 2- Etapas dos testes de adesão e antibiofilme</i>	<i>44</i>
<i>Quadro 3- Nomes dos filmes de WBPU-2 com as respectivas concentrações</i>	<i>67</i>

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Ag-NPs	Nanopartículas de prata
AT	Ácido tânico
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CIVP	Cateter Intravenoso Periférico
CIM	Concentração Inibitória Mínima
COREN-AI	Conselho Regional de Enfermagem de Alagoas
CVC	Cateter Venoso Central
Cu-NPs	Nanopartículas de cobre
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmico
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier
NPs	Nanopartículas
NS	Nanoestruturas
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MEV-FIB	Microscopia Eletrônica de Varredura e Feixe de Íon Focalizado
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
PU	Poliuretana
ICSRC	Infecção da Corrente Sanguínea Relacionada a Cateter
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
TGA	Análise termogravimétrica
TSA	Ágar de soja tríptico
UV-vis	Espectroscopia por Luz Ultravioleta visível
WBPU-1	Water-Based Polyurethane -1
WBPU-2	Water-Based Polyurethane -2
WBPU-3	Water-Based Polyurethane -1 lote 3

SUMÁRIO

RESUMO	I
ABSTRACT	II
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Cateter Intravenoso Periférico (CIVP).....	6
2.2 Cateter Venoso Central de Inserção Periférica (PICC).....	8
2.3 Cateter Venoso Central (CVC).....	8
2.4 Material e Design	9
2.5 Poliuretana (PU).....	10
2.6 Fabricação de Cateter.....	11
2.7 Tempo de Permanência.....	12
2.8. Recomendações da ANVISA para cateter periférico	13
2.8.1. Higiene das mãos	14
2.8.2 Seleção do cateter e sítio de inserção	14
2.8.3 Antissepsia da pele	14
2.8.4 Estabilização.....	14
2.8.5 Coberturas	14
2.8.6 <i>Flushing</i> e manutenção do cateter	15
2.8.7 Cuidados com sítio de inserção	15
2.8.8 Remoção do cateter.....	15
2.9 Fisiopatogenia da Corrente Sanguínea Relacionada a Cateter	15
2.10 Resistência Antimicrobiana, Cateter e Boas Práticas do Cuidado.....	17
2.11 Biofilme	18
2.12 Outros Problemas Associados a Cateter Venoso	22
2.13 Avanços da Tecnologia.....	22
2.14 Estratégias de Modificações de Superfície	26

2.15 Atividade Antimicrobiana da Prata	27
2.16 Interação Física das Nanoestruturas com as Bactérias	29
2.17 Metais Pesados.....	32
3 OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo geral.....	34
3.2 Objetivos específicos	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 Preparação dos Filmes Puros de Poliuretanas	35
4.2 A Escolha das Nanopartículas de Prata.....	36
4.3 Preparação dos Filmes de Poliuretanas Impregnados com Nanopartículas de Prata (WBPU-Ag).....	37
4.4 Caracterização Físico - Química dos Filmes de PU.....	38
4.5 Ensaios Biológicos dos Filmes de WBPU Pura e Impregnados com Ag- NPs	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES (PARTE I).....	45
5.1 Poliuretana (WBPU).....	45
5.2. Escolha da Poliuretana	47
5.3 Filmes Formados a Partir da WBPU-1 com as Ag-NPs	48
5.4 Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflectância Total Atenuada (FTIR-ATR)	50
5.5 Análise Termogravimétrica (TGA) das Amostras de Filmes Impregnados com Prata.....	51
5.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	52
5.7 Ensaio de Determinação da Atividade Antibacteriana para Antibiofilme dos Filmes Impregnadas com Ag-NPS	53
5.8 Ensaios de Citotoxicidade dos Filmes de WBPU-1 Impregnados com Nanopartículas Comerciais de Prata.....	59
5.9 Conclusão da Parte I.....	63

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES (PARTE II)	65
6.1 Síntese de Novas Poliuretanas	65
6.2 Nanopartículas de Prata	65
6.3 Ensaio de Citotoxicidade da WBPU-2.....	66
6.4 Preparação dos Filmes de PU (WBPU-2) Impregnados com Nanopartículas de Prata	67
6.5 Ensaio de FTIR-ATR da WBPU2	68
6.7 Difractometria de Raio X.....	70
6.8 Ensaio de Citotoxicidade da WBPU-2 (Sintetizada) e da WBPU1, Puras e Impregnadas com Ag-NPs.....	72
6.9 Ensaio de Adesão e Antibiofilme.....	74
7 CONCLUSÃO FINAL	77
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
APÊNDICE A: SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA (MÉTODO BOTTOM-UP)	85
APÊNDICE B: PROTOCOLO DE DESINFECÇÃO POR GLUTARALDEÍDO	93
APÊNDICE C: PROTOCOLO DE ENSAIO DE CITOTOXICIDADE DAS AMOSTRAS DE WBPU-1	95
APÊNDICE D: PROTOCOLO DE ENSAIO DE CITOTOXICIDADE DAS AMOSTRAS DE WBPU-1- e WBPU-2-	97
APÊNDICE E: TESTE DE KRUSKAL-WALLIS DE ADESÃO	98
APÊNDICE F: TESTE DE KRUSKAL-WALLIS DE BIOFILME	101

1 INTRODUÇÃO

Na área da saúde, até 85% dos pacientes hospitalizados em algum momento irão fazer uso de um dispositivo para acesso venoso (KEOGH; FLYNN; MARSH, *et al.*, 2015). Aproximadamente 70% dos pacientes hospitalizados requerem cateter intravenoso periférico (CIP) e 69% dos CIPs apresentam falhas antes de finalizar a terapia (MARSH; WEBSTER; LARSON, *et al.*, 2018).

No âmbito hospitalar, encontram-se diferentes dispositivos médicos, entre eles, os cateteres venosos destinados à passagem de fluidos, os quais foram desenvolvidos para procedimentos na área de saúde a serem executados por profissionais habilitados. São utilizados em terapia endovenosa que, por sua vez, é definida como a administração de fluidos ou drogas, ou ambos, em geral com circulação através de venopunção (CLAYTON; ENTWISTLE; PICKERING, 1999).

Os cateteres intravenosos periféricos (CIVP) são dispositivos de acesso endovenoso invasivo, que correspondem a atividades de alta frequência relacionadas à assistência à saúde no ambiente hospitalar (MILIANI; TARAVELLA; THILLARD *et al.*, 2017).

Em geral, há dois tipos principais de cateteres, o CIVP rígido (agulhado) e o flexível. O CIVP flexível tem a recomendação de período de troca entre 72 e 96 horas a depender do tipo/modelo e material constituinte e, o CIVP rígido que é usado para medicações rápidas, tem indicação para um período mais curto, até 24 horas (PARECER COREN-SP N° 006/2022).

Além disso, as boas práticas do cuidado com o manejo da prescrição, inserção, fixação, manutenção e retirada dos CIVPs visam minimizar os fatores de risco para os pacientes (PARECER COREN-SP N° 006/2022).

Apesar disto, os CIVPs são associados a relatos de eventos adversos, tais como: flebite, oclusão, infiltração, extravasamento de sangue, hematoma e infecções causadas pela formação de biofilme no cateter, que podem prejudicar a administração de medicamentos e causar danos à saúde do paciente, (MILIANI; TARAVELLA; THILLARD *et al.*, 2017).

A taxa global de eventos adversos relacionados a cateter periféricos não foi claramente estimada pelos estudos como parte composta de eventos adversos clínicos e mecânicos. A maioria dos estudos foram com ênfase nos eventos adversos

de flebite, infiltração e infecções relacionadas à CIVP. A incidência de flebite reportada oscila entre 2 a 80%, a de infiltração atingem 30% e, por outro lado, a incidência de infecção relacionada as linhas periféricas são menores comparado as linhas de cateter central, no entanto, há possibilidades de sépsis graves (MILIANI; TARAVELLA; THILLARD; 2017). Além disso, a trombose e a flebite representam fatores de risco para infecção (MAKI et.al., 2006 apud KEOGH, 2014).

Os eventos adversos são classificados como clínicos ou mecânicos. Dentro dos clínicos, cita-se: o edema, hematoma no local de inserção, extravasamento de fluido ou sangue e suspeita de sépsis. Os eventos mecânicos, incluem: remoção acidental do cateter, oclusão, refluxo sanguíneo e ruptura do sistema fechado, por exemplo: ruptura do cateter (MILIANI; TARAVELLA; THILLARD; 2017).

Nos EUA, a taxa de infecção da corrente sanguínea relacionada à cateter venoso central é de aproximadamente 3% e, de cateter intravenoso periférico é de 0,1% (MAKI et.al., 2006 apud KEOGH, 2014). No entanto, os cateteres intravenosos periféricos são os mais usados durante a hospitalização (MILIANI; TARAVELLA; THILLARD; 2017).

Uma das principais causas de infecção relacionada à assistência à saúde (IRAS) está associada ao uso de cateter venoso. Por isso, os cateteres de longa permanência, geralmente dispõem de mecanismos para diminuir a probabilidade de colonização por bactérias (BRASIL, 2017).

A probabilidade de infecção se eleva com o aumento do número de dias de uso do cateter (TARDIVO, et.al., 2008.; SALOMONI et.al., 2020.).

O biofilme refere-se ao crescimento de agregado de bactérias, onde ocorre a autoprodução de uma matriz de substância extracelular polimérica que promove propriedades físicas e químicas nessa comunidade, conferindo-lhe, por exemplo, aumento da tolerância a antimicrobianos (PARLAK; RICHTER-DAHLFORS, 2020).

O biofilme formado em cateteres tornou-se a fonte mais importante de infecção relacionada à assistência e, por isto, representa uma séria ameaça à saúde humana (LI; SUN; ZHANG, et al., 2021).

Sobre os agentes bacterianos, destaca-se que o *S. aureus* está entre os microrganismos que pode participar dos processos de adesão e causar problemas de saúde pública e econômica (KASNOWSKI; MANTILLA; FRANCO, 2010).

E as outras características do material como rugosidade e molhabilidade também irão influenciar no processo de adesão bacteriana (OLMOS; BENITO, 2021).

Sobre os avanços tecnológicos, na literatura, encontra-se artigos que discorrem sobre estratégias de combate à infecção por meio de revestimentos antimicrobianos para dispositivos médicos (KNETSCH, 2011; WU, 2021).

Essas discussões sobre a ocorrência de infecção relacionada à assistência à saúde através do uso de dispositivos, prevalecem há anos. Confirma-se essa problemática por meio de publicações e monitoramento contínuo feito pelos profissionais de saúde, pesquisadores interdisciplinares e o entendimento sobre a interação entre materiais e corpo humano (PARECER COREN-SP N° 006/2022; ROSENTHAL, et al., 2020).

Mesmo aplicando técnicas assépticas rigorosas, as estimativas dos EUA registraram que o uso de 1 em 20 (5%) dos 7 milhões de cateteres centrais inseridos anualmente estiveram associados a infecção da corrente sanguínea. Dentro deste contexto, os cateteres com propriedades antimicrobianas têm sido propostos como um meio de proteção adicional para diminuir o risco de infecção (ROE; KARANDIKAR; BONN-SAVAGE, et al., 2008). Porém, há descrições na literatura sobre dificuldades quanto ao processo de fabricação de cateter intravenoso periférico com revestimento antimicrobiano (LEE; JEONG; JO; et al., 2021).

Assim, ainda é altamente desejável obter-se revestimentos com propriedade antiaderente, especialmente para aplicação em cateter venoso, pois a adsorção de proteínas na superfície de substratos favorece a formação de biofilmes (BLACKMAN; QIU; CASS, et al., 2021).

Em relação às propriedades ópticas, mecânicas e químicas desejáveis para os cateteres venosos, cita-se: a transparência para permitir a visualização do retorno sanguíneo, a flexibilidade, que não dobre, não desprendam partículas e não favoreçam a adesão de proteínas sanguíneas (KNETSCH; KOOLE, 2011.; AZEREDO, et.al., 2012.; Ficha Técnica Cateter Intravenoso GLOMED, 2024).

Os cateteres vasculares são constituídos de polímeros sintéticos (MARINO, 2015). A poliuretana (PU) é bastante versátil e capaz de formar diversos materiais, dentre eles, revestimentos para pisos, tintas e filmes transparentes (QUINI; 2013).

Logo, para recobrir dispositivos com filmes transparentes, podem ser utilizadas dispersões de PU. Neste trabalho, foram adicionadas nanopartículas de prata (Ag-NPs) às dispersões aquosas de PU com o objetivo de se obter filmes com propriedades antimicrobianas.

Contudo, esta pesquisa propõe o desenvolvimento de um filme de poliuretana impregnada com nanopartículas de prata, que tenha potencial para ser utilizado como revestimento de cateter, preferencialmente de linhas periféricas e curtos, com propriedades antimicrobianas e mecânicas melhoradas e aplicáveis aos processos de fabricação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

É estimado que ocorram 250.000 infecções da corrente sanguínea a cada ano e que 80.000 a 120.000 são relacionadas a cateter, conforme o *Center for Disease Control and Prevention* (CDC). Os patógenos mais frequentes em culturas de cateter venoso central são os *Staphylococcus aureus* e estafilococos coagulase-negativos (frequente o *S. epidermidis*), além de serem comuns em infecção da corrente sanguínea relacionada a cateter (CASIMERO; RUDDOCK; HEGARTY, et al., 2020).

Nos EUA, são inseridos cerca de cinco milhões de cateteres venosos centrais e 330 milhões de cateteres venosos periféricos. Além disso, estima-se que 30 - 80% dos pacientes irão usar cateter venoso periférico em algum momento durante a estadia hospitalar. Os cateteres são instrumentos para realizar tratamentos através do acesso vascular, em contrapartida, podem servir como porta de entrada para infecções. Ressalta-se que a probabilidade de ocorrência de infecção da corrente sanguínea relacionada a cateteres venosos centrais é estimada em cerca de 64 vezes maior do que com outros dispositivos para acesso vascular (CASIMERO; RUDDOCK; HEGARTY, et al., 2020).

Em vista disso, devido à variedade de tipos de cateteres disponíveis no mercado, buscou-se iniciar os estudos a partir de consulta às diretrizes, ou *guidelines* do *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) sobre a prevenção de infecções relacionadas a cateter intravascular.

As diretrizes para prevenção de infecções relacionadas ao cateter intravascular do CDC (2011), atualizadas em 2017, classificam os tipos de cateteres para acesso venoso e arterial, entre eles: cateter venoso periférico; arterial periférico; de linha mediana; venoso não tunelizado; arterial pulmonar; venoso central de inserção periférica; totalmente implantado, e por fim, o umbilical.

Por um lado, existe uma ampla variedade de cateteres intravenosos periféricos desenvolvidos com designs para administração de fluidos em curto tempo. Por outro lado, os cateteres venosos centrais são projetados para acesso de veia profunda e aplicações de média e longa permanência (CASIMERO; RUDDOCK; HEGARTY, et al., 2020).

Os formatos comuns de cateteres vasculares são: cateteres vasculares periféricos (arterial e venoso), cateteres venosos centrais e cateteres centrais de inserção periférica (MARINO, 2015).

Conforme os autores CASIMERO e MARINO, cada cateter tem a sua especificidade, levando em conta a sua durabilidade, todavia, cada qual com a sua inserção conforme a necessidade de interposição, levando em conta a localização da inserção dos mesmos. Contudo, certifica-se a importância do manuseio adequado do cateter e suas funcionalidades.

2.1 Cateter Intravenoso Periférico (CIVP)

Os cateteres periféricos são dispositivos inseridos em veias superficiais, têm comprimento entre 35 e 52mm, constituídos de *teflon* ou silicone, de curta durabilidade, de baixo custo e são os mais utilizados na prática clínica (ZERATI; WOLOSKER; LUCCIA, et al., 2017).

Além disso, os cateteres vasculares são constituídos de polímeros quimicamente inertes (MARINO, 2015).

Há no mercado uma variedade enorme de cateteres, conexões e acessórios (ANVISA, 2022). Para exemplificar, é destacado o cateter básico flexível conhecido pelo nome comercial “jelco”, cuja imagem comercial está na figura 1. A figura 2 exibe a imagem das partes de um CIVP desmontado e a figura 3 explica as dimensões dos cateteres relacionadas às cores do dispositivo.



*Figura 1- Cateter intravenoso periférico, disposição em cores.
Fonte: <https://www.hospitalardistribuidora.com.br/cateter-intravenoso-jelco/>*

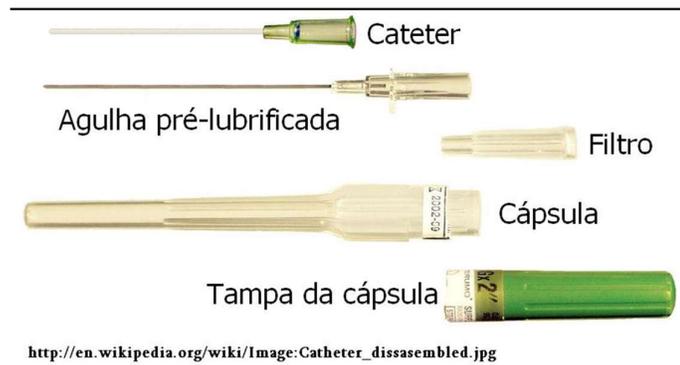


Figura 2 - Imagem das partes do dispositivo intravascular (cateter flexível).
 Fonte: https://pt.wikipedia.org/wiki/Cateter_vascular

Sistema Inglês Polegadas	Milímetros (Øxcomprimento)	Cor do canhão
14G 2	2,1x50mm	LARANJA
16G 2	1,7x50mm	CINZA
18G 1 3/4	1,3x45mm	VERDE
20G 1 1/4	1,1x65mm	ROSA
22G 1	0,9x25mm	AZUL
24G 3/4	0,7x19mm	AMARELO



Figura 3 - Dimensões do cateter indicado por cor.
 Fonte: <https://www.hospitalardistribuidora.com.br/cateter-intravenoso-jelco/p>

2.2 Cateter Venoso Central de Inserção Periférica (PICC)

Os cateteres venosos centrais de inserção periférica (PICC) são inseridos através de uma veia superficial ou profunda da extremidade superior ou inferior até a veia cava. Destaca-se que em uma pesquisa realizada no âmbito hospitalar em que os procedimentos dos PICCs foram eco guiados e posicionados com o recurso da fluoroscopia, foi concluído que ocorreu uma baixa incidência de complicações, além de ser considerado o dispositivo de escolha em acesso vascular central (DI SANTO; TAKEMOTO; NASCIMENTO, et al., 2017).

Sobre o cateter venoso central de inserção periférica, encontram-se medições de 20 a 65 cm, calibre de 1 a 6 French (Fr), um a três lúmens, valvulado ou não valvulado. As características do modelo são: flexíveis, radiopaco de paredes lisas e homogêneas. O material é de silicone, polietileno, poliuretano ou carbonato e as agulhas bipartidas, metálicas ou plásticas, para o descarte posterior ao uso. Uma das vantagens fundamentais desse modelo de cateter é o de ter custo inferior ao do cateter venoso central inserido cirurgicamente. Entre as principais desvantagens está a necessidade de treinamento especial para inserção e manutenção do cateter (DI SANTO; TAKEMOTO; NASCIMENTO, et al., 2017).

Segundo o que os autores relatam acima, “Evidências demonstraram que o dispositivo não é isento de complicações, tais como trombose venosa profunda (TVP), tromboflebitis, oclusões do cateter, pseudoaneurismas arteriais e infecções”.

2.3 Cateter Venoso Central (CVC)

Entende-se por cateter venoso central o dispositivo com uma ponta que se encontra dentro do terço proximal da veia cava superior, do átrio direito, ou da veia cava inferior. Os cateteres podem ser inseridos através de uma veia periférica ou uma veia central proximal, mais frequentemente a jugular interna, subclávia, ou veia femoral, conforme aponta BRANDÃO NETO, R. A (2015).

O cateter venoso central é constituído de silicone ou poliuretano e todos possuem uma tira radiopaca, o que permite a sua observação (KORAN; NEWBERRY, 2001 apud BANHA; VIVAS; PIRES, 2009). O dispositivo pode ser ‘não tunelizado’ ou ‘tunelizado’, e ainda, tunelizado semi-implantável ou implantável.

Os cateteres tunelizados semi-implantáveis passam por um trajeto subcutâneo até ser introduzido numa veia central. Há dois tipos principais de cateter

semi-implantáveis: um de modelo mais maleável e geralmente com duas pontas simétricas dos lúmens, conhecido como Hickman e, outro modelo mais rígido com pontas capazes de minimizar a recirculação do sangue (lúmens com pontas simétricas, assimétricas ou separadas) chamado de *Permcath*. Ambos têm o anel de Dacron, posicionado no interior do túnel subcutâneo, que provoca uma reação inflamatória e consequente aderência ocasionando melhor fixação do cateter (ZERATI; WOLOSKER; LUCCIA, et al., 2017).

Os cateteres tunelizados são de procedimentos médicos uma vez que passam por um trajeto subcutâneo até o nível venoso central, isto é, são implantados cirurgicamente além disso, têm longa duração. Os modelos mais conhecidos são: Hickman® e o Broviac®, (BANHA; VIVAS; PIRES, 2009).

Contudo, o cateter central de inserção periférica, que não é tunelizado, não necessita de procedimento cirúrgico e pode ser realizado por profissional médico e enfermeiro habilitado.

2.4 Material e Design

Existe uma grande variedade de modelos e especificações para cada tipo de cateter, como dispositivo com “plástico sobre agulha”, “plástico por dentro da agulha”, materiais constituintes, formato para inserção; tempo de permanência; características definidoras como biocompatibilidade, flexibilidade, uso e manutenção, (ARAÚJO; 2003). Além de outras peculiaridades específicas de design de cada dispositivo conforme procedimento técnico e finalidade.

Em relação ao design, os cateteres são projetados com um ou mais lúmens para atender às diversas demandas da clínica (LEE; JEONG; JO, et. al., 2021).

Os CIVPs de curta duração fabricados em teflon ou silicone e inseridos em veias periféricas, têm custo reduzido e são os mais utilizados na prática clínica em pacientes internados (ZERATI; WOLOSKER; LUCCIA, et al., 2017).

Em contrapartida, os cateteres venosos centrais são projetados para acesso de veia profunda e aplicações para média e longa permanência (CASIMERO; RUDDOCK; HEGARTY, et al., 2020).

Os cateteres periféricos superficiais de curta duração podem ser metálicos, em aço inoxidável ou de outras matérias primas, como o Politetrafluoroetileno (PTFE) / Fluoroetileno propileno (FEP), patenteado e conhecido como Teflon® FEP, e o

copolímero poliéster (Poliuretano), patenteado e conhecido como Vialon® (Parecer Técnico N. 007/2020 do COREN-AI).

Os materiais mais comuns para a fabricação de cateteres são: o PTFE, o poliuretano, silicone, a poliamida e o poliéster. Os cateteres flexíveis de poliuretano estão associados a menos complicações infecciosas comparados aos confeccionados de cloreto de polivinil ou de polietileno (BRASIL, 2017).

No entanto, não devem permanecer no interior de incubadoras e berços aquecidos durante o acesso venoso porque a exposição a temperatura nesses ambientes pode tornar o cateter mais flexível, dificultando a venopunção. Os cateteres rígidos podem lesionar a camada íntima das veias, contribuindo para flebites, formação de trombos e obstruções, o seu uso é restrito para punções intermitentes. O silicone é mais utilizado em cateteres de longa duração, como os cateteres venosos centrais temporários, cateteres venosos centrais de inserção periférica e cateteres tunelizados e totalmente implantáveis. É considerado o material mais resistente à dobra, mais flexível e maior estabilidade a longo prazo quando comparado a poliuretana (BRASIL, 2017).

Por conseguinte, é importante considerar as propriedades desses materiais. Os polímeros sintéticos constituintes desses cateteres vasculares são quimicamente inertes, biocompatíveis e resistentes à degradação química e térmica; mais amplamente usado o poliuretano e silicone (MARINO, 2015).

Ademais, as características de superfície, como a porosidade e textura devem ser levadas em conta para melhorar as propriedades antiaderentes dos dispositivos biomédicos.

2.5 Poliuretana (PU)

Os produtos formados de poliuretana têm diversas aplicações no mercado, por exemplo: espumas rígidas, flexíveis, tintas e impermeabilizantes, (QUINI; 2013).

Os impermeabilizantes de poliuretano são geralmente produtos bicomponentes, formados por uma reação entre um composto contendo hidroxilas (polióis) e outro por isocianatos, ambos com baixa viscosidade. O tempo de manuseio de espalhamento dessa mistura é chamado de *gel time* ou *pot life* e, após esse tempo ocorre aumento da viscosidade, solidificação do produto e formação da membrana, (QUINI; 2013).

A equação de formação da poliuretana é mostrada na figura 4.

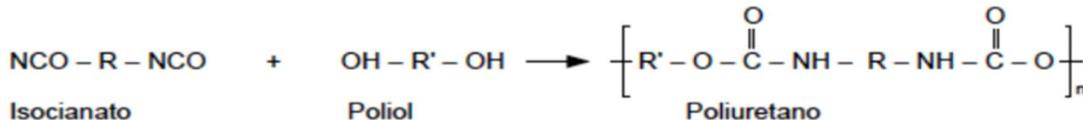


Figura 4- Reação de formação da poliuretana.
Fonte: QUINI, 2013.

Segundo QUINI, 2013:

Os compostos contendo hidroxilas podem variar quanto à massa molar, natureza química e funcionalidade, podendo ser poliéteres, poliésteres ou possuir estrutura hidrocarbônica. Os isocianatos podem ser aromáticos, alifáticos, cicloalifáticos ou policíclicos.

As poliuretanas podem ou não conter solventes ou componentes voláteis para reduzir a viscosidade e, há flexibilidade quanto ao uso de reagentes o que permite a obtenção de uma variedade de formulações com propriedades físicas e químicas mediante a necessidade do projeto (QUINI; 2013). O uso de estruturante, por exemplo, é feito com a finalidade de aumentar a resistência à tração.

A membrana de PU bicomponente também é definida como “produto a base de poliuretano, formado a partir da polimerização a frio de polióis e isocianatos, moldado no local da aplicação em uma ou mais camadas, com ou sem uso de estruturante” (NBR 15487, 2007). Além disso, os requisitos para uma membrana de PU, são: homogeneidade, espessura podendo variar conforme a necessidades de aplicação e aderida ao substrato; a relação entre os dois componentes (A + B) deve ser balanceada para formar uma membrana que seja perfeita e uniforme, conforme proporção em massa definida pelo fabricante. Os requisitos mínimos para o desempenho de uma membrana de poliuretano sem estruturante, incluem: resistência à tração mínima, resistência ao rasgo, flexibilidade a baixa temperatura, entre outros, (NBR 15487, 2007).

2.6 Fabricação de Cateter

A fabricação de cateter venoso central de inserção periférica (PICC) de multi-lúmen é feita através de extrusão do polímero. Para esse processo, a ponta e a matriz do tubo devem ser projetadas considerando a velocidade do fluxo do polímero fundido e a deformação do extrudado final. Por exemplo, um problema de espessura e

ovalidade reportado da parede do tubo desse tipo de cateter foi resolvido através de cálculo numérico e um novo design da matriz com ponta elipse. Esses tubos foram fabricados de acordo com os requisitos de diâmetro, ovalidade e espessura de parede. Para estabilizar a fabricação desses PICC, o estudo envolveu entendimento das propriedades mecânicas, de viscosidade, design, modelagem matemática e modelo experimental (LEE; JEONG; JO; CHOI; KIM., 2021).

Há muitos tipos de cateteres, incluído o PICC, para diferentes funções dentro dos vasos sanguíneos, que são fabricados em formatos menores e mais complexos devido aos avanços de intervenção e demandas médicas. Os cateteres são produzidos por extrusão de polímeros que é adequado à fabricação de tubos contínuos (LEE; JEONG; JO; CHOI; KIM., 2021).

A extrusão é um método em que é aplicada energia térmica e compressão para a fabricação de tubos (metálico ou polimérico), os quais são esticados a uma velocidade constante e depois são resfriados. O método de extrusão aplicado para a fabricação de tubo de cateter é através do polímero em pelotas fundido, usando uma matriz e uma ponta, que servem como moldes para produzir o formato desejado. O polímero que flui através da matriz e ponta tem propriedade de fluido não-Newtoniano no qual a viscosidade varia com a temperatura e tensão de cisalhamento, por causa disto, é difícil definir os parâmetros do fluxo (LEE; JEONG; JO; CHOI; KIM.,2021).

Portanto, durante o processo de fabricação ocorre com frequência a fratura por fusão e dificuldade para predizer a forma final do produto. Logo, para a produção de um produto final com alta precisão é necessário considerar as características reológicas do polímero fundido. Diversos estudos têm sido conduzidos para otimizar o processo de fabricação. Foi descoberto que o corte transversal da matriz deve ser considerado primordial para a obter tubos com boa forma, visto que, o inchamento da matriz e a taxa do fluxo de gás são fatores que irão influenciar durante o processo de fabricação (LEE; JEONG; JO; CHOI; KIM., 2021).

2.7 Tempo de Permanência

Para proceder à troca dos cateteres, os profissionais de saúde seguem os protocolos institucionais, que geralmente se baseiam nas recomendações da ANVISA, alinhadas às diretrizes do CDC.

Em adultos, a troca de cateter venoso periférico não é recomendada em período inferior a 96 horas (Anvisa, 2017). Contudo, ressalta-se a avaliação rotineira dos profissionais de saúde quanto à necessidade de troca de cateteres dentro deste período de acordo com critérios que incluem sinais de inflamação, infecção e outros. Na literatura, encontra-se recomendações sobre o período de troca em até 72 horas para cateteres periféricos flexíveis de "Teflon"(flúor etileno propileno) da marca "Jelco" e, o período de até 96 horas para os dispositivos conhecidos como "Vialon" (poliuretano) da marca "Becton, Dickinson" and Company (BD), conforme PARECER TÉCNICO N° 007/2020 do COREN-AL. Ademais, conforme o Protocolo de Prevenção e Controle das Infecções Associadas a Cateter Intravascular da EBSEH (2019), recomenda-se a troca de cateter arterial com 96 horas, cateter umbilical arterial em 5 dias e cateter umbilical venoso em 7 dias.

Assim sendo, para os profissionais de saúde, os protocolos de prevenção de infecção relacionada a cateter representam fontes essenciais de informações sobre o tempo de permanência desses dispositivos no corpo humano.

2.8. Recomendações da ANVISA para cateter periférico

Aproximadamente 90% dos pacientes internados recebem tratamentos por via intravenosa e, 50 a 75% fazem uso de terapia intravenosa periférica. Os cateteres venosos periféricos são utilizados para procedimentos terapêuticos e diagnósticos. Através destes dispositivos é feita a administração de medicamentos, fluidos e outros componentes sanguíneos e nutricionais no organismo. Por outro lado, os CIVP estão relacionados a eventos adversos, que podem causar complicações locais ou sistêmicas. Portanto, além da seleção adequada do calibre e do material do CIVP, o uso apropriado destes dispositivos, torna-se fundamental como medidas preventivas dos eventos adversos (ANVISA, 2022).

As diretrizes para manejo de CIVP envolvem: higiene das mãos, seleção do cateter e sítio de inserção, preparo da pele, estabilização, coberturas, *flushing*, manutenção do cateter periférico, cuidados com o sítio de inserção e remoção do cateter (SOARES, F. 2019). Os subitens 2.8, detalham algumas recomendações para boas práticas (SOARES, F. 2019).

2.8.1. Higiene das mãos

Higienizar as mãos antes e após a inserção de cateteres; usar água e sabonete líquido quando estiverem visivelmente sujas; usar álcool (60 a 80%) quando elas não estiverem visivelmente sujas; o uso de luvas não substitui a necessidade de higiene das mãos, dentre outras.

2.8.2 Seleção do cateter e sítio de inserção

Para atender as necessidades de terapia intravenosa, devem ser escolhidos cateteres de menor calibre e comprimento de cânula.

As veias de escolha para canulação periférica, em adultos, são as das superfícies dorsal e ventral dos antebraços; como cefálica, basílica, medianas do antebraço, cotovelo e do dorso da mão. Na pediatria, selecionar o vaso com maior probabilidade de duração, considerando as veias da mão, do antebraço e braço; evitar região de flexão, membros comprometidos por lesões como feridas abertas; entre outras disposições.

2.8.3 Antissepsia da pele

Realizar fricção da pele com solução a base de álcool: glicosado de clorexidina > 0,5%, iodopovidona – PVP-I alcoólico 10% ou álcool 70%; entre outras.

2.8.4 Estabilização

Preservar a integridade do acesso, prevenir o deslocamento do dispositivo e sua perda utilizar técnica asséptica para aplicação de um curativo de poliuretano ou combinado a dispositivo adesivo específico.

2.8.5 Coberturas

Deve ser estéril, podendo ser semioclusiva (gaze e fita adesiva estéril) ou membrana transparente semipermeável; utilizar gaze e fita adesiva estéril apenas quando a previsão de acesso for menor que 48h; proteger o sítio de inserção e conexões com plástico durante o banho, e outras.

2.8.6 *Flushing* e manutenção do cateter

O *flushing* corresponde a uma técnica de enfermagem para manter o cateter permeável prevenindo a obstrução do dispositivo, o que promove risco de infecção, considerando que o sangue coagulado no circuito pode ser meio de cultura para microrganismos (BRAGA; PARREIRA; ARREGUY-SENA, et. al., 2018).

É recomendado proceder o *flushing* e aspiração antes de cada infusão; utilizar frascos de dose única ou seringas preenchidas comercialmente disponíveis para a técnica de *flushing*; utilizar solução de cloreto de sódio 0,9% isenta de conservantes para *flushing* e *lock* dos cateteres periféricos; não utilizar água estéril para realização do *flushing* e *lock* dos cateteres, entre outras (ANVISA, 2017).

2.8.7 Cuidados com sítio de inserção

Avaliar o sítio de inserção do cateter observando a presença de rubor, calor, edema, dor e drenagem de secreções; a frequência ideal de avaliação do sítio de inserção é a cada quatro horas ou conforme a criticidade do paciente; entre outros cuidados a serem acompanhados.

2.8.8 Remoção do cateter

Realizar avaliação diária do cateter; trocar o cateter periférico instalado em emergência com comprometimento da técnica asséptica; o cateter periférico não deve ser trocado em um período inferior às 96 horas. Nos neonatos e pediátricos, não se deve trocar o CIVP rotineiramente, no entanto, a avaliação diária do dispositivo é imprescindível para garantir a segurança do paciente.

2.9 Fisiopatogenia da Corrente Sanguínea Relacionada a Cateter

A infecção da corrente sanguínea relacionada a cateter (ICSRC) pode ser causada por colonização extraluminal nas duas primeiras semanas, isto é, por bactérias da pele que migram para a corrente sanguínea após terem formado “biofilme” na face externa do dispositivo. Relaciona-se, após este período, à colonização intraluminal, especialmente em cateteres de longa permanência devido ao aumento da manipulação do *hub* concomitante ao aumento ao tempo de exposição. Outras probabilidades de ICSRC podem ser através de infusões de

soluções contaminadas decorrentes de falhas técnicas e, menos comum, a colonização na ponta do dispositivo por disseminação hematogênica de qualquer origem com subsequente ICSRC (BRASIL, 2017).

A figura 5 mostra as prováveis vias de contaminação que podem evoluir para colonização e consequente infecção.

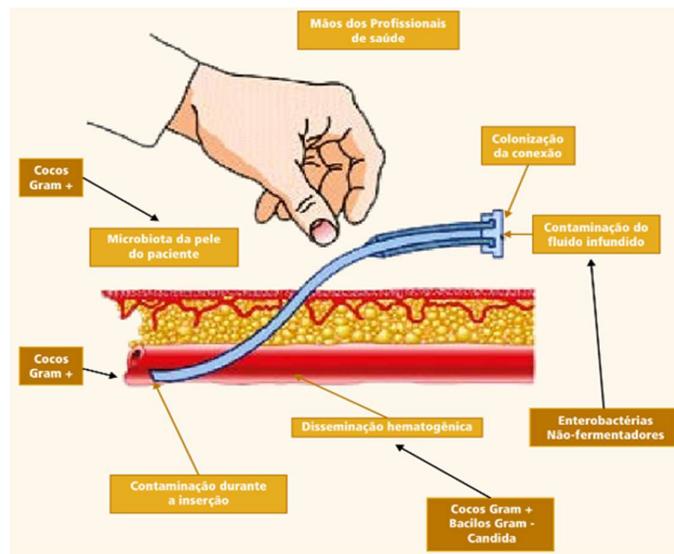


Figura 5- Fisiopatogenia da infecção da corrente sanguínea.

Fonte: Brasil (2017) apud Maki DG; 1992; Safdar N & Maki DG; 2004.

A infecção primária da corrente sanguínea (IPCS) é definida como:

[...] aquelas infecções de consequências sistêmicas graves, bacteremia ou sepse, sem foco primário identificável. Há dificuldade de se determinar o envolvimento do cateter central na ocorrência da IPCS. Com finalidade prática, as IPCS serão associadas ao cateter, se este estiver presente, (ANVISA, 2013).

Enquanto a Infecção relacionada a acesso vascular (IAV), são aquelas que ocorrem no sítio de punção do cateter, sem comprometimento sistêmico, e, a maioria está relacionada ao acesso vascular central (AVC). Porém, é importante o acompanhamento de infecção relacionada ao acesso vascular periférico (IAVP), segundo a ANVISA (2013).

E mais recentemente, utiliza-se o termo 'infecção relacionada à assistência à saúde' (IRAS), isto é, infecção adquirida após o paciente ser submetido a um procedimento de assistência à saúde ou a internação em consonância com os critérios

nacionais de diagnóstico de infecção. As IRAS associadas a dispositivo invasivo, referem-se:

[...] a pacientes em uso de dispositivo invasivo por um período maior que dois dias de calendário (ou seja, a partir do D3, sendo o D1 o dia de instalação do dispositivo) e que na data da infecção o paciente estava em uso do dispositivo ou este foi removido no dia anterior, (ANVISA, 2021 a 2025).

A associação de IRAs através de dispositivos invasivos, por exemplo, cateter, é definida por meio de critérios como o tempo de uso dos dispositivos (ANVISA, 2023).

Sobre a taxa de infecção relacionada a cateter intravenoso periférico (CIVP), ocorre aumento em relação ao tempo de permanência do dispositivo no organismo, se for menor do que 3 dias, o risco é próximo de zero. No entanto, se o tempo for de 3 a 7 dias, o risco aumenta para 3% a 5% e, se o tempo for maior do que sete dias, 5% a 10%, (PATENTE n. BR 102018076890-5 A2, 2018).

Por isso, é recomendado um tempo de permanência para o CIVP não superior a 96 horas. Sendo assim, à medida que se passa mais dias, ou seja, horas com a permanência do cateter, estende-se o risco infeccioso.

2.10 Resistência Antimicrobiana, Cateter e Boas Práticas do Cuidado

Atualmente, a resistência antimicrobiana (RAM) é considerada um dos 10 principais problemas de saúde pública que a humanidade enfrenta e mais grave ainda nos países em desenvolvimento, particularmente para os recém-nascidos e grupos vulneráveis (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2024).

As evidências estimadas de doenças e o impacto econômico sobre a RAM, colocam em risco o desenvolvimento sustentável global. Dentro deste contexto, a meta do Plano de Ação dos Estados Membros da Organização Pan-Americana da Saúde é:

[...] assegurar sua capacidade de tratar e prevenir doenças infecciosas através do uso responsável e racional de medicamentos e outras tecnologias em saúde seguros e efetivos, com garantia de qualidade, acessíveis, e de baixo custo (OPAS/2021).

Os Estados Membros argumentaram que a pandemia da COVID-19 ocasionou aumento das infecções por organismos resistentes e novos agentes patogênicos multirresistentes devido ao elevado uso de antibióticos em pacientes acometidos pela infecção respiratória aguda causada pelo coronavírus SARS-CoV-2 (OPAS/2021).

O reforço de uma rede laboratorial para diagnóstico precoce bacteriológico e micológico representa outro desafio atual para alcançar o objetivo no ano 2030, conforme o Plano de Ação Mundial da OMS. A coinfeção por bactérias e fungos impactam a vida das pessoas acometidas principalmente por HIV, tuberculose e malária, as quais têm um elevado risco de contrair infecções resistentes aos antimicrobianos, representando maior risco de transmissão a outras pessoas. Logo, o acesso aos testes laboratoriais é necessário para conduzir o tratamento adequado das infecções bacterianas e fúngicas, a utilização dos antimicrobianos e a monitorização (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2024).

Sobre a assistência à saúde, as ações relacionadas ao cateter como a higienização das mãos, preparo da pele antes de inserir o cateter, técnica asséptica de punção, seleção do cateter e sítio de inserção, fixação, estabilização, cobertura, *flushing*, cuidados com o sítio de inserção e remoção do cateter; tornam-se fundamentais para prevenir infecções (PARECER COREN-SP N° 006/2022).

As boas práticas dos cuidados com cateter venoso periférico visam minimizar os riscos, respeitando a Política Nacional de Segurança do Paciente e corroborando com os bons resultados na qualidade da assistência de enfermagem (SILVIA et al., 2021 *apud* PARECER COREN-SP N° 006/2022).

2.11 Biofilme

Characklis, W.G. (1984), definiu biofilmes como compostos formados por células microbianas e os seus produtos, exopolímeros. Estes biofilmes refletem uma acumulação em superfície constituída por uma fração de substâncias inorgânicas ou abióticas mantidas unidas por substâncias orgânicas, bióticas.

Mais recentemente, o biofilme é definido como um consórcio estruturado de células microbianas rodeadas por uma matriz polimérica autoproduzida, podem existir formados por mono espécies ou poli espécies. Eles podem aderir às superfícies abióticas ou bióticas do hospedeiro (HØIBY, 2014).

Entre os fatores que contribuem para a adesão de bactérias numa superfície, cita-se: características fisiológicas do microrganismo e do substrato. As forças atrativas entre a célula e a superfície devem ser maiores do que as forças repulsivas para ocorrer a adesão. Por exemplo, as forças eletrostáticas, *Van der Waals*, hidrofóbicas e ligações químicas (AZEREDO; HENRIQUES M; NOVELLO, 2012).

A formação de biofilme ocorre quando as bactérias planctônicas circulantes no meio são atraídas pelas forças eletrostáticas e físicas com subsequente formação de microcolônias, seguida de macrocolônias envolvidas por uma matriz de exopolissacarídeo, formando os chamados biofilmes maduros (KASNOWSKI; MANTILLA; FRANCO, 2010).

Considerando que os biofilmes acontecem tanto no hospedeiro quanto no ambiente, a bioincrustação, refere-se ao material depositado no substrato que é produzido por tais organismos e, portanto, sofre grande influência dos mesmos, os quais produzem o material polimérico extracelular (MPE), formando agregados poli microbianos, que podem ser filme ou lama em que os microrganismos formam 10% de massa seca, enquanto a matriz polimérica pode representar até 90%. A presença dessas “comunidades microbianas” e seus metabólitos podem causar no setor da indústria, por exemplo, corrosão, entupimentos e incrustações (Patente BR102013026485A2).

No setor da saúde, um dos problemas de destaque é a formação do biofilme associado a cateteres. É definido como agregados formados por micro-organismos com objetivo de estado protetivo de sobrevivência, um mecanismo de adaptação ao ambiente e de resistência a antimicrobianos, (LI; SUN; ZHANG, et al., 2021).

As superfícies de dispositivos plásticos são facilmente colonizadas por patógenos (bactérias ou fungos) e estão associadas a causa mais comum de infecção primária da corrente sanguínea (IPCS), contribuindo para a morbidade e mortalidade, segundo GUGGENBICHLER; BOSWALD; LUGAUER, et al. (1999).

A colonização por microrganismos cutâneos, ocorre extra luminal do cateter venoso central (CVC) em curto prazo, menos de 14 dias, já a colonização intraluminal do hub do cateter ocorre com cateterismo de longo tempo (HOSNY; FARRAG; HELMY, et al., 2020).

A figura 6 refere-se às etapas de formação de um biofilme e, a figura 7 ao biofilme formado sobre um cateter venoso central de poliuretano.

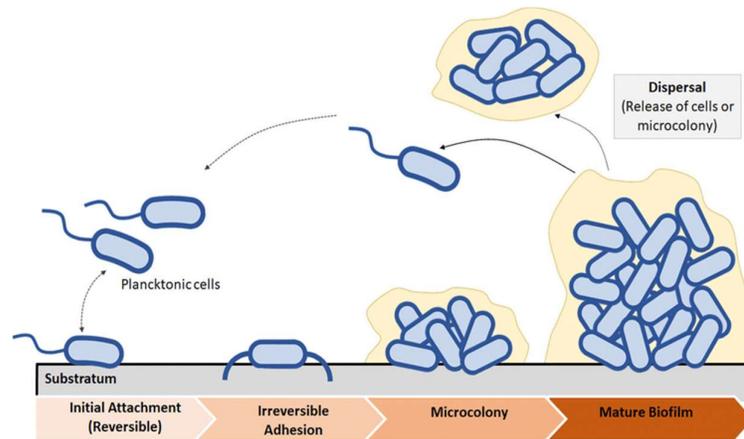


Figura 6- Biofilm

Fonte: <https://www.researchgate.net/figure/Top-Schematic-view-of-biofilm-formation-in-different-regions-of-a-venous-catheter>.

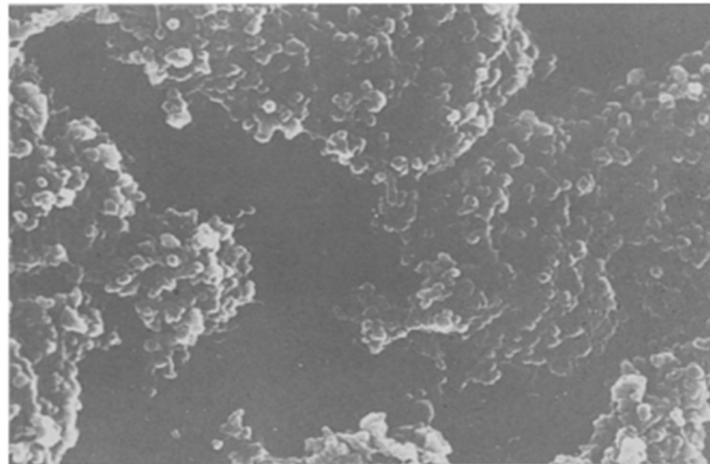


Figura 7- Biofilme na superfície de cateter venoso central.

Fonte: GUGGENBICHLER; BOSWALD; LUGAUER, et al. (1999).

Uma vez que, os agentes antimicrobianos tradicionais não eliminam completamente o biofilme associado aos dispositivos, esse mecanismo de resistência passa a representar uma importante fonte de infecção nosocomial (LI; SUN; ZHANG, et al., 2021).

A formação do biofilme detalhada é complexa e envolve várias etapas, que se inicia com uma camada na superfície do material, formada por meio de adsorção não específica de proteínas ou outras espécies presentes no microambiente, antes da fixação microbiana. A seguir as células então se fixam ao substrato gerando micro colônias, adesão e proliferação. Os microrganismos secretam substâncias poliméricas extracelulares (EPS) para formar a matriz do biofilme. Isto confere estabilidade

mecânica e coesão entre os microrganismos individuais e por fim, a fase de maturação ocorre quando o biofilme se reestrutura numa morfologia tridimensional alta, hidratada com canais de água. Enzimas proteases e nucleases são produzidas pela população do biofilme, ocorrendo a dispersão parcial, liberação de microrganismos para a forma planctônica, facilitando a disseminação da espécie e colonização de novas superfícies (BLACKMAN; QIU; CASS, et al., 2021).

Em relação aos mecanismos de resistência do biofilme, eles são de natureza estrutural e ambiental, e são aceitas as propostas mecanicistas sobre difusão retardada e a penetração limitada de antibiótico através da matriz. Além disso, na presença do biofilme, tem-se um ambiente químico alterado, como, por exemplo, a mudança de pH, o que pode afetar a estabilidade e eficácia de alguns antibióticos. E ainda, a presença de células persistentes no biofilme, podem induzir tolerância ao antibiótico (BLACKMAN; QIU; CASS, et al., 2021).

Em uma visão geral, as infecções relacionadas a dispositivos com biofilme são diversas, entre elas: infecção de trato urinário, pneumonia, infecção em torno dos implantes, peritonite recorrente, ou persistente etc., além de uma variedade de patógenos implicados, tais como: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*; identificados pela infecção de implantes sob a pele (LI; SUN; ZHANG, et al., 2021).

As bactérias Gram-positivas estão presentes de forma significativa nas infecções relacionadas a cateter. No entanto, há estudos mostrando a tendência de aumento de infecções relacionadas a cateter por Gram-negativas, comparado aos anos anteriores. Na pesquisa feita por TARDIVO; FARHAT NETO; FARHAT JUNIOR, (2008), a taxa de infecção relacionada a cateter vascular na UTI foi de 10,89%, representada por bactérias gram-positivas de *Staphylococcus aureus* onde foram predominantes em 7,92% versus 2,97% de gram-negativos.

Porém, estudos na literatura mostram um aumento crescente na taxa de bactérias Gram-negativas em vários contextos, incluindo infecções de corrente sanguínea relacionada a cateter (CRBSI). Nesse aspecto, realizou-se um trabalho numa hemodiálise para investigar se essa tendência de aumento na ocorrência de Gram-negativo estava coincidindo naquela unidade. O trabalho resultante da investigação de 8 anos evidenciou 149 episódios de CRBSIs e a taxa de incidência variou entre 0,67 e 0,82 episódios por 1000 CVC/ dia. Foi constatado que houve uma tendência de aumento na taxa de infecções de bactérias Gram-negativas ao longo

deste tempo, passando de 37,8%, no primeiro período, para 41,2%, no segundo período, e, para 44,3%, no último período (MANDOLFO; ANESI; ROGNONI, 2021).

2.12 Outros Problemas Associados a Cateter Venoso

Os eventos adversos incluem os clínicos e os mecânicos. Há diversos relatos de eventos clínicos dos CIVPs, destacando-se a flebite com 20,1%, o hematoma com 17,7% e as infecções com 0,4%. Enquanto a obstrução/oclusão de cateter venoso periférico (CVP) representa 12,4% dentro de um contexto de evento adverso mecânico. Também se observou que a fixação inadequada do cateter foi um fator de risco importante (MILIANI; TARAVELLA; THILLARD, et al., 2017).

2.13 Avanços da Tecnologia

Os cateteres venosos são essenciais, principalmente para os pacientes imunodeprimidos, nos quais não há outra alternativa para realizar a terapêutica. Logo, é necessário um cateter seguro com atividade antimicrobiana a longo prazo (HACHEM; WRIGHT; ZERMENO, et al., 2003).

Em 1996, foi desenvolvido o cateter iontoforético de prata para uso de longo prazo e comprovou atividade antibacteriana e antifúngica de amplo espectro (HACHEM; WRIGHT; ZERMENO, et al., 2003).

Para desenvolver este dispositivo, foi pesquisada a resposta orgânica em coelhos submetidos ao implante de “cateter iontoforético” de prata, constituído de poliuretano, lúmen único com comprimento aproximado de 10 cm. Os animais com cateteres implantados foram acompanhados num período de 2 a 12 semanas e durante este tempo foram submetidos a exames de sangue, avaliação de corrente elétrica diária do cateter, análise dos tecidos da pele em torno do cateter, pulmão, baço e fígado (HACHEM; WRIGHT; ZERMENO, et al., 2003).

O trabalho concluiu que o cateter era seguro no modelo animal devido aos resultados dos exames em que os níveis séricos de prata no sangue foram normais e sem evidências de depósitos, toxicidade de prata ou lesão térmica nos tecidos (HACHEM; WRIGHT; ZERMENO, et al., 2003).

As concentrações necessárias para atividade bactericida estão na faixa de 10^{-9} mol/L. Essas concentrações podem ser alcançadas em soluções pela interação de

prata metálica com eletrólitos, apenas se houver uma superfície grande de prata. A prata é distribuída em partículas submicrométricas em poliuretana e resulta na concentração de 0,8% de uma superfície ativa de 450 cm²/g de poliuretana. A poliuretana é higroscópica, e a interação de soluções eletrolíticas com a prata finamente distribuída por toda a poliuretana libera concentrações bactericidas de íons prata ao longo de anos na superfície de um material, segundo GUGGENBICHLER; BOSWALD; LUGAUER, et al. (1999).

No encontro da American Chemical Society, em 2012, foi divulgada uma pesquisa que se referia ao “cateter inteligente eletromodulado”, desenvolvido com avanço da tecnologia, em que o material para “cateter urinário” poderia detectar o início de uma infecção e liberar uma substância antibiótica, o óxido nítrico (NO). Foi considerado que essa tecnologia poderia vir a ser aplicada em cateter venoso.

Nota-se, que nas décadas passadas, foram investidos estudos e desenvolvidos revestimentos antimicrobianos a partir de nanopartículas e/ou íons de prata, cobre, zinco, selênio, amônio quaternário composto, ou antibiótico (HUANG; CHASEMI; 2020).

Dentro deste contexto, os polímeros bioácidos representam uma abordagem recente no combate às infecções. Os bioácidos usados incluem antibióticos, compostos de amônio quaternário, fenóis, iodo ou nanopartículas de metal (NPs), como prata e zinco. Comparando polímeros antimicrobianos aos polímeros que liberam bioácidos, estes mostram maior estabilidade química por causa das ligações covalentes que fazem a retenção permanente do medicamento dentro do material (HOSNY; FARRAG; HELMY, et al., 2020).

Em outra pesquisa relacionada ao biofilme, foi analisado o efeito de nanopartículas de selênio (Se-NPs) em substrato de poliuretanos. Dentro deste estudo, realizou-se ensaios de concentração inibitória mínima e citotoxicidade das amostras para determinação da atividade antimicrobiana (FILIPOVIĆ; UŠJAK; MILENKOVIĆ, et al., 2021).

Sobre as cepas bacterianas, os autores relataram que encontraram maior atividade contra bactérias Gram-positivas em todas as formulações de Se-NPs. As Se-NPs-BSA apresentaram inibição significativa em todos os biofilmes levando-se em conta a comparação de dose com amostras controle. Todos os processos levaram a alterações da morfologia e propriedades dos revestimentos. Concluiu-se que a atividade antimicrobiana é um campo de pesquisa em crescimento que exige

estratégias com avaliações complexas (FILIPOVIĆ; UŠJAK; MILENKOVIĆ, et al., 2021).

Existem vários materiais inovadores e promissores antibiofilmes, entre eles, destacam as macromoléculas solúveis em água, incluindo peptídeos, proteínas, polímeros sintéticos e nanomateriais; os materiais que respondem a estímulos ambientais para atividade antibiofilme “*on-demand*”; multi-ações sinérgicas; os biomiméticos e materiais biohíbridos (BLACKMAN; QIU; CASS, et al., 2021).

Já os polímeros responsivos a estímulos ou polímeros inteligentes, desenvolveram-se nas últimas décadas com foco nas necessidades e aplicações da biotecnologia. Muitas substâncias têm sido consideradas com base no comportamento ambiental das moléculas. Os polímeros responsivos a estímulos podem mudar de configuração e dimensão por influências do meio, como da temperatura, pH, luz, campo magnético, eletricidade e solvente/água. O poli (ácido 2-etil acrílico) (PEAAC) e o poli (ácido 2-propil acrílico) (PPAAC) são citados como exemplos de polímeros que contém mais propriedades hidrofóbicas em menor pH. Resultante a variações de temperaturas, os polímeros podem tornar-se solúveis ou insolúveis, e, por isso, haverá modificações a nível das ligações intra e intermoleculares, o que ocasionará configurações menos ou mais expansivas dos polímeros. Assim, com essas interações, o material vai ter características hidrofóbicas e/ou hidrofílicas (CHEN; CHANG, 2014).

Além disso, a irregularidade da superfície também pode realçar a molhabilidade do material. Nesse sentido, as características hidrofóbicas tendem a afastar a água, ou, quando hidrofílicas acomodam a água nas irregularidades presentes, preenchendo, assim, o espaço e realçando a molhabilidade do material.

Os mecanismos de polímeros foto deformáveis baseiam-se em moléculas fotoisomerizáveis (como azobenzenos), moléculas fotorreativas (como cinamatos), redução de transferência de cadeia de adição-fragmentação (sulfetos de alila) e dissociação iônica fotoinduzida reversível (trifenilmetano leuco). Entende-se, que os efeitos da luz podem ocasionar alterações nas propriedades dos materiais, tais como hidrofobia/hidrofília, molhabilidade, módulo de elasticidade e desempenho como mudanças macroscópicas (CHEN; CHANG, 2014).

Foi realizado um estudo por meio do qual analisaram 308 pacientes com cateter totalmente implantável entre período de janeiro de 2011 e dezembro de 2017, relacionado a porta de cateteres venosos centrais implantáveis para investigar fatores

associados à infecção, incluindo dois tipos de dispositivos. A diferença mais notável entre eles foi o revestimento de polímero de 2-metacriloxietil fosforilcolina (MPC) na superfície do Orphis CV Kit Neo, que não estava presente na superfície do Bard X-Port isp. Conforme o autor, “o revestimento MPC imita uma biomembrana e reduz a adesão de proteínas, células e bactérias. Vários estudos demonstraram que o revestimento MPC em dentaduras inibe a deposição de placa”. Os resultados deste estudo, sugeriram o potencial preventivo sobre o tipo de dispositivo em relação à infecção (IIDA, Y.; HONGO, K.; ONODA, T., *et al.* 2021).

Para resolver o problema de infecção relacionada a cateter, muitos pesquisadores têm direcionado estudos para modificação de materiais com o propósito de obter propriedades antimicrobianas e/ou antiaderentes. São citadas várias estratégias para aprimoramento desses cateteres, onde são incluídas três modificações antimicrobianas: a morte celular bacteriana, a liberação de bioácido ou a eletro modulação. Outra estratégia são as modificações antiaderentes (anti-incrustante) de cateteres por métodos que envolvem energia superficial, interações da camada de proteína ou hidratação/repulsão estérica (CASIMERO; RUDDOCK; HEGARTY; *et al.*,2020).

A princípio, foram desenvolvidos revestimentos hidrofóbicos, porém, o seu desempenho foi considerado limitado devido a interação hidrofóbica e atração entre os revestimentos e os “incrustantes”. Nos últimos anos, vários polímeros foram desenvolvidos com propriedade anti-bioaderente hidrofílico, como por exemplo, o polietilenoglicol (PEG), conforme HUANG; CHASEMI (2020).

Recentemente, cita-se seis estratégias de revestimentos anti-bioaderentes: os revestimentos enxertados tridimensionalmente, à base de esferas hierárquicas, reforçados com nanomateriais inorgânicos, baseado em hidrólise, baseado em estrutura semi-interpenetrante e montado camada por camada (HUANG; CHASEMI, 2020).

Apesar dos avanços tecnológicos, há demanda de revestimentos antimicrobianos com melhores propriedades. A aplicação prática ainda encontra dificuldades de fabricação, por exemplo, rupturas dos tubos de polímero durante o processo de extrusão (LEE; JEONG; JO; *et al.*, 2021).

2.14 Estratégias de Modificações de Superfície

Na superfície dos dispositivos médicos ocorre frequentemente a adesão bacteriana formando o biofilme, que promove cerca de 10 a 1000 vezes mais resistência do que bactérias planctônicas (células livres). Assim, a estratégia no combate a infecção nosocomial tem sido os revestimentos com propriedades antimicrobianas e antiaderentes (QIU; SI; LUO, et al., 2020).

A célula bacteriana é composta por parede celular, membrana celular e componentes intracelulares, além disso, algumas bactérias possuem estruturas, como flagelos, pili, cápsula e esporos. São classificadas em duas categorias pelo método de coloração por cristal de violeta, Gram-positivas e Gram-negativas. Devido a parede das bactérias Gram-positivas serem formadas por peptidoglicano, elas retêm o corante, sendo identificadas pela cor roxa, e as bactérias Gram-negativas, como tem parede celular fina, não retém o corante e não se mostra coradas de roxo. Ambas têm membrana citoplasmática, constituídas por fosfolipídios com grupo funcional de proteínas. As bicamadas fosfolipídicas incluem lipídeos aniônicos e catiônicos (CL), fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilserina (PS). Portanto, as bactérias são carregadas mais negativamente, exceto a bactéria Gram-negativa, que possui ao lado externo da membrana plasmática um polissacarídeo aniônico (LPS). Logo, as membranas de bactérias Gram-negativas funcionam como barreiras para moléculas com hidrofobicidade (QIU; SI; LUO, et al., 2020).

O mecanismo de combate às bactérias de muitos polímeros catiônicos ocorre pela via de atração eletrostática com ação na membrana celular causando a lise e morte celular. Há vários modelos propostos por pesquisadores que explicam o mecanismo de lise da membrana, como o modelo “*Carpet*”, modelo “*Barrel*”, modelo “*Toroidal-pore*”. Ressalta-se que a maioria das bactérias Gram-negativas têm uma barreira externa da membrana e, por isto, a maioria dos polímeros catiônicos têm menos potencial contra bactérias Gram-negativas comparado a Gram-positiva. Além disso, a estrutura anfifílica de polímeros catiônicos pode aumentar a interação hidrofóbica com células de mamíferos e assim causar citotoxicidade, o que têm demonstrado resultados em ensaios clínicos desfavoráveis. No entanto, observa-se que os polímeros catiônicos têm múltiplos alvos na célula bacteriana e a frequência de mutantes resistentes é menor (QIU; SI; LUO, et al., 2020).

As bactérias podem desenvolver diferentes mecanismos de resistência a antibióticos, como “bloquear a redução da permeabilidade da membrana celular

externa, diminuir ou eliminar o efeito do medicamento através do auto ajuste biológico entre as células, produzir enzimas para a degradação do antibiótico, ter uma alteração histológica para uma mudança de alvo de ação do antibiótico” (QIU; SI; LUO, et al., 2020).

Esses mecanismos de resistência bacteriana podem ser superados pelos polímeros catiônicos, os artificiais podem ser ajustados quanto à estrutura molecular, densidade de carga, balanço anfifílico por causa dos efeitos de toxicidade (QIU; SI; LUO, et al., 2020).

Contudo, esses polímeros catiônicos apresentaram desvantagens com implicações de limites ao campo biomédico porque podem causar hemólise devido a sua interação hidrofóbica não-específica com a membrana eritrócitos (QIU; SI; LUO, et al., 2020).

Muitos pesquisadores têm trabalhado em promover a hidroflicidade de superfícies porque essa propriedade é desfavorável à adesão de microrganismos. Assim, a expectativa é conseguir tratar a superfície de materiais que possam obter propriedades antiaderentes e antimicrobianas (QIU; SI; LUO, et al., 2020).

A tecnologia *layer-by-layer* (LBL) refere-se à adsorção de eletrólitos ou componentes complementares na superfície do substrato. É um método simples que não exige uma forma de substrato e espessura, as propriedades de adsorção da camada podem ser ajustadas em escala molecular. Há relato de que o cateter de PU foi modificado com poli (cloreto de dialildimetilamônio) exibindo boa performance antibacteriana (QIU; SI; LUO, et al., 2020).

2.15 Atividade Antimicrobiana da Prata

A prata tem propriedades interessantes, entre elas: possui a maior condutividade elétrica e térmica dos metais, excelente catalisador e conferida atividade antibiótica através da liberação de íons prata de nanopartículas. No entanto, ainda apresenta grandes desafios, como controlar cineticamente o tamanho e a distribuição das nanopartículas, o que limita a reprodutibilidade, especialmente na biomedicina. A principal desvantagem da síntese de Ag-NPs mediada pelo citrato é a reação de um agente redutor fraco e forte estabilizador de complexação, afetando a cinética de redução da prata e dificultando o controle de nucleação das nanopartículas. Por isso, vários estudos foram conduzidos para se adequar os

parâmetros que envolvem a reação, tais como, o controle de protonação dos íons citrato ajustando o pH, o uso de meios super suaves de agentes redutores e o controle da temperatura (BASTÚS; MERKOCI; PIELLA, et al., 2014).

Os autores supracitados, relatam que sintetizaram Ag-NPs a partir de soluções com dois agentes redutores, o citrato de sódio e o ácido tânico em diferentes concentrações, acrescentando a elas o nitrato de Ag. A escolha do agente redutor e estabilizador permite o controle do processo de formação das sementes e meios eficazes de ajuste do tamanho e muitas vezes a forma da Ag-NPs. Observa-se que, à medida que aumentou a concentração de ácido tânico ocasionou aumento no tamanho das nanopartículas. Assim, a rota proposta conduz a um controle do tamanho das partículas de 10 a 200 nm, alta concentração, estabilidade por longo tempo e superfícies acessíveis (BASTÚS; MERKOCI; PIELLA, et al., 2014).

Heilman (2015), descreve em sua tese de doutorado, um estudo de cateteres venosos centrais a base de poliuretano, no qual utilizou-se de radiação ionizante para fazer o revestimento desses dispositivos com nanopartículas de prata a fim de proporcionar redução da ocorrência de infecção.

Em relação a concentração, a prata iônica tem atividade conhecida como antimicrobiana em bactérias e fungos, que é considerada oligodinâmica por sua atividade em baixas quantidades a 0,001 ppm e atóxica para as células humanas (HEILMAN, 2015).

E na Patente BR 102018076890-5 A2 sobre nanofibras com nanop prata com atividade antimicrobiana em cateteres intraluminais diz que, “Baseado no procedimento já conhecido no estado da arte”, porém, agora para revestimento de cateter, entre outras informações, cita a porcentagem de nanopartículas de prata (NanoAg 20 mcg/mL), preferencialmente 0,001%, com todas as porcentagens em peso.

O revestimento antimicrobiano representa uma das estratégias usadas para evitar a adesão bacteriana e a formação de biofilme em dispositivos de saúde. As nanopartículas podem ser depositadas em superfícies de polímeros ou em superfície do revestimento de um dispositivo (KNETSCH; KOOLE, 2011 apud HEILMAN, 2015).

Segundo pesquisa sobre dispositivos médicos, o depósito de prata a partir de $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ a $32 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ podem prevenir a formação de biofilme bacteriano (ACRYMED, 2008 apud HEILMAN, 2015).

Além disso, é relatado que as nanopartículas com tamanhos < 10 nm e as com forma triangular apresentam maior atividade antibacteriana (KNETSCH; KOOLE, 2011).

Assim, a partir dessas considerações, é dito que a área superficial das partículas é relevante quanto à atividade antibacteriana. Também há relatos que as nanopartículas oxidativas tiveram atividades antibacterianas, enquanto as reduzidas não apresentaram atividades bactericidas ou bacteriostáticas. Acresce dizer que, a taxa de liberação de íons prata é dependente da área superficial e que as NPs de prata migram para dentro das células ocasionando a lise celular. O principal efeito dessas nanopartículas e dos íons é a ligação direta delas com a membrana bacteriana, a qual é rompida ocorrendo o vazamento do teor intracelular seguido por morte celular bacteriana (HEILMAN, 2015).

2.16 Interação Física das Nanoestruturas com as Bactérias

O fenômeno antimicrobiano mediado pela nanotopografia tem sido associado a vários fatores: físicos, químicos e biológicos. O estudo da interação entre a superfície e o microrganismo tem sido realizado por meio da microscopia eletrônica de varredura. As propriedades das nanoestruturas (NS) de asas de cigarra e libélula têm sido reportadas como inspiração mimética para design de nanoestruturas com atividade bacteriana. Essas nanoestruturas de insetos são relatadas por produzirem alongamento de células bacterianas e fúngicas pelo contato, induzindo a morte por ruptura. Assim, é importante entender que a nanotopografia sintética, pois poderá guiar a morte celular bacteriana em dispositivos médicos (JENKINS, et. at.,2021).

Entretanto, a tecnologia em 2D tem suas limitações. Portanto, tem sido necessária uma resolução em escala nanométrica para visualizar as ultraestruturas das bactérias e da nanotopografia. A microscopia eletrônica de varredura com feixe de íon focalizado é uma tecnologia alternativa para essa abordagem. A formação de imagem simultânea do espectro de bactérias e fungos, seccionadas interativamente com potencial de reconstrução 3D, permite a visualização simultânea da interação entre nanotopografia e microrganismo (JENKINS, et. at.,2021).

Os microrganismos, tais como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli*, têm sido reportados em pesquisas utilizando essa estratégia microscópica. A interação entre bactérias das

espécies *S. aureus* e *E. coli* e nanoestrutura foi pesquisada pelo método camada por camada para a gerar uma reconstrução 3D com análise em escala nanométrica através de software. Foram gerados 4 tipos de nanotopografias de óxido de titânio com diferentes densidades. A análise através de corte transversal dessas bactérias foi realizada individualmente por meio MEV-FIB (*focused ion beam scanning electron microscopy*). Utilizando os dados coletados por micrografia, uma estrutura foi desenvolvida para quantificar a proporção da nanoestrutura em induzir à deformação, impedância ou ruptura bacteriana (JENKINS, et. at.,2021).

As imagens da figura 8 mostram as características das quatro nano topográficas com baixa, média e alta densidade.

Na figura 8 (a, b, c e d), em (a) é de nanoestrutura média ($36/\mu\text{m}^2$) e média densidade; a figura (b) de nanoestrutura curta e média densidade ($58/\mu\text{m}^2$); a figuras (c) de nanoestrutura longa e baixa densidade ($8/\mu\text{m}^2$) e, (d) são de nanoestruturas de comprimento mais curto e alta densidade ($137/\mu\text{m}^2$) (JENKINS, et. at.,2021).

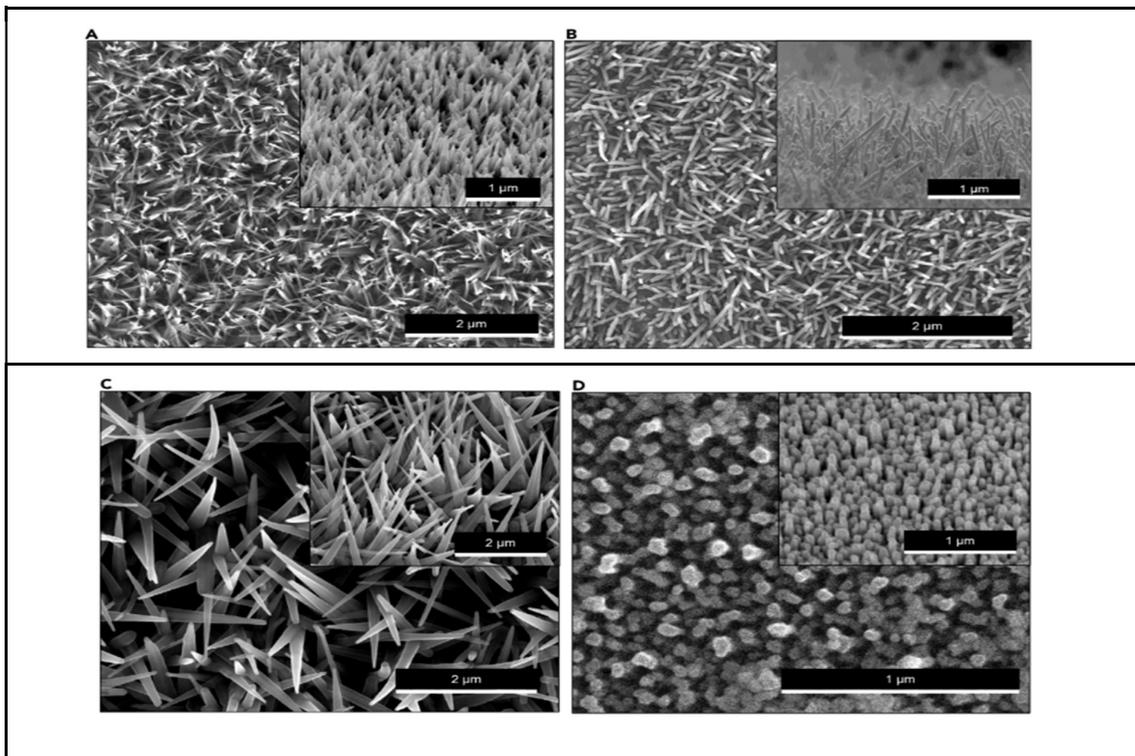


Figura 8- Nano Topografias a,b, c e d.
Fonte: JENKINS, J. et al (2021).

A figura 9 mostra a interação morfológica das bactérias em contato com uma nanoestrutura média. Na figura (a), não há alteração na forma da *E.coli*. Enquanto que na figura (b) há mudança na forma da *S.aureus*, (JENKINS; 2021).

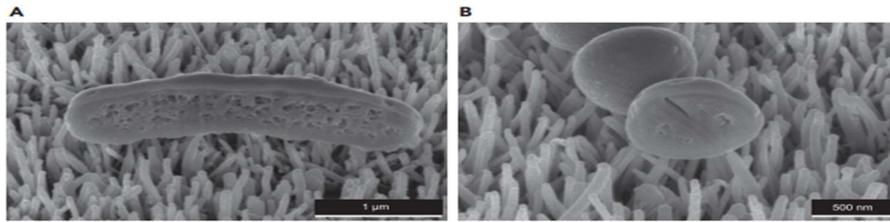


Figura 9- Nanoestrutura média, (a) *E.coli*, (b) *S.aureus*.
Fonte: JENKINS, J. et al (2021).

A reconstrução da imagem em 3D com feixe de íon focalizado produzida por 80 seções transversais da *E. coli* em contato com a nano topografia de óxido de titânio curta de alta densidade mostra a interação física da bactéria com a nano topografia. As imagens 10-A e 10-B referem-se a análise FIB-SEM automatizada em corte transversal numa célula de *E. coli*. A imagem 10-C da secção transversal de *E. coli* mostrou que a nanoestrutura (NS1) deformou o envelope bacteriano sem ruptura ou penetração, isto é mostrado na reconstrução 3D (D).

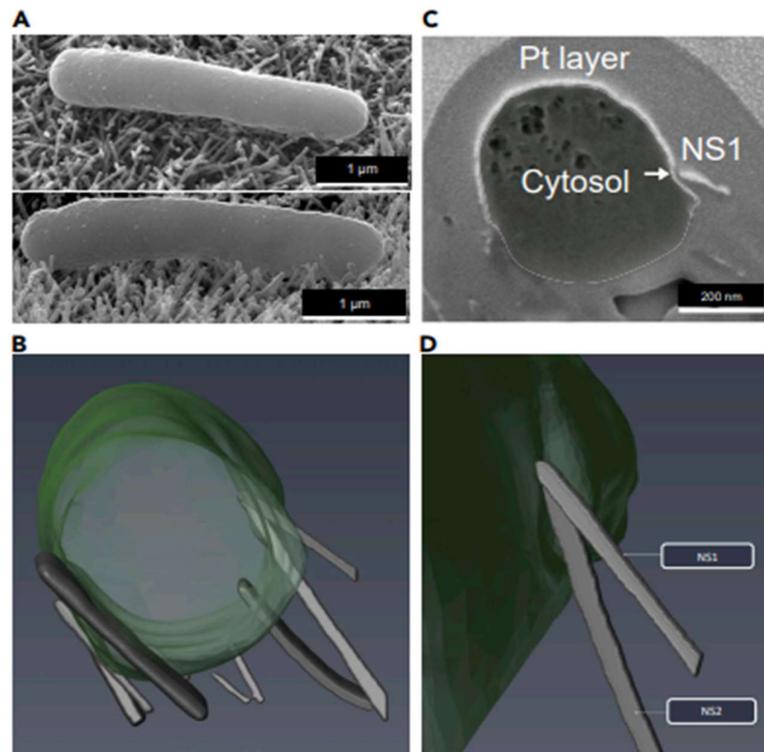


Figura 10- Imagens da *E.coli* em contato com a nanoestrutura de comprimento curto e alta densidade. A célula *E. coli* deformada (Figura 10A). Duas nanoestruturas (NS1 e NS2) interagiram com o lado da célula de *E. coli* na mesma posição sem penetrar (Figuras 10C e 10D).
Fonte: JENKINS, J. et al (2021).

Neste artigo, os autores fizeram uma discussão detalhada sobre a relevância da nanoestrutura e evidenciaram que há diferentes possibilidades para ocorrência do mecanismo antimicrobiano, o qual é relacionado a densidade da nano topografia e espécies bacterianas (*E. coli* e *S. aureus*).

2.17 Metais Pesados

Em 1936, o dinamarquês Niels Bjerrum, fez a definição de “metal pesado” em função da densidade igual ou acima de 5 g/cm³. Por conseguinte, a prata e o cobre são chamados de “metais pesados”. No entanto, não existe consenso sobre esse termo na literatura, que tem sido chamado de “elemento traço”. A IUPAC (2002) diz que o termo “metal pesado” tem sido usado para um grupo de metais associados a contaminação e potencialmente tóxicos ou eco tóxicos. Porém, a alta toxicidade não tem base em dados químicos ou toxicológicos. Logo, o termo “metal pesado” perde o sentido e uma nova classificação se faz necessária baseada no entendimento químico e permite que os efeitos toxicológicos sejam preditos [SOUZA, 2010?].

Conforme publicado pelo site da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), não há consenso sobre o termo supracitado, no entanto, pode ser dito que “metais pesados” são:

Um grupo de elementos químicos com relativa alta densidade e tóxicos em baixas doses. Seus efeitos nocivos sobre os seres vivos tornam o conhecimento acerca de sua presença, identificação, quantificação e monitoramento de grande relevância, principalmente na área ambiental (água, solo) e de saúde (medicamentos, alimentos, fluídos e tecidos biológicos). Disponível em: <https://www.ufsm.br/laboratorios/laqia/metais-pesados-heavy-metals>. Acesso em: 02 de outubro de 2024.

Na literatura, os metais pesados são conceituados como elementos químicos com alta densidade e potencial tóxico. Quando liberados no meio ambiente podem contaminar os cursos de água, ocasionar doenças aos seres vivos e risco para o ecossistema (GONZAGA; FONTGALLAND, 2023., MOSCHEM; GONÇALVES, 2020).

Os elementos químicos citados no grupo dos metais pesados são: arsênio, cádmio, cobre, estanho, antimônio, chumbo, bismuto, prata, mercúrio, molibdênio, índio, ósmio, paládio, ródio, rutênio, cromo, níquel e vanádio (<https://www.ufsm.br/laboratorios/laqia/metais-pesados-heavy-metals>).

A maioria dos elementos químicos estão presentes nos ciclos naturais e não são nocivos aos organismos. Porém, a introdução dos elementos químicos nos

compartimentos, pode causar a bioacumulação. O caráter tóxico ocorre quando as concentrações de elementos essenciais aumentam a ponto de tornar o mecanismo de defesa ineficiente [SOUZA, 2010?].

A toxicidade pelos metais relaciona-se:

[...] a interação com metais essenciais por afinidade eletrônica; o bloqueio de grupos funcionais essenciais à atuação de uma biomolécula e a inibição enzimática de proteínas com grupos SH com modificações na conformação de sítios ativos e na estrutura quaternária de proteínas” (FERRER, A. 2003).

SEMEDO (2014), cita que a toxicidade de um metal pesado se relaciona ao acúmulo no organismo, um exemplo é a acumulação do cádmio nos rins durante 20 a 30 anos, apesar de se manter algumas horas no sangue.

O cobre é um elemento essencial nos organismos vivos, ele tem afinidade com albumina e outros aminoácidos, principalmente aminoácidos com enxofre. No corpo humano, por exemplo, é um dos principais metais de transição, e os teores mínimos ($\mu\text{g}/100 \text{ mL}$) em vários fluidos são: (72) no soro, (75) no plasma, (71) nos eritrócitos, (10) na saliva e (6) no fluido espinhal (MASSABNI; MAURO; SARGENTELLI, 1996).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver um filme constituído de poliuretana (PU) impregnado com nanopartículas de prata, que tenha propriedades antiaderentes e antimicrobianas para potencial aplicação no revestimento de dispositivos médicos, especialmente, cateteres intravenosos periféricos.

3.2 Objetivos específicos

1. Selecionar a melhor dispersão aquosa de poliuretana à base de óleo de mamona (natural).
2. Preparar filmes à base de poliuretana (PU) impregnados com NPs de prata.
3. Realizar ensaio microbiológico (método disco-difusão) das Ag-NPs.
4. Realizar ensaios de citotoxicidade dos filmes de poliuretana pura e impregnados com nanopartículas de prata (Ag-NPs).
5. Realizar ensaios microbiológicos (testes de adesão e antibiofilme) dos filmes impregnados com Ag-NPs contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
6. Realizar ensaios físico-químicos de caracterização das amostras (filmes puros e impregnados com Ag-NPs) por meio de espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier pela técnica de reflectância total atenuada (FTIR-ATR), análise termogravimétrica (TGA), microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de raio X (DRX) e teste de detecção de Ag-NPs.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção são descritas as metodologias utilizadas para produzir os filmes de poliuretana contendo nanopartículas de prata, os ensaios microbiológicos e a caracterização dos filmes produzidos.

4.1 Preparação dos Filmes Puros de Poliuretanas

4.1.1 Escolha Da Poliuretana (Contexto)

Primeiramente, foram feitos filmes a partir das dispersões aquosas de poliuretanas disponíveis no laboratório de Química Medicinal e Biomateriais (LQMBio) da UNIARA. Estas dispersões foram preparadas durante um projeto PIPE e foram cedidas pela Empresa Terra Azul Tecnologia de Polímeros Naturais Ltda. O processo de preparação, a saber, as condições reacionais de temperatura, atmosfera de preparação, tempo e sequência de adição de reagentes, não está descrito neste trabalho, por se tratar de segredo industrial. No entanto, a estrutura molecular da cadeia polimérica foi descrita neste trabalho (seção 5.1), já que é a mesma para todos os filmes formados a partir das dispersões aquosas. A diferença entre as dispersões está apenas nas condições e solventes secundários utilizados na preparação das dispersões aquosas.

Na **Parte I** desta tese, foram selecionados quatro filmes de poliuretanas, conforme os seguintes critérios: transparência, boa adesão ao substrato (placa de Petri), flexibilidade, superfície lisa e sem fraturas. Destes, foi selecionada a primeira poliuretana, nomeada WBPU-1 (WBPU). Os filmes foram preparados com a WBPU impregnada com nanopartículas de prata (Ag-NPs), caracterizados por ensaios físico-químicos e testadas as atividades citotóxicas e microbiológicas (testes de adesão e antibiofilme).

A partir dos resultados obtidos com esta WBPU-1, decidiu-se sintetizar uma nova poliuretana à base água (nomeada WBPU-2) no laboratório de Química Medicinal da UNIARA ainda em parceria com a Empresa Terra Azul Tecnologia de Polímeros Naturais Ltda. Com esta WBPU-2 foram preparados novos filmes contendo nanopartículas de prata e estes, por sua vez, foram caracterizados e foram testadas

as atividades citotóxicas e antibiofilme. Estes novos resultados foram agrupados na **Parte II** desta tese.

Para efeitos de simplificação, nos itens seguintes desta seção de materiais e métodos, nomeamos apenas WBPU. Portanto, os procedimentos foram os mesmos para WBPU-1 e WBPU-2 e, nos resultados e discussão, os dados obtidos foram separados para cada PU independentemente e depois comparados entre si. As amostras dos ensaios repetidos da WBPU-1 foram nomeadas WBPU3 (terceiro lote). A pesquisa foi desenvolvida com apenas duas poliuretanas (1 e 2).

4.1.2 Método De Preparação Dos Filmes De Pu (WBPU)

Os filmes de poliuretana foram preparados através do método de “*casting*”, no qual 5,0 gramas da dispersão aquosa de poliuretana foi espalhada sobre uma placa de Petri de poliestireno, para que o solvente fosse evaporado até a cura dos filmes.

Após 24 horas, foram observados os critérios pré-estabelecidos e, em seguida, determinado a massa seca dos polímeros.

4.2 A Escolha das Nanopartículas de Prata

Primeiramente, foram preparadas nanopartículas de prata no próprio laboratório de Química Medicinal e Biomateriais (LQMBio). Essas partículas foram parcialmente caracterizadas e sua atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de disco-difusão em ágar. As partículas foram obtidas em solução, porém, a concentração não foi suficiente para gerar atividade antimicrobiana.

Diante do desafio de obter novas partículas e do curto espaço de tempo restante (considerando uma restrição de tempo devido a ocorrência da Pandemia de COVID-19), optamos pela aquisição de nanopartículas comerciais. Logo, pelo fato de não terem sido utilizadas na preparação dos revestimentos antimicrobianos, a síntese e caracterização parcial das Ag-NPs preparadas em nossos laboratórios não foram adicionadas na parte principal deste trabalho, mas estão descritas no Apêndice A.

Assim, para dar continuidade a esta pesquisa, foram adquiridas nanopartículas esféricas de prata (Ag-NPs) com dimensão de 20 nm, fornecidas pela empresa (NanoBoost Ciência, Tecnologia e Comércio LTDA), pertencente ao Prof. Eduardo José Nassar, da Universidade de Franca.

4.3 Preparação dos Filmes de Poliuretanas Impregnados com Nanopartículas de Prata (WBPU-Ag)

Os filmes foram preparados pela adição de Ag-NPs em diferentes concentrações nas dispersões aquosas de poliuretana (WBPU-1 ou WBPU-2). O procedimento foi o mesmo para WBPU-1 e WBPU-2, os resultados e discussões foram separados em duas seções diferentes para abordar cada uma delas.

Nesse sentido, para calcular as concentrações de Ag-NPs a serem adicionadas aos filmes, foram consideradas as informações do fornecedor quanto à concentração mínima de Ag-NPs, ou seja, para atividade antimicrobiana, a concentração é de 100 ppm. Além disso, baseado em relatos da literatura (artigos e patentes) foi estabelecido uma solução estoque contendo 0,01 g de Ag-NPs dispersas em 1 mL de água Milli-Q. Ademais, um determinado volume desta solução estoque de Ag-NPs (de acordo com a concentração final desejada) foi adicionada lentamente à dispersão de WBPU e mantidas em agitação magnética vigorosa durante 30 minutos. Por conseguinte, essas dispersões de WBPU contendo nanopartículas de Ag-NPs foram colocadas em placas de Petri pelo método de “*casting*”. Logo após o término do preparo das soluções de WBPU com Ag-NPs, observou-se as dispersões de cor natural, branco leitoso do polímero. Essas dispersões espalhadas em placas de Petri foram deixadas em ar ambiente para secar.

Os primeiros filmes foram feitos com cinco concentrações de nanopartículas de Ag-NPs: 0,05%, 0,08%, 0,1%, 0,2% e 0,4% (%massa/massa em relação ao filme seco), e nomeados conforme o percentual. O quadro 1 demonstra a concentração de Ag-NPs em ppm para cada filme.

Quadro 1- Nomes dos filmes de WBPU-1 correspondentes as respectivas concentrações

WBPU-1-Ag0.05	100 ppm
WBPU-1-Ag0.08	160 ppm
WBPU-1-Ag0.1	200 ppm
WBPU-1-Ag0.2	400 ppm
WBPU-1-Ag0.4	800 ppm

4.4 Caracterização Físico - Química dos Filmes de PU

Para a caracterização físico-química dos filmes de WBPU puros e impregnados com Ag-NPs foram realizados os ensaios de Espectroscopia na região do Infravermelho Vermelho com o método de Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR), Análise Termogravimétrica (TGA) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

4.4.1 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier Modo de Reflexão Total Atenuada (Ftir-Atr)

Os espectros de infravermelhos foram obtidos no Instituto de Química de Araraquara – UNESP utilizando-se Espectrofotômetro de absorção na região do infravermelho médio com transformada de Fourier (FTIR) - VERTEX 70 da BRUKER, detector DLaTGS e faixa de leitura: 400 a 4000 cm^{-1} . Foi utilizado o acessório de ATR (Attenuated Total Reflectance) para a obtenção do espectro diretamente do filme das resinas.

4.4.2 Análise Termogravimétrica (TGA) das Amostras de Filmes Impregnados com Prata

O comportamento térmico da poliuretana e dos compósitos foram analisados pelo equipamento analisador termogravimétrico SDT-Q600 (TA Instruments) sob atmosfera de nitrogênio 50 mL/min. A temperatura do experimento foi definida entre 30 e 600°C com uma taxa de aquecimento em 10 ° C/min. As amostras foram pesadas e caracterizadas entre 3 a 10 mg e colocadas em cadinho de alumina.

4.4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi feita utilizando o microscópio JEOL, modelo JSM 6510. As amostras foram fixadas com auxílio de fita carbono em uma porta amostra (stub), a mesma foi revestida com ouro em uma câmara de ionização (BALTEC Med. 020).

4.5 Ensaio Biológicos dos Filmes de WBPU Pura e Impregnados com Ag-NPs

Para analisar a biocompatibilidade dos filmes de WBPU impregnados com Ag-NPs foram realizados os ensaios de citotoxicidade pelo método 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5-di- fenil brometo de tetrazolina (MTT), e para analisar a atividade antibacteriana foram realizados os testes de adesão e de antibiofilme.

4.5.1 Ensaio de Citotoxicidade (Preparo das Amostras)

O ensaio foi realizado no Laboratório de Ensaio Celulares e Engenharia Regenerativa (LECER) da UNIARA, dirigido pela Profa. Dra. Mônica Rosas da Costa lemma na Universidade de Araraquara – UNIARA.

A citotoxicidade é o primeiro ensaio para avaliar biocompatibilidade e toxicidade em células animais. Este ensaio foi realizado utilizando células da linhagem de fibroblasto L929 de murinos, conforme ISO 10993-5, pelo teste de contato indireto com MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). O protocolo encontra-se disponível no Apêndice C.

O preparo das amostras de WBPU e os ensaios de citotoxicidade envolveram 6 etapas: preparo dos corpos de prova; escolha do melhor método para esterilizar ou desinfetar as amostras; desenvolvimento do protocolo para desinfecção de alto nível das amostras; e realização de 3 ensaios de citotoxicidade.

Etapas 1 e 2 - Preparo dos corpos de prova, protocolo e desinfecção com glutaraldeído

O tamanho das amostras de superfície plásticas foi de 1 cm² baseado na ISO 10993-12 *Biological evaluation of medical devices — Part 12: Sample preparation and reference materials* (versão atualizada 2008).

Baseado neste protocolo, os corpos de prova (filmes de WBPU impregnados com Ag-NPs) foram cortados na dimensão de 1 cm², colocados em placas de Petri de poliestireno e procedido a desinfecção de alto nível. A desinfecção foi feita com glutaraldeído a 2% ativado e, as amostras ficaram submergidas por 30 minutos em placas de Petri fechadas. Em seguida, as amostras foram lavadas com água estéril e colocadas em estufa a 45° C para secar durante uma hora.

O protocolo para desinfecção de alto nível das amostras através de glutaraldeído a 2% foi adaptado e baseado nas recomendações da ANVISA (2007) e CDC (2008, atualizado em 2019), o qual encontra-se disponível no Apêndice B.

Após a desinfecção das amostras, foi realizado o primeiro ensaio de citotoxicidade.

Etapa 3 - Primeiro ensaio de citotoxicidade (filmes WBPU puro e contendo Ag-NPs)

Foram testadas as amostras controles, WBPU pura e WBPU impregnadas com Ag-NPs nas concentrações de 0,05%, 0,08%, 0,1%, 0,2% e 0,4% (%massa/massa em relação ao filme seco) todas em triplicatas.

Etapa 4 - Processo de desinfecção da WBPU

Nesta etapa, foi realizada uma desinfecção de alto nível com glutaraldeído apenas das amostras de WBPU puras (sem nanopartículas).

Etapa 5 - Segundo ensaio de citotoxicidade

Realizado o ensaio de citotoxicidade das amostras de WBPU não impregnadas com Ag-NPs.

Etapa 6 - Terceiro ensaio de citotoxicidade

Realizado ensaio das amostras de WBPU puras com Ag-NPs.

4.5.2 Ensaio Antimicrobianos

Realizaram-se os testes de adesão e antibiofilme para avaliar a inibição bacteriana de *S. aureus* pela presença de filmes impregnados com nanopartículas de prata.

Os ensaios antimicrobianos foram realizados no laboratório de microbiologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista (UNESP) dirigido pela Profa. Dra. Fernanda Brighenti e, executados pela Dra. Analú Barros de Oliveira.

O ensaio de adesão visou avaliar quantitativamente a ocorrência de aderência do organismo (*S. aureus*) à superfície de uma poliuretana com nanopartículas de prata. Por outro lado, o ensaio antibiofilme visou avaliar a formação de biofilme

bacteriano nos filmes impregnados com Ag-NPs em um período de 24 horas após a adesão de bactérias.

Preparo das amostras

Os filmes de poliuretanas impregnadas com nanopartículas de prata foram preparados com as mesmas concentrações descritas anteriormente. Como suporte para o preparo dos filmes foram utilizados discos plásticos com área de 20 mm², cortados em um vazador de aço 16 x 115 mm (diâmetro x comprimento). Em cada lado do disco foi espalhado 80 µl de poliuretana impregnada com nanopartículas de prata (WBPU-Ag), ou seja, o volume total de WBPU impregnado para cada disco foi de 160 µl. Das amostras de filmes de WBPU contendo nanopartículas de Ag-NPs, a figura 11 representa os discos com filmes impregnados em diferentes concentrações.

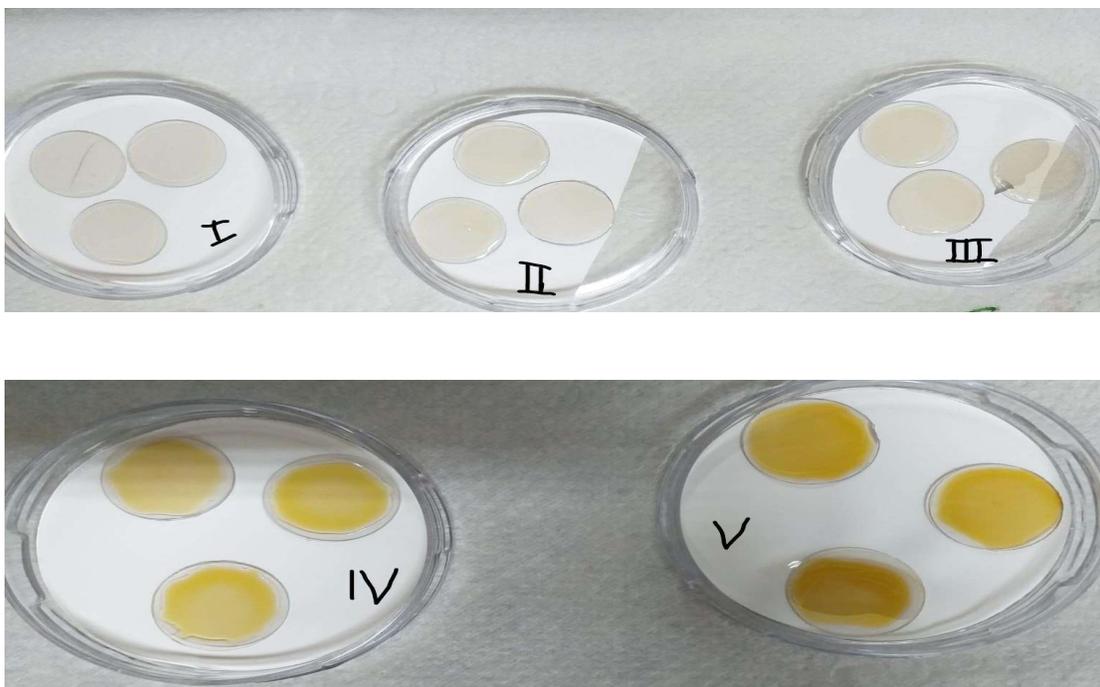


Figura 11- Imagem dos discos de WBPU impregnados com Ag-NPs nas concentrações I (0,05%), II (0,08%), III (0,1%), IV (0,2%) e V (0,4%). Secagem de 24 horas.

Fonte: Laboratório de Química Medicinal e Biomateriais (LQMBio), próprio autor, 2024.

Estas amostras foram esterilizadas por radiação ultravioleta durante 40 minutos antes dos testes de adesão e antibiofilme.

Ensaio de adesão e antibiofilme

Os ensaios de adesão e antibiofilme foram realizados utilizando uma cepa de *S.aureus* por ser um dos principais agentes causadores de infecção relacionada a cateter venoso.

Micro-organismos e condições de crescimento

A cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 utilizada foi obtida da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e mantida em caldo TSB a -80 °C. A reativação da cepa foi realizada de acordo com as seguintes condições de crescimento: meio de cultura ágar e caldo TBS, aerobiose a 37°C. Um inóculo do micro-organismo estudado foi preparado, ajustando-se a leitura da densidade óptica em 630 nm para 0,08 - 0,10 ($\sim 1 \times 10^8$ células/mL).

Triagem primária para a bioatividade da PU/Ag-NPs

Os experimentos foram feitos em uma única ocasião, identificados como n=1/grupo para o teste de adesão e, n = 2/grupo para o teste antibiofilme).

Grupos de estudo e preparo das amostras no laboratório de microbiologia

Para a confecção das amostras foi utilizado um cortador circular, a fim de se obter amostras de diâmetro e espessura homogêneas nos diferentes grupos de estudo, sendo que os seguintes grupos avaliados:

Grupo Controle negativo (WBPU): esse grupo corresponde ao material sem nenhum tratamento (sem nanopartículas) sendo mantido o plástico recortado sem revestimento, apenas nos meios de cultura padrão. As demais amostras de WBPU contendo Ag-NPs nas seguintes concentrações:

WBPU-1-Ag0.05 (0,05% de Ag-NPs)

WBPU-1-Ag0.08 (0,08% de Ag-NPs)

WBPU-1-Ag0.1 (0,1% de Ag-NPs)

WBPU-1-Ag0.2 (0,2% de Ag-NPs)

WBPU-1-Ag0.4 (0,4% de Ag-NPs)

Avaliação da adesão de *S. aureus* em superfície contendo PU/Ag-NPs

Para verificar o efeito da WBPU/Ag-NPs sobre a adesão (n=1/grupo) de *S. aureus*, foi preparada uma cultura contendo estirpes de *S. aureus*, conforme descrito acima. O cultivo bacteriano foi feito em caldo TSB, em seguida, as células foram coletadas por centrifugação a 5.000 x g por 10 min a 4 °C e lavadas duas vezes utilizando solução salina 0,85%. O centrifugado foi resuspenso em meio TSB (Gertz et al., 2009).

O método da avaliação de adesão foi adaptado a partir dos estudos conduzidos por Dat *et al.* (2014). Os espécimes (n=1/grupo) foram imersos em meio de cultura contendo uma suspensão de 10⁸ UFC/mL da cultura de *S. aureus*. Após 90', os espécimes foram retirados do meio de cultivo, lavados cuidadosamente com água destilada esterilizada e, posteriormente, colocados em tubos de ensaio com 1 mL de PBS e deixados por 30' em banho ultrassom para remoção das células aderidas. Após esse período, a suspensão foi homogeneizada e uma alíquota foi retirada para o preparo de diluições decimais, que foram plaqueadas pela técnica de microgotas (MORTON, 2001) em ágar de soja tríptico (TSA). Após incubação entre 12 e 24 h a 37 °C, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC).

Avaliação da atividade antibiofilme para *S. aureus* em superfície combinada de PU com nanopartículas de prata (PU/Ag-NPs)

A atuação da WBPU/Ag-NPs sobre o biofilme foi avaliada durante o momento de formação (n= 2/ grupo).

Utilizando as condições de crescimento descritas acima, em placas de 24 poços, um volume de 1,5 mL das suspensões bacterianas foi adicionado em cada poço das placas. Concomitantemente, espécimes de cada grupo experimental (n = 2/grupo) foram colocados individualmente nos poços da placa de 24 poços durante a formação do biofilme. As placas foram levadas para incubação por 24 horas a 37°C sob agitação orbital (75 rpm).

Após 24 horas de incubação, as amostras de cada grupo experimental foram removidas dos poços contendo biofilmes e analisados utilizando métodos padrão de análise microbiológica de cultivo microbiano, este método foi usado para determinar e verificar a quantidade de células viáveis via unidades formadoras de colônias (UFC).

As amostras de cada grupo experimental foram retiradas de cada poço das placas de 24 poços com o auxílio de uma pinça esterilizada, e transferidos para tubo de vidro contendo 2 mL de NaCl 0,89%. Os tubos com as amostras foram colocados em um béquer contendo água MilliQ esterilizada e sonicados por 10 min (em banho ultrassônico – marca Cristófoli, Campo Mourão, PR, Brazil, 42 kHz), para remoção dos biofilmes das amostras. A suspensão de cada biofilme foi transferida para novo tubo tipo Falcon de 15 mL, e os tubos de vidro foram lavados com 3 mL de NaCl 0,89%, os quais também foram transferidos para o tubo Falcon correspondente a cada amostra, totalizando 5 mL da suspensão de biofilme. A suspensão foi homogeneizada por 30 segundos à 7 watts (Sonicador modelo Q125, QSonica) e processada.

Do volume de 5 mL, 0,2 mL, foram separados para diluição seriada e plaqueamento (semeadura em placa de ágar TSA), seguida de incubação por 24 horas à 37°C, para contagem de UFC. O quadro-2 apresenta um resumo dos testes de adesão e antibiofilme.

Quadro 2- Etapas dos testes de adesão e antibiofilme

Teste de adesão	Teste de antibiofilme
Espécimes foram imersos em um meio de cultura contendo 10^8 UFC/mL da cultura de <i>S. aureus</i> .	Espécimes do grupo experimental foram colocados individualmente nos poços (placa de 24 poços) contendo 1,5 mL das suspensões bacterianas.
após 90 min, os espécimes foram retirados do meio de cultivo; lavados com água estéril; colocados em banho de ultrassom por 30' para a remoção das células aderidas e uma alíquota foi retirada da suspensão homogeneizada; feito diluição seriada e semeadura em placa de ágar TSA.	as placas foram submetidas a incubação por 24 horas a 37°C sob agitação orbital (75 rpm) para a formação de biofilme; em seguida as amostras foram retiradas, depositadas em tubos de vidro e sonicados por 10' para a remoção dos biofilmes das amostras; a suspensão de cada biofilme foi transferida para tubos de Falcon; retirado uma alíquota; feito diluição seriada e semeadura em placa de ágar TSA.
após a incubação entre 12 e 24 h a 37 °C, foi realizada a contagem das UFC.	após incubação por 24 horas à 37°C, foi realizada a contagem das UFC.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES (PARTE I)

Os resultados desta pesquisa estão descritos em Parte I e Parte II. Nesta seção são exibidos e discutidos os resultados obtidos dos primeiros experimentos em porcentagens.

5.1 Poliuretana (WBPU)

A primeira WBPU utilizada para preparar os filmes estava disponível no laboratório de Química Medicinal e Biomateriais (LQMBio). Esta dispersão foi preparada durante um projeto PIPE e cedida pela Empresa Terra Azul Tecnologia de Polímeros Naturais Ltda.

Todavia, a síntese básica consistiu na reação de biopoliol derivado de óleo vegetal, nomeadamente óleo de mamona, com o isocianato alifático 4,4'-Metileno-bis(ciclohexil isocianato) ou H₁₂MDI. Também se utilizou o polioli ácido 2,2-Bis(hidroximetil) propionico acid (DMPA), para proporcionar a solubilização da cadeia polimérica da PU em água. O esquema reacional da formação da cadeia da poliuretana e sua estrutura química é ilustrada na figura 12.

As variações entre as várias sínteses das dispersões consistiram na mudança das condições de reação e solvente orgânico utilizado na preparação.

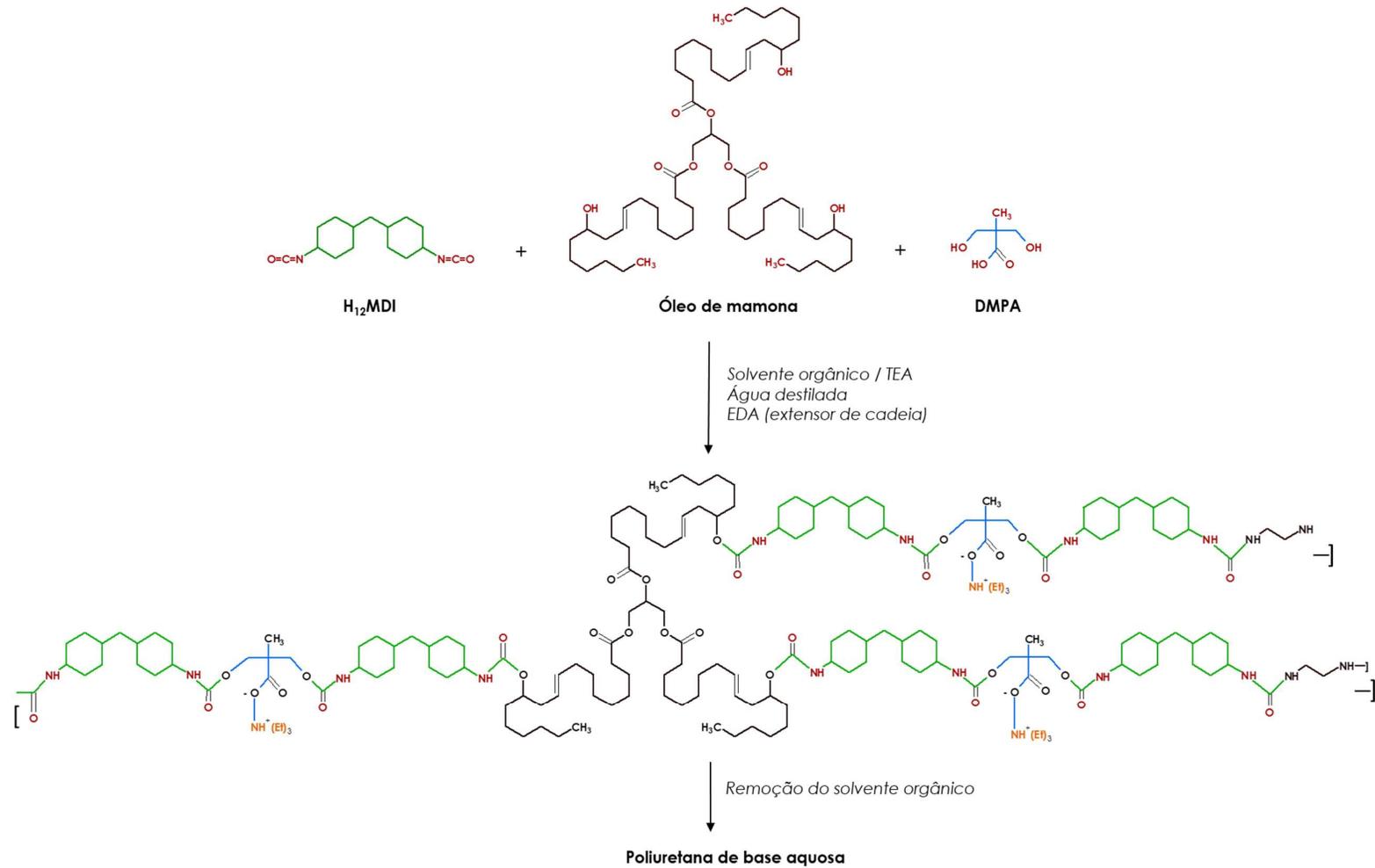


Figura 12- Esquema de síntese da Poliuretana.

Fonte: Imagem cedida pelo Prof. Dr. Maurício Cavicchioli sobre a poliuretana sintetizada à base de óleo de mamona.

5.2. Escolha da Poliuretana

Haviam 4 dispersões aquosas de PUs disponíveis no laboratório e a escolha foi feita a partir dos critérios pré-estabelecidos.

A figura 12 exibe imagens dos filmes de PU gerados pelo método de “casting” e selecionados conforme as características mais adequadas ao propósito desta pesquisa, isto é, aplicação em dispositivo intravenoso periférico.

Etapa 1.1 - As dispersões secaram em 24 horas e formaram filmes de poliuretanas, cujas imagens estão na Figura 13. Dentre todos os filmes obtidos das dispersões disponíveis no laboratório de Química, foram selecionados esses 4 filmes de PU, considerando as melhores características ópticas (transparência), de aderência e menor fragilidade (menos quebradiças).

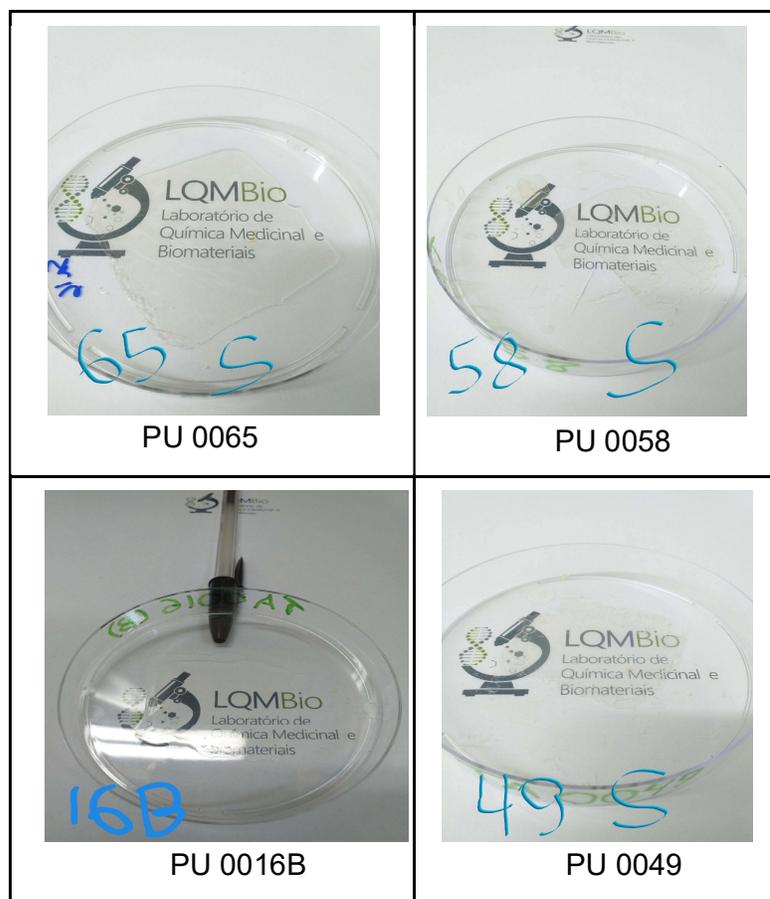


Figura 13- Imagens dos filmes de PUs puras formadas após 24 horas de secagem das respectivas dispersões aquosas. Essas poliuretanas foram selecionadas em relação às características ópticas, aderência e fragilidade.

Fonte: Laboratório de Química Medicinal e Biomateriais (LQMBio), próprio autor, 2023.

Etapa 1.II - Nesta etapa, foram feitos os cálculos de massa seca da PU nas dispersões aquosas. Estes cálculos são importantes para que depois pudéssemos calcular a porcentagem ou concentração das nanopartículas de prata a serem adicionadas à dispersão aquosa.

Para verificar a massa seca desses filmes, foram espalhados 3 mL das dispersões de PU selecionadas em 4 recipientes (tampas) plásticos, mantidas em estufa a 45 graus e pesadas diariamente até obter-se a estabilização das amostras, cujo período foi de 6 dias consecutivos. Segue a Tabela 1, que exhibe o comparativo das massas secas das quatro PUs selecionadas e pesadas durante o período.

Tabela 1 - Variação de massa seca durante o período de 6 dias de 4 tipos de poliuretanas:

Porcentagem de PUs Puras em 6 dias consecutivos em Setembro de 2023				
	PU 0065	PU 0049	PU 0016 (B)	PU 0058
1º dia MS - %	0,879 - 29,3 %	1,305 - 43,5 %	0,67 - 22,33 %	0,818 - 27,26 %
2º dia MS - %	0,805 - 26,8 %	1,16 - 38,6 %	0,565 - 18,8 %	0,696 - 23,2 %
3º dia MS - %	0,791 - 26,4 %	1,056 - 35,2 %	0,551 - 18,36 %	0,67 - 22,33 %
5º dia MS - %	0,77 - 25,6 %	1,018 - 33,9 %	0,538 - 17,9 %	0,656 - 21,9 %
6º dia MS - %	0,76 - 25,33 %	0,992 - 33,06 %	0,531 - 17,7 %	0,654 - 21,8 %

A PU 0065 apresentou 25,33% de massa seca estabilizada no sexto dia após o espalhamento nos recipientes plásticos, e foi escolhida por apresentar-se transparente, lisa e com boa adesão ao substrato, ou seja, características mais adequadas para um revestimento a ser aplicado em cateter intravenoso periférico. Para padronizar esta pesquisa, a PU 0065 foi nomeada WBPU-1 ou simplesmente WBPU na Parte I.

5.3 Filmes Formados a Partir da WBPU-1 com as Ag-NPs

Etapa I – Poliuretana base água impregnada com nanopartículas de prata (Ag-NPs)

A figura 14, mostra imagens após 96 horas de formação dos filmes de WBPU-1 contendo Ag-NPs nas concentrações de 0,05%, 0,08%, 0,1%, 0,2% e 0,4%, respectivamente identificados como: WBPU-1-Ag0.05; WBPU-1-Ag0.08; WBPU-1-Ag0.1; WBPU-1-Ag0.2 e WBPU-1-Ag0.4.

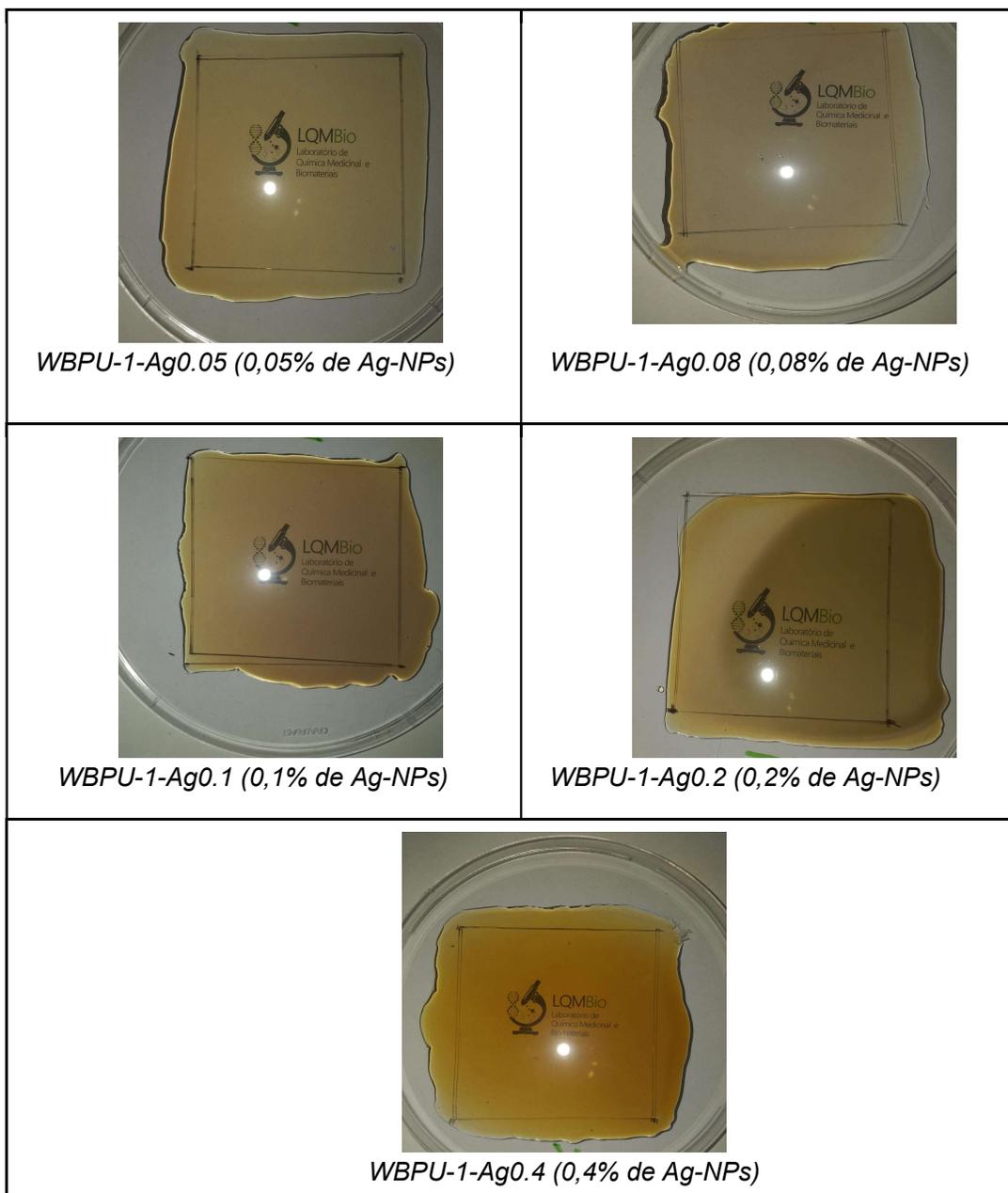


Figura 14- Imagens dos filmes de PU puras formados após 96 horas de secagem de respectivas dispersões aquosas.

Fonte: Laboratório de Química Medicinal e Biomateriais (LQMBio), próprio autor, 2023.

Em atmosfera ambiente, após 96h, as dispersões formaram filmes transparentes com tonalidade amarela característica da prata em todas as amostras e mais intensa nas amostras WBPU-Ag0.2 e WBPU-Ag0.4 (placas com maior concentração de NPs). Todos os filmes estavam visualmente lisos e com boa adesão a placa de poliestireno.

OBS: na amostra WBPU-Ag0.2, nota-se uma área sombreada, que ao toque é percebido uma discreta elevação do filme indicando que ocorreu um escorrimento maior de WBPU, nesta área da placa de Petri, ocasionando essa diferença de tonalidade.

5.4 Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier com Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR)

O espectro de FTIR da resina pura e incorporada com as Ag-NPs, são apresentadas na figura 15.

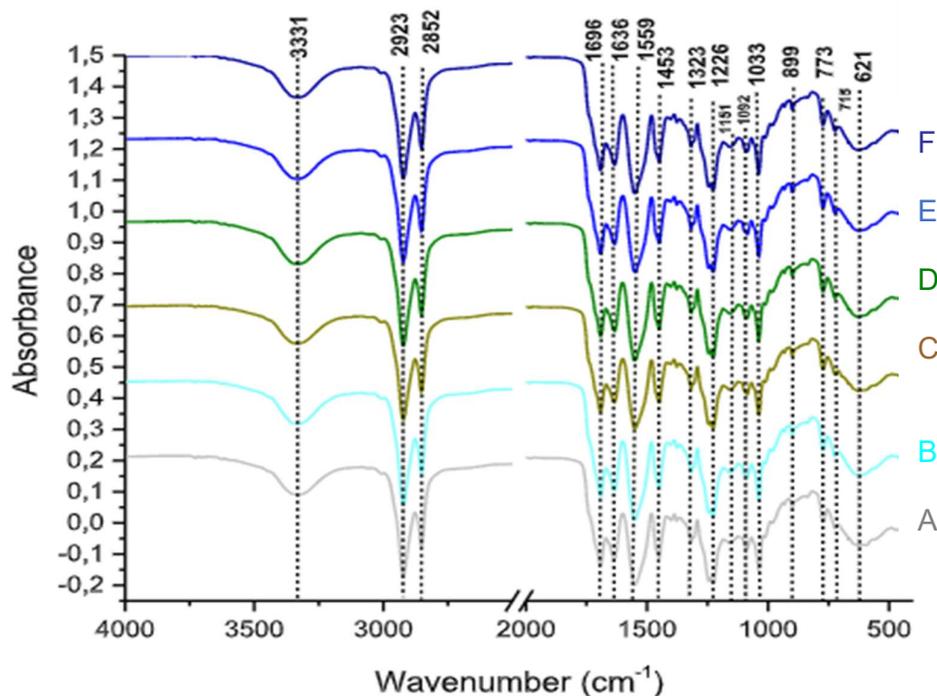


Figura 15- Espectroscopia FTIR da película de WBPU na região do infravermelho com a técnica de refletância atenuada total da poliuretana pura e impregnada com AgNPs. Em A) WBPU, B), WBPU-Ag0,05, C) WBPU-Ag0,08, D) WBPU-Ag0,1, E) WBPU-Ag0,2 e F) WBPU-Ag0,4, respectivamente. Fonte: próprio autor.

Com relação ao espectro da poliuretana pura, a banda 3332 cm^{-1} na região de $3500\text{-}3300$ foi atribuída ao estiramento do NH do grupo amida primária (extensor de cadeia) e não ao grupo hidroxila, considerando que o poliál reagiu com o diisocianato; a banda 2922 cm^{-1} na região de $2970\text{ - }2850\text{ cm}^{-1}$ do grupo alceno foi atribuída ao estiramento do C-H do óleo de mamona ou grupo substituinte contendo

CH₂ do diisocianato e, a banda 1691cm⁻¹ na região entre 1820-1630 cm⁻¹ foi atribuído ao estiramento de grupos -C=O, ésteres (LOPES;FASCIO.,2004).

Além disso, foi observado a presença de grupos relacionados ao grupo uretano (C=O e N-H) nas bandas 1691cm⁻¹, 1636cm⁻¹ e 3332 cm⁻¹, que confirmam a formação da cadeia polimérica (DE ALMEIDA; SOARES GOULART; CLARO NETO, 2016). Uma informação importante sobre a espectroscopia no IR da poliuretana em relação ao H₁₂MDI é a ausência de banda na região 2000-2300 que é atribuída ao grupo N=C=O, isocianato (DE ALMEIDA; SOARES GOULART; CLARO NETO, 2016), ou seja, toda a reação de polimerização ocorreu e não restou resíduo deste reagente.

O espectro da resina com nanopartículas de prata não mostra alterações entre as bandas dos filmes contendo nanopartículas de prata comparadas ao espectro da poliuretana pura (WBPU).

Concluiu-se que não houve interação química com os íons de prata, apenas interação física.

5.5 Análise Termogravimétrica (TGA) das Amostras de Filmes Impregnados com Prata

5.5.1 TGA PU/Ag-NPs

Foram feitas as análises termogravimétricas (TGA) dos filmes de WBPU-1 puro e contendo nanopartículas de prata nas cinco concentrações citadas (0,05%, 0,08%, 0,1%, 0,2% e 0,4%).

O ensaio foi realizado em atmosfera de nitrogênio porque o objetivo era analisar somente a perda de massa, sem considerar os resíduos. O mesmo foi realizado na faixa de temperatura entre 29 °C e 600 °C. O gráfico perda de massa x temperatura mostra a decomposição dos filmes de WBPU pura e incorporadas com Ag-NPs.

A figura 16 mostra o gráfico da TGA dos filmes WBPU puro e WBPU-Ag.

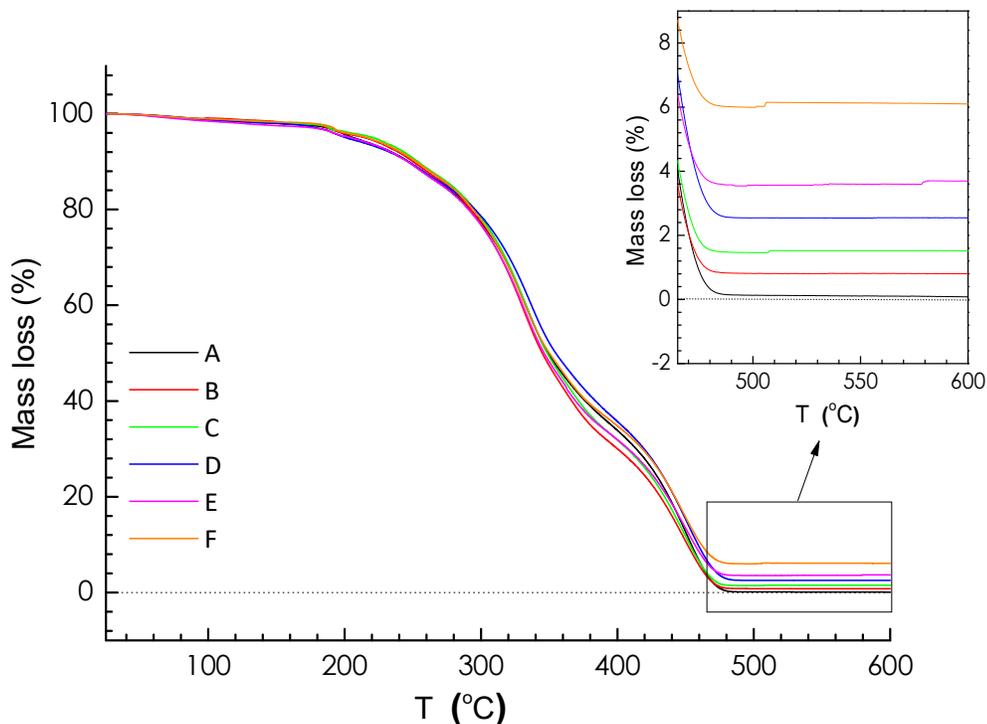


Figura 16- Curva termogravimétrica das amostras: A) WBPU-1; B) WBPU-1-Ag0.05; C) WBPU-1-Ag0.08; D) WBPU-1-Ag0.1; E) WBPU-1-Ag0.2 and F) WBPU-1-Ag0.4.

Inserido: a) Visão ampliada da curva termogravimétrica de 470 a 600° C.

Fonte: próprio autor.

A cinética de liberação de voláteis ocorre antes do início da decomposição térmica, isto é, antes de 200° C. Observa-se que a decomposição térmica da WBPU ocorre acima de 200° C e se completa abaixo de 500° C. O espectro da WBPU pura mostra 100% de perda de massa. Entretanto, os filmes contendo Ag-NPs apresentam resíduos entre as temperaturas de 500 a 600° C. A princípio, estes resíduos consistem em óxidos metálicos formados a partir da presença das Ag-NPs, porém, a confirmação se daria a partir de um ensaio de DRX. O filme WBPU-1-Ag0.4 com maior concentração de Ag-NPs resulta em maior percentual de resíduo metálico observado a partir dos 500° C.

5.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A MEV da amostra com maior concentração de NPs, 0,4%, foi realizada com o objetivo de visualizar a distribuição da prata. A figura 17-a mostra a imagem da superfície do filme WBPU-1-Ag0.4, onde as áreas mais claras correspondem aos aglomerados de nanopartículas de prata com resolução de 2500x numa escala de 10

μm , e, a figura 17-b mostra uma imagem em secção transversal da película WBPU-1-Ag0.4.

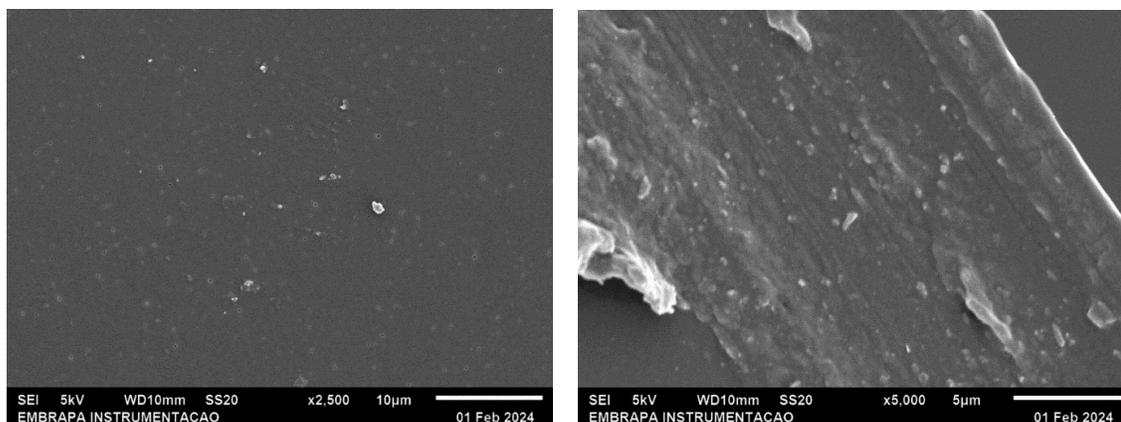


Figura 17- (a,b) - Microscopia eletrônica de varredura (MEV). a) Imagem da superfície da película de poliuretano incorporada com nanopartículas de prata; b) Microscopia eletrônica de varredura (MEV). Imagem da película de poliuretano, seção transversal, incorporada com nanopartículas de prata.

A primeira imagem (figura 17-a) obtida da MEV correspondente à superfície do filme, onde são observados pontos claros dispersos em toda a imagem, que correspondem às partículas de prata, rodeadas de estabilizante, sugerindo uma distribuição homogênea das NPs. No entanto, o aumento da imagem é de 2500x numa escala de 10 μm , portanto, entende-se que os pontos claros maiores correspondem a aglomerados nanopartículas de prata. Já a segunda imagem (figura 17-b), corresponde a uma seção transversal do filme de poliuretano, onde são vistos pontos claros dispersos na imagem. O aumento é de 5000x numa escala de 5 μm , logo, os pontos claros maiores correspondem aos aglomerados de nanopartículas de prata. A dispersão de aglomerados sugere também a dispersão das nanopartículas no filme. Logo, a confirmação da dispersão das nanopartículas de prata só pode ser feita através de imagem por microscopia de força atômica.

5.7 Ensaio de Determinação da Atividade Antibacteriana para Antibiofilme dos Filmes Impregnadas com Ag-NPS

A figura 18 ilustra as etapas dos ensaios microbiológicos de adesão e antibiofilme concomitantemente, exibindo a transferência dos espécimes (discos de WBPU-1/Ag-NPs) para uma placa de 24 poços contendo suspensão de *S.aures* 10^8

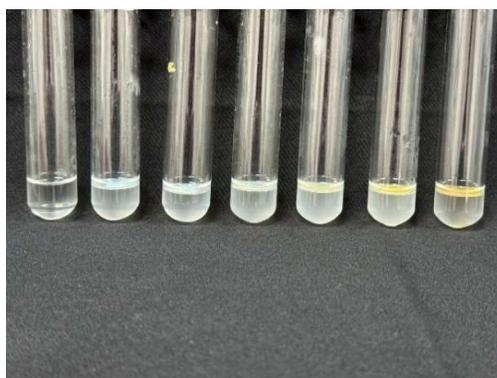
UFC/mL; a retirada das amostras do meio de cultura; os tubos de vidro após ressuspensão; em seguida a ultra sonificação e as placas de cultivo em ágar TSA com as UFC.



Transferência dos espécimes (discos de WBPU/Ag-NPs) para a placa de 24 poços



Retirada dos espécimes da placa



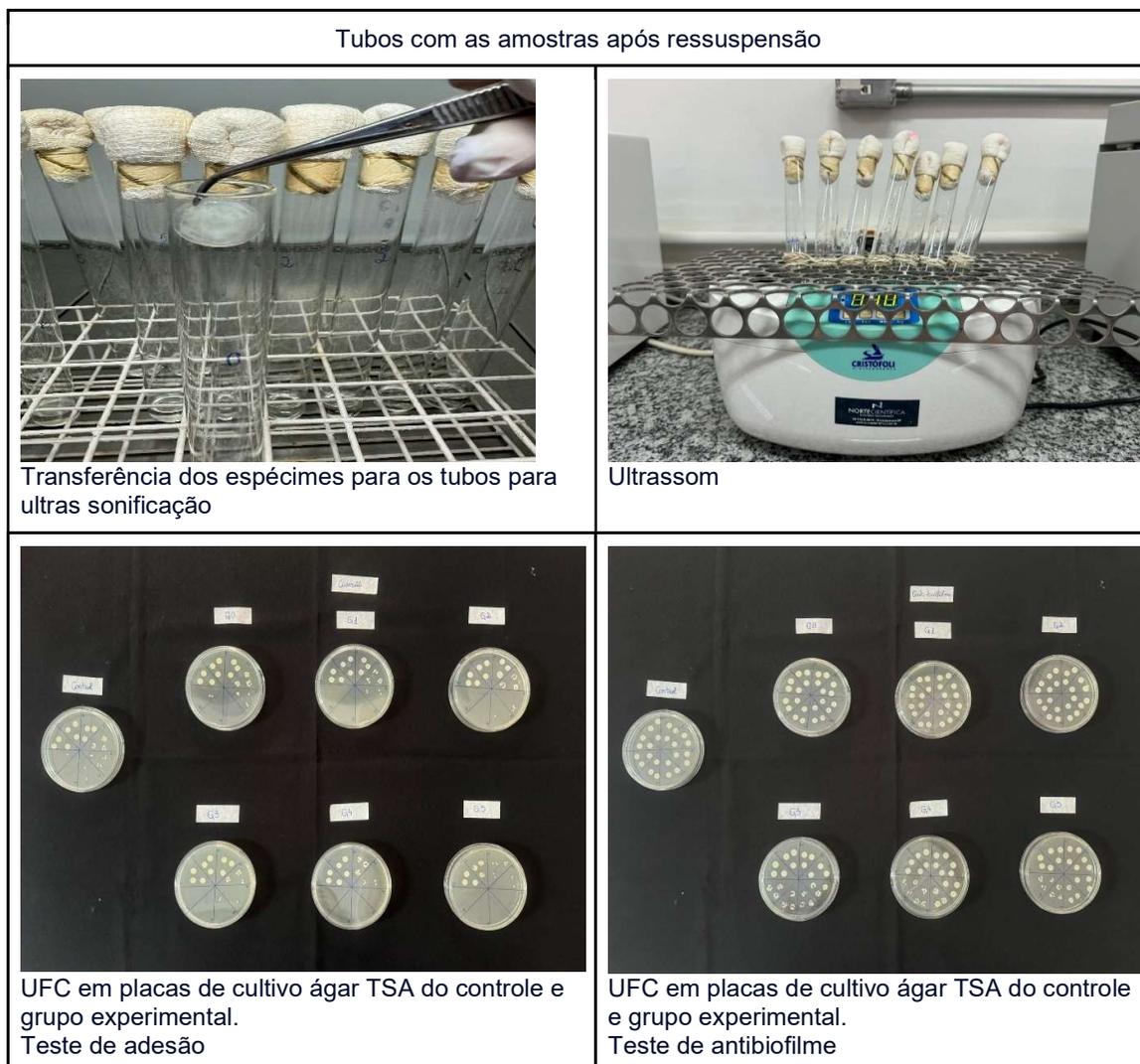


Figura 18- Etapas dos testes de adesão e antibiofilme. As últimas imagens em paralelo, são representativas de uma das etapas finais do experimento. Os pontinhos claros nas placas de Petri correspondem a UFC das diluições seriadas das amostras.

Fonte: Departamento de Morfologia e Odontopediatria da UNESP, 2024.

Teste de adesão

Os grupos experimentais apresentaram redução na capacidade de adesão de *S. aureus* concomitante ao aumento da concentração de Ag-NPs, conforme pode ser visto na figura 19:

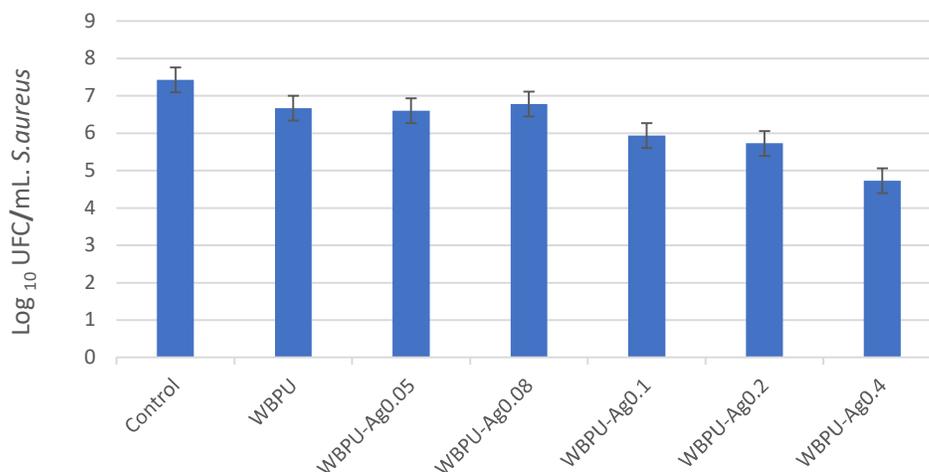


Figura 19- Resultados de carga microbiana de *S. aureus* para o teste de adesão expressos em Log₁₀ UFC/mL.

Fonte: Departamento de Morfologia e Odontopediatria da UNESP, 2024.

A tabela 2 mostra o percentual de redução de *S. aureus* na presença da WBPU e na presença dos filmes de WBPU contendo Ag-NPs.

Tabela 2 - Teste de adesão

Amostra	Log ₁₀ UFC/mL	Inibição da adesão (%)
Controle	7,43	0,00
WBPU	6,67	10,19
WBPU-1-Ag0.05	6,60	11,09
WBPU-1-Ag0.08	6,78	8,72
WBPU-1-Ag0.1	5,94	20,04
WBPU-1-Ag0.2	5,73	22,88
WBPU-1-Ag0.4	4,73	36,35

Teste antibiofilme

Os grupos experimentais apresentam uma redução na capacidade antibiofilme de *S. aureus* em que o percentual de maior inibição bacteriana foi encontrado no grupo WBPU-1-Ag0.4.

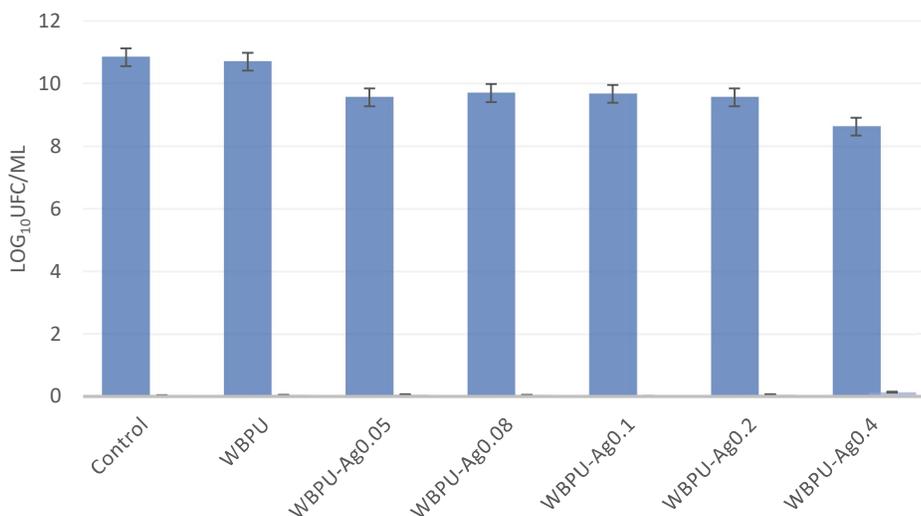


Figura 20- Resultados de carga microbiana de *S.aureus* para o teste antibiofilme expressos em Log₁₀ UFC/mL.

Fonte: Departamento de Morfologia e Odontopediatria da UNESP, 2024.

A tabela 3 mostra o percentual de redução de *S.aureus* dos filmes de WBPU.

Tabela 3 - Teste de antibiofilme

Amostra	Log ₁₀ UFC/mL	Inibição de biofilme (%)
Controle	10,84	0
WBPU-1	10,67	1,35
WBPU-1-Ag0.05	9,56	11,82
WBPU-1-Ag0.08	9,69	10,57
WBPU-1-Ag0.1	9,67	10,84
WBPU-1-Ag0.2	9,56	11,82
WBPU-1-Ag0.4	8,62	20,47

Os ensaios de adesão e antibiofilme foram feitos para analisar os filmes constituídos de WBPU-1 com nanopartículas de prata nas concentrações de 0,05%, 0,08%, 0,1%, 0,2% e 0,4%, em presença de *S. aureus*.

Outrossim, os gráficos de adesão e antibiofilme demonstram que ocorreu uma redução de colônias de *S.aureus* relacionado ao aumento da concentração de Ag-NPs nos filmes.

Na literatura, foi encontrado que modelos matemáticos preveem que uma concentração de 0,8% de partículas submicrométricas de prata metálica é ativa numa área de 450 cm²/g de poliuretano para cateter venoso central (GUGGENBICHLER, 1999).

No teste antibiofilme da presente pesquisa, considerando o ponto de partida, nomeado WBPU, foi observado uma redução de 1,35% de adesão de bactérias, somente com a presença da poliuretana. Por sua vez, ao se adicionar 0,4% de Ag-NPs à poliuretana, a redução aumentou para 20,47% (WBPU-1-Ag0.4), ou seja, 1/5 das bactérias não aderiram ao filme e, no ensaio de adesão ocorreu uma redução de 36,35% na WBPU-1-Ag0.4.

Em ambos os gráficos de adesão de *S.aureus* e de atividade antibiofilme é observado uma diferença de 2 logs entre o Grupo Controle Negativo (WBPU) e o Grupo Controle Positivo (WBPU-1-Ag0.4), indicando ação antimicrobiana comparável a citado na PATENTE BR 102018076890-5 A2, em que os cateteres monolúmen em Poliuretano Radiopaco foram recobertos com nano fibra de PVA formando revestimento com gramatura de 0,2 mg/ mm² contendo no mínimo 0,001 µg de nanopartículas de prata por mm². Esses cateteres foram submetidos a avaliação *in vitro* para formação de biofilme através de exposição a uma cultura *overnight* durante um período de 30 dias. No período de 3 a 10 primeiros dias, as amostras revestidas apresentaram faixas de inibição sobre microrganismo de até 2 logs.

Acerca de outro trabalho sobre revestimento nanocompósito baseado em nanopartículas híbridas de Fe₃O₄-Ag, numa poliuretana acrílica, foi avaliado o crescimento de *E.coli*. Observou-se, que a taxa de crescimento foi quase similar entre a cultura pura e as expostas ao revestimento. Após 5 horas, ocorreu menos crescimento em cerca de 5% na presença de nanocompósito contendo nanopartículas de Ag em relação a cultura pura (T.N.L. NGUYEN, et al., 2019). Esse estudo demonstrou o potencial antibacteriano das nanopartículas de prata.

Logo que, em um estudo dentário, 0,05% de Ag-NPs com um tamanho médio de 7,2 nm foram adicionadas à resina de polimetilmetacrilato (PMMA). Neste estudo, foi relatado que as Ag-NPs incorporadas na matriz polimérica foram eficazes na redução da atividade metabólica dos biofilmes de *C. glabrata* (57% P = 0,007). Quanto à análise termogravimétrica, observaram que a degradação do PMMA e de seus compósitos ocorreu em etapas, iniciando em torno de 200° C, justificada pelo

rompimento dos grupos funcionais do PMMA e pelo teor de nanopartículas (NETO SOUZA; SALA; FERNANDES. et al., 2019).

O presente estudo obteve uma redução significativa de 11,82% na atividade metabólica do biofilme (*S. aureus*) em amostras WBPU-1 com a adição de 0,05% de Ag-NPs com um tamanho médio de 20 nm, ou seja, análogo ao trabalho supracitado, quanto menor o tamanho das nanopartículas, maior a atividade antimicrobiana.

Estes estudos demonstram o potencial das Ag-NPs como carga antimicrobiana eficaz, tanto para fungos (*C. glabrata*) quanto para bactérias (*S. aureus*). Além disso, na presente pesquisa, a degradação inicial também foi observada perto de 200° C, semelhante ao trabalho de NETO SOUZA; SALA; FERNANDES. et al., 2019.

Conclusão parcial

Os ensaios de adesão e antibiofilme apresentaram-se relevantes com atividade antimicrobiana comparável a alguns achados da literatura. Logo, filmes de poliuretana com propriedade antimicrobiana representam expectativas futuras de prevenção e combate a infecções.

5.8 Ensaios de Citotoxicidade dos Filmes de WBPU-1 Impregnados com Nanopartículas Comerciais de Prata

O ensaio de citotoxicidade permite avaliar a viabilidade celular em um meio de cultura chamado “condicionado”, isto é, após exposição prévia a uma amostra. Para realizar o experimento pelo método eluato e avaliação MTT é indicado proceder a desinfecção de alto nível dos corpos de prova para não comprometer a análise pela presença e crescimento bacteriano no meio de cultura celular.

Em vista disso, o glutaraldeído foi a primeira escolha como opção desinfetante por ser indicado para amostras termo sensíveis, e, portanto, não alteraria a estrutura polimérica. Logo, as amostras de poliuretana com Ag-NPs foram submetidas à desinfecção de glutaraldeído a 2% e encaminhadas ao primeiro ensaio de citotoxicidade. A figura 21 mostra a porcentagem de crescimento celular em presença do “meio de cultura condicionado”.

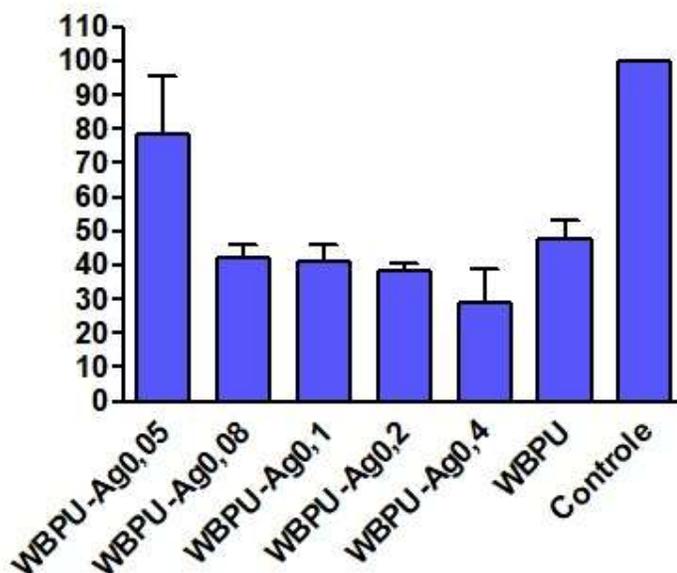


Figura 21- Ensaio de viabilidade celular dos filmes de PU impregnados com nanopartículas de Ag. Fonte: Laboratório de Ensaio Celulares e Engenharia Regenerativa (LECER) da UNIARA da UNIARA.

O gráfico da figura 21 dos filmes de WBPU-1 pura e impregnados com Ag-NPs mostra todas as barras abaixo de 70%, exceto a amostra WBPU-1-Ag0,05. No entanto, como os filmes são de poliuretana, esperava-se que não haveria citotoxicidade na amostra WBPU-1 pura. Diante destes resultados foi inferido que poderia ter nestas amostras resíduos de glutaraldeído e o resultado foi inconclusivo.

Contudo, foi realizado o segundo ensaio de citotoxicidade somente da poliuretana pura (WBPU-1) como “teste piloto”. As amostras deste teste foram feitas com os filmes de poliuretana pura, preparadas nas mesmas condições do primeiro ensaio, com a dimensão de 1 cm², desinfetadas com glutaraldeído, porém, lavadas rigorosamente de três formas diferentes.

O gráfico da figura 22 refere-se aos filmes de poliuretana pura e mostra todas as colunas entre 70% e 80%.

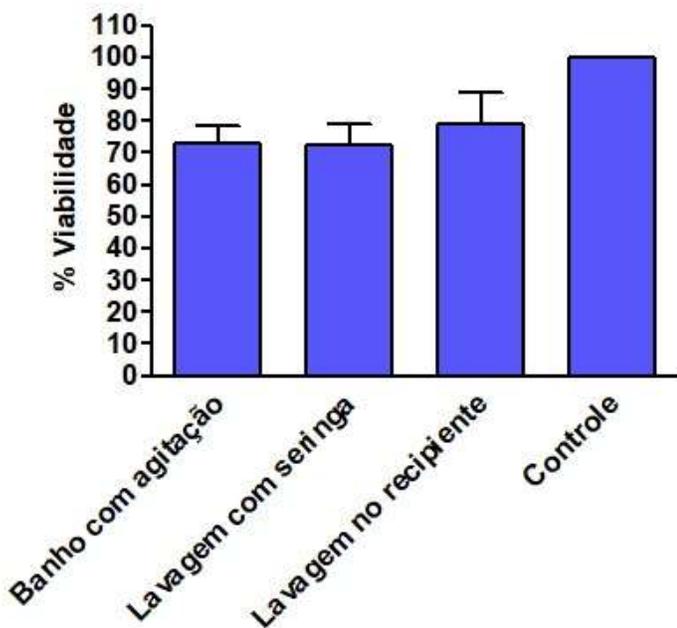


Figura 22- Viabilidade celular x Métodos de desinfecção de amostras de poliuretanas.
 Fonte: Laboratório de Ensaio Celulares e Engenharia Regenerativa (LECER) da UNIARA da UNIARA.

As três formas de lavagem das amostras, que tinha como objetivo também investigar qual seria o melhor método de evitar resíduos de glutaraldeído, mostraram-se eficazes, isto sugere não ter havido interferência de resíduos de glutaraldeído.

Portanto, foi decidido realizar outro ensaio de citotoxicidade dos filmes de poliuretana (WBPU-1), impregnados com Ag-NPs.

No entanto, a viabilidades celular mostrou-se próxima ao limiar de 70%. Assim, para esclarecer ou confirmar a citotoxicidade dos filmes, foi decidido fazer o terceiro ensaio das amostras de WBPU-1 contendo Ag-NPs através de outro método de citotoxicidade, excluindo o glutaraldeído e a radiação ultravioleta. Dessa forma, as amostras dos filmes WBPU-1-Ag foram novamente preparadas sem desinfecção prévia nas dimensões de 1 cm² e encaminhadas ao laboratório de citotoxicidade.

Por conseguinte, o terceiro ensaio de citotoxicidade, assim como os primeiros, utilizou fibroblastos murino derivados de tecido conjuntivo (L929) adquiridos da ATCC (American Type Culture Collection), que foram cedidas pelo laboratório da Prof^a. Gisele Faria da Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP. O protocolo adotado e descrito pela pesquisadora Dra. Marina Fontes está disponibilizado para leitura no [Apêndice C](#).

A figura 23 exibe o gráfico do terceiro ensaio de citotoxicidade:

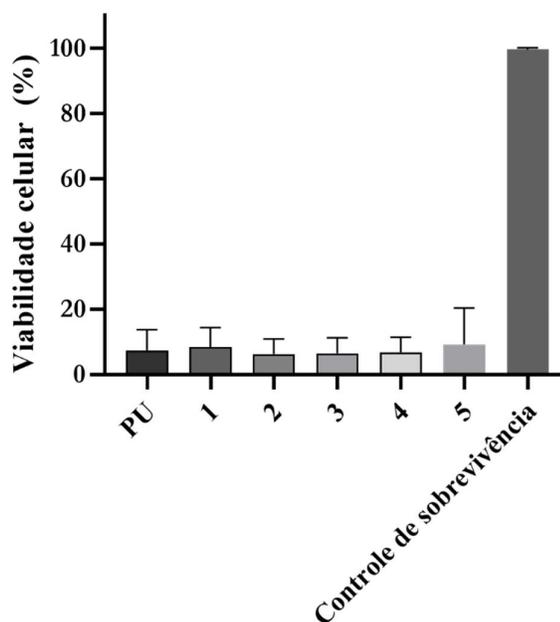


Figura 23- Terceiro ensaio de citotoxicidade: PU) WBPU-1; 1) WBPU-1-Ag0.05; 2) WBPU-1-Ag0.08; 3) WBPU-1-Ag0.1; 4) WBPU-1-Ag0.2 e 5) WBPU-1-Ag0.4.

Fonte: Laboratório de Ensaio Celulares e Engenharia Regenerativa (LECER) da UNIARA da UNIARA.

Foi observado citotoxicidade para as células L929, com uma redução drástica da viabilidade celular. De acordo com a ISO 10993-5, os materiais/substâncias testadas são consideradas atóxicas quando à viabilidade celular se mantêm $\geq 70\%$.

Discussão parcial

No primeiro ensaio, as amostras de WBPU-1 e impregnadas com Ag-NPs (WBPU-1-Ag), desinfetadas através de exposição ao glutaraldeído, apresentaram viabilidade celular abaixo de 70%, exceto a WBPU-1-Ag0,05.

Neste ensaio, pode ser observado que à medida que aumentou a concentração de nanopartículas de prata, diminuiu a viabilidade celular.

Ressalta-se que, as amostras puras e impregnadas com Ag-NPs foram expostas ao glutaraldeído. Entretanto, a citotoxicidade não pode ser atribuída a resíduos de glutaraldeído, uma vez que as amostras de poliuretano pura expostas ao

glutaraldeído, lavadas rigorosamente, demonstraram viabilidade celular aceitável, ainda que no limiar, em torno de 70%, conforme visto no gráfico da figura 24.

Além disso, no terceiro ensaio, as amostras não foram expostas ao glutaraldeído e todas elas apresentaram citotoxicidade, inclusive a poliuretana pura (WBPU-1).

Dentro desta análise, foi decidido sintetizar outra poliuretana, pois, foi inferido possível citotoxicidade a resíduos de solventes da poliuretana.

5.9 Conclusão da Parte I

As nanopartículas de Ag utilizadas neste trabalho são ativas antimicrobianamente a uma concentração de pelo menos 100 ppm, conforme informação do fornecedor. Porém, como essas NPs seriam dispersas numa poliuretana, optou-se para garantir atividade antibacteriana por aumentar a concentração da solução estoque em 10 vezes (0,01 g/mL) de NPs, ou seja, 1000 ppm, com base em estudos da literatura.

Inicialmente, foi selecionada uma poliuretana de origem natural do óleo de rícino, hidrofóbica, neutra e com características aparentemente adequadas ao cateter intravenoso periférico (CIVP) para servir como matriz das nanopartículas de prata. As propriedades desses filmes impregnados com Ag-NPs foram descritas por meio da caracterização de FTIR-ATR, TGA, MEV e ensaios de citotoxicidade e microbiológicos (adesão e antibiofilme). A TGA foi útil para investigar se poderiam ocorrer alterações de massa dos filmes em cateteres quando revestidos, considerando que, em uso o mesmo seria exposto a variação de temperatura corporal ($\cong 36,5^{\circ}\text{C}$, se afebril, e febril, podendo alcançar 40°C).

A TGA mostrou que não houve alteração de massa dos filmes de WBPU puros ou impregnados com nanopartículas até aproximadamente 200°C . Ou seja, quanto à temperatura corporal não haveria alteração de massa.

O resultado microbiológico do teste de adesão mostrou redução bacteriana à medida que as concentrações de Ag-NPs aumentavam. E, quanto ao teste antibiofilme, ocorreu uma diminuição do crescimento bacteriano, especialmente na amostra de maior concentração de NPs (0,4%).

Foram realizados três ensaios de citotoxicidade (MTT) das amostras contendo Ag-NPs. O primeiro ensaio foi inconclusivo, o segundo abordou somente a poliuretana

pura e o terceiro ensaio mostrou citotoxicidade para a PU pura. O resultado inconclusivo sugeriu que resíduos de glutaraldeído poderiam estar causando a toxicidade. No entanto, o teste piloto da PU pura (segundo ensaio) mostrou resultados atóxicos no limiar, e os resultados do terceiro ensaio de citotoxicidade para a PU pura e contendo Ag-NPs - sem exposição ao glutaraldeído – apresentaram citotoxicidade. Assim, foi inferido que a toxicidade poderia ser causada pela própria poliuretana devido à resíduos de solventes. Portanto, foi proposto como continuidade desta pesquisa sintetizar outra poliuretana que utiliza outros solventes orgânicos na sua composição e que são mais facilmente eliminados durante a secagem da PU.

Em suma, foi definido sintetizar outra poliuretana, fazer novos filmes, aumentar a concentração de nanopartículas, concomitante aumento do número de amostras e de intervalos das concentrações de Ag-NPs para gerar uma avaliação mais consistente do ponto de vista estatístico.

A contribuição científica desta pesquisa até a parte I se refere aos filmes que foram desenvolvidos, os quais não apresentaram interação química da WBPU com as Ag-NPs, conforme o FTIR, considerado adequado ao propósito destes filmes. Os filmes produzidos nas concentrações preliminares apresentaram resultados relevantes sobre a diminuição de adesão de *S. aureus* e aumento da capacidade antibiofilme.

Sabe-se que ainda são muitos os desafios, uma vez que as bactérias encontram formas de se adaptarem a novos microambientes. Porém, acredita-se que esta pesquisa poderá gerar um novo produto antimicrobiano com potencial a ser desenvolvido em escala industrial. Além do mais, representa uma promessa de estratégia de enfrentamento e combate às infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS).

A revisão da literatura sobre a resposta do fenômeno antimicrobiano induzido por nanomateriais mostrou evidência clara do grau de sua complexidade, sendo necessária uma abordagem interdisciplinar, considerando que envolve interações químicas, biológicas e físicas, essencialmente. Além disso, destaca-se a contribuição dos profissionais de saúde que monitoram a ocorrência de infecção relacionada aos dispositivos médicos.

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES (PARTE II)

A primeira fase desta pesquisa foi descrita em porcentagem porque muitos artigos acadêmicos trazem este estilo de descrição para exibir as concentrações.

Logo, a segunda fase desta pesquisa, destaca-se por ser testada uma outra poliuretana de origem natural, que foi sintetizada no laboratório de Química Medicinal da UNIARA, e as concentrações dos filmes obtidos foram descritos em ppm porque está se tornando a forma de comunicação mais usual no mercado empresarial.

6.1 Síntese de Novas Poliuretanas

Assim como na parte I, as novas formulações das poliuretanas sintetizadas são provenientes de uma parceria Empresa-Academia. A estrutura química da cadeia polimérica é a mesma da WBPU-1 mostrada no item 5.1. No entanto, detalhes de condições de reação e o solvente orgânicos utilizado durante a reação se mantém como segredo industrial. Lembramos que este solvente orgânico é utilizado em pequena proporção e que a dispersão polimérica é preparada em meio aquoso, tornando a síntese muito mais ecologicamente correta. Além disso, as poliuretanas, quando preparadas corretamente, possuem a característica de serem atóxicas e não inflamáveis. Todavia, esta parceria foi concretizada por meio do Programa Fapesp de Pesquisa Inovativa em Pequenas Empresas – PIPE.

A nova dispersão de poliuretana a base de água e partir de óleo de mamona foi nomeada WBPU-2. Porém, foi feita um processo de retirada do solvente orgânico em rotaevaporador e essa dispersão foi nomeada WBPU-2S. Ademais, também foi feita a dispersão diluída dessa PU nomeada WBPU2D.

A partir da dispersão da poliuretana WBPU2, foram preparados filmes pelo método de *casting* e encaminhados aos ensaios de citotoxicidade, microbiológicos e difração de raios-x (XRD) e realizado o teste para detecção de Ag-NPs.

6.2 Nanopartículas de Prata

As nanopartículas de prata utilizadas nestes novos filmes foram as mesmas utilizadas na parte I. Elas possuem dimensão de 20 nm e foram fornecidas pela empresa NanoBoost Ciência, Tecnologia e Comércio LTDA, cujo um dos sócios é o Prof. Dr. Eduardo José Nassar, da Universidade de Franca.

6.3 Ensaio de Citotoxicidade da WBP-2

Este ensaio foi realizado no Laboratório de Ensaio Celulares e Engenharia Regenerativa (LECER) da UNIARA, dirigido pela Profa. Dra. Mônica Rosas da Costa lemma na Universidade de Araraquara – UNIARA, e manipulado pelo pesquisador Domingos Neto (doutorando do PPG da UNIARA). O protocolo deste experimento está descrito no Apêndice D.

Baseado na ISO 10993-12 Biological evaluation of medical devices — Part 12: Sample preparation and reference materials (versão atualizada 2008), as amostras dos filmes de PU foram cortadas na dimensão de 1 cm².

Antes do ensaio de citotoxicidade, foi procedida a desinfecção de alto nível das amostras com glutaraldeído ativado à 2%, conforme protocolo descrito no Apêndice B.

As amostras dos filmes de WBP-2 sintetizada foram preparadas em triplicatas. Observa-se que essas amostras correspondem à mesma WBP-2, identificadas como WBP-2, WBP-2S e WBP-2D, respectivamente, conforme as formulações.

A figura 24 exibe o gráfico das amostras da WBP-2 sintetizada e analisada quanto à citotoxicidade.

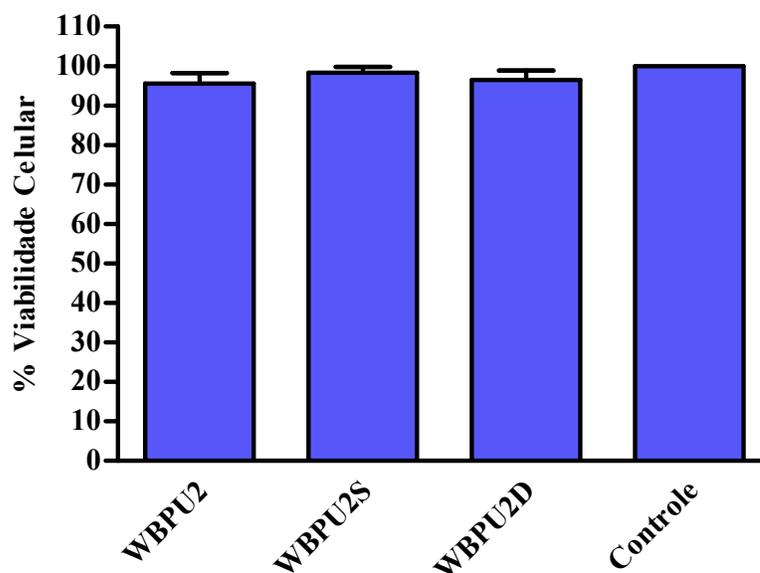


Figura 24- Porcentagem de viabilidade celular de Fibroblastos Humanos Dérmicos (HDF-Ad) na presença de amostras de poliuretano.

Fonte: Laboratório de Ensaio Celulares e Engenharia Regenerativa (LECER) da UNIARA.

Neste ensaio de citotoxicidade utilizou-se Fibroblasto Humano Dérmico adulto (HDF-Ad) para testar os filmes de WBPU2. De acordo com a ISO 10993-5, os materiais/substâncias testadas são considerados atóxicas quando a viabilidade celular se mantém $\geq 70\%$.

Discussão parcial

No gráfico é observado a viabilidade celular entre 90 e 100% em todas as amostras de PU, portanto, as amostras de WBPU-2 foram consideradas atóxicas. Além disso, o t-test não apresentou nenhuma diferença estatística significativa ($p < 0,05$) das amostras testadas em relação ao controle.

Uma vez que essa WBPU2 foi considerada atóxica, realizou-se o preparo dos filmes impregnados com Ag-NPs.

6.4 Preparação dos Filmes de PU (WBPU-2) Impregnados com Nanopartículas de Prata

Os filmes de WBPU-2 (sintetizada) com nanopartículas de prata foram preparados com as 5 concentrações, conforme pode ser visto no quadro 3. Essas amostras foram nomeadas WBPU-2-Ag0.1, WBPU-2-Ag0.4, WBPU-2-Ag0.8, WBPU-2-Ag1.6 e WBPU-2-Ag3.2. Para uma comparação com os resultados obtidos na Parte I desta tese, foram preparados novos filmes com a WBPU-1 contendo 3200 ppm de Ag-NPs (nomeada WBPU-Ag1.6, acrescentada na Parte 2 da tese).

Quadro 3- Nomes dos filmes de WBPU-2 com as respectivas concentrações

WBPU-2	Pura
WBPU-2-Ag0.1	200 ppm
WBPU-2-Ag0.4	800 ppm
WBPU-2-Ag0.8	1600 ppm
WBPU-2-Ag1.6	3200 ppm
WBPU-2-Ag3.2	6400 ppm
WBPU-1-Ag1.6	3200 ppm

A figura 25 mostra as resinas WBPU-2 (sintetizadas) contendo Ag-NPs, conforme concentrações supracitadas, espalhadas em placas de Petri.

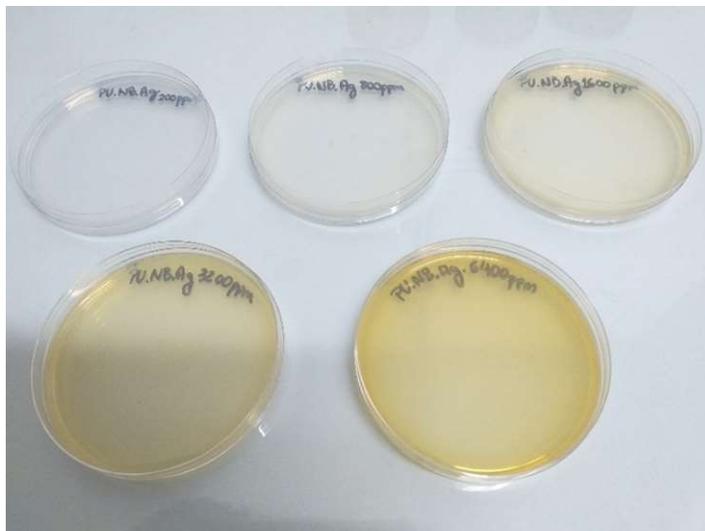


Figura 25- Placas de Petri com filmes de WBPU-2 impregnadas com Ag-NPs (secagem no primeiro dia).

Fonte: Laboratório de Química Medicinal e Biomateriais (LQMBio), própria autoria, 2024.

6.5 Ensaio de FTIR-ATR da WBPU2

O ensaio de espectroscopia foi realizado na UNESP, nas mesmas condições da WBPU-1. A figura 26 mostra a imagem do espectrofotômetro utilizado para análise de FTIR e, a figura 27 mostra o espectro obtido dos filmes da WBPU-2.

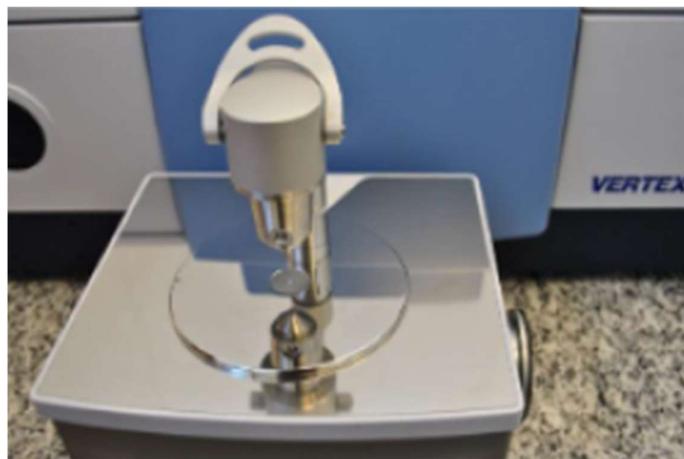


Figura 26- Espectrofotômetro Bruker Vertex 70

Fonte: Laboratório Multiusuário I de Análises Químicas da UNESP de Araraquara.

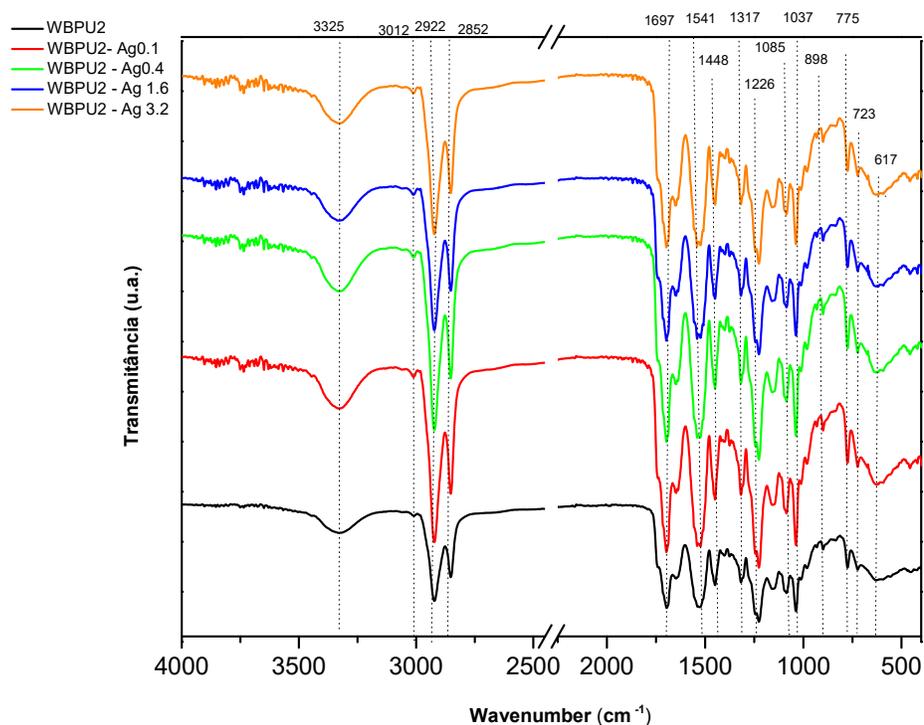


Figura 27-Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier da WBPU2 exibindo as bandas dos filmes com as concentrações WBPU2-Ag3.2 (6400 ppm), WBPU2-1.6 (3200 ppm), WBPU2-Ag0.4 (800 ppm) e a PU pura (WBPU2).

Discussão parcial

No espectro da WBPU2 pura e WBPU2 contendo Ag-NPs, as principais bandas destacadas pelas linhas pontilhadas correspondem aos grupos funcionais da poliuretana, semelhantes ao ensaio de FTIR da WBPU1. Além disso, também não foi observado banda na região $2000\text{-}2300\text{ cm}^{-1}$, que é atribuída ao grupo $\text{N}=\text{C}=\text{O}$, isocianato (De almeida; Soares Goulart; Claro Neto, 2016), indicando que não houve resíduo deste reagente e que ocorreu a polimerização.

6.6 Análise termogravimétrica (TGA) da WBPU-2 (sintetizada) pura e contendo Ag-NPs

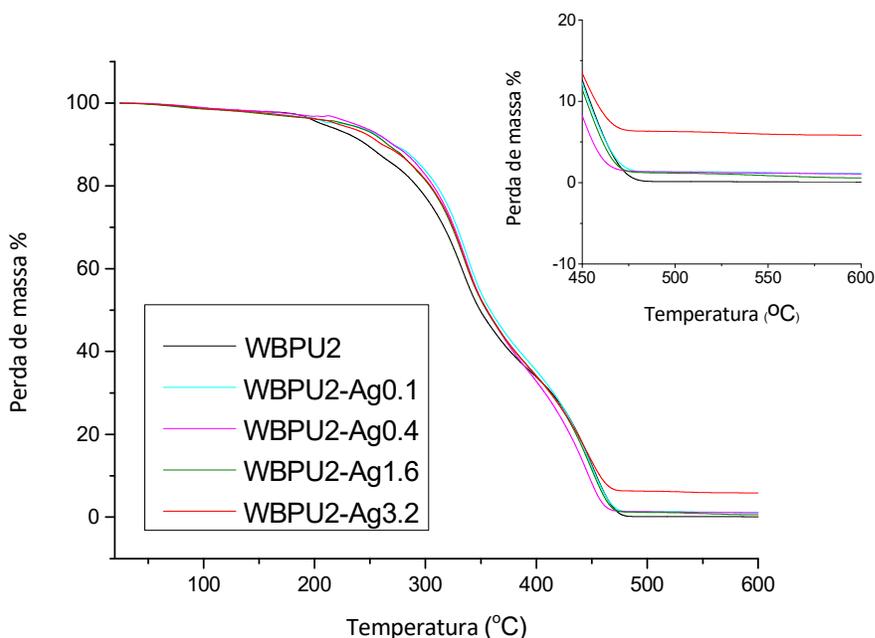


Figura 28- Espectro de termogrametria da WBPU-2 pura e impregnada com Ag-NPs nas concentrações de WBPU2-Ag0.1 (200 ppm), WBPU2-Ag0.4 (800 ppm), WBPU2-Ag1.6 (3200 ppm) e WBPU2-Ag3.2 (6400 ppm). Inseto: Visão ampliada da curva de tg entre 450 e 600 °C.

Fonte: Própria autoria.

Discussão parcial

A análise termogravimétrica da WBPU2 mostrou-se semelhante à amostra WBPU-1. Até aproximadamente 200° C, ocorre a evaporação de solventes, a partir desta temperatura observa-se o início da decomposição térmica da WBPU-2, e entre 470 e 600° C, é possível identificar que não ocorreu resíduos da WBPU2 (pura), em contrapartida, ocorreu a presença de resíduos nas amostras de PU impregnadas com Ag-NPs. Destaca-se que a WBPU-2-Ag3.2 mais concentrada (6400 ppm) apresentou maior percentual de resíduos.

6.7 Difractometria de Raio X

As amostras de poliuretana pura e impregnadas com nanopartículas foram enviadas à Embrapa (São Carlos) aos cuidados do Prof. Ricardo Bortolletto-Santos, para a realização de Difractometria de raio X, com o objetivo de identificarmos cristalinidade e a presença de nanopartículas de prata. Este experimento realizou-se com amostras retangulares de aproximadamente 2cm (lado) de cada PU.

A figura 29 (representativa) mostra dois dos filmes de WBPU-1-Ag-NPs com os cortes das amostras enviadas ao DRX.



Figura 29- Imagens representativas de amostras dos filmes da PU sintetizada impregnados com Ag-NPs nas concentrações de 800 ppm (mais amarelada) e 200 ppm (mais clara) cortados para ensaios microbiológicos e físico-químico (DRX).

Fonte: Laboratório de Química Medicinal e Biomateriais (LQMBio), próprio autor, 2024.

A seguir, as figuras 30 e 31 exibem os gráficos de DRX das amostras de WBPU(1) e WBPU2 puras e com Ag-NPs.

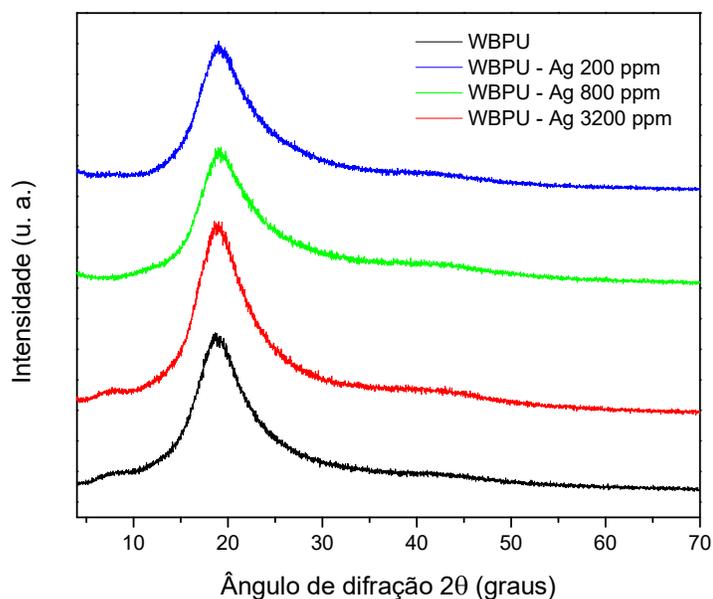


Figura 30- Espectro de DRX das amostras de WBPU pura e impregnada com Ag-NPs com as concentrações de 200 ppm, 800 ppm e 3200 ppm de Ag-NPs (correspondentes as WBPU pura e impregnadas, WBPU-Ag0.1, WBPU-Ag0.4 e WBPU-Ag1.6, respectivamente).

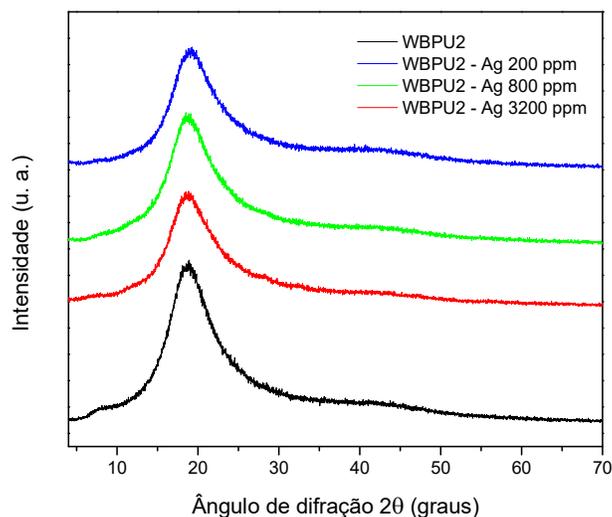


Figura 31- Espectro de DRX das amostras de WBP2 pura e impregnada com Ag-NPs com as concentrações de 200 ppm, 800 ppm e 3200 ppm de Ag-NPs (correspondentes as a WBP2-2 pura e impregnadas, WBP2-Ag0.1, WBP2-Ag0.4 e WBP2-Ag1.6, respectivamente).

As nanopartículas de prata foram impregnadas em diferentes concentrações na matriz de poliuretano. No entanto, não foi identificado o pico principal da prata ($\theta=38,12^\circ$) em nenhuma das amostras. Isto pode ser justificado pela pequena quantidade de prata na matriz polimérica e explicado pela sobreposição do pico da poliuretano sobre o pico das Ag-NPs.

6.8 Ensaios de Citotoxicidade da WBP2 (Sintetizada) e da WBP1, Puras e Impregnadas com Ag-NPs

As amostras de poliuretano contendo Ag-NPs foram cortadas em triplicatas na dimensão de 1 cm^2 cada uma delas, conforme preconizado pela ISO-10993-12 e encaminhadas ao LECER (UNIARA).

Logo, as figuras 32 e 33 mostram os gráficos obtidos dos ensaios de citotoxicidade. Essas amostras foram avaliadas em duas ocasiões distintas, uma exposição ao meio de cultura durante 24 horas e outra, com exposição das amostras pelo período de 30 dias em Meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM). Observa-se que, não foi analisado as amostras de WBP2 no ponto 0.8 e para comparação das PUs, foi repetido o ensaio de citotoxicidade da WBP2-Ag1.6 (primeiro lote).

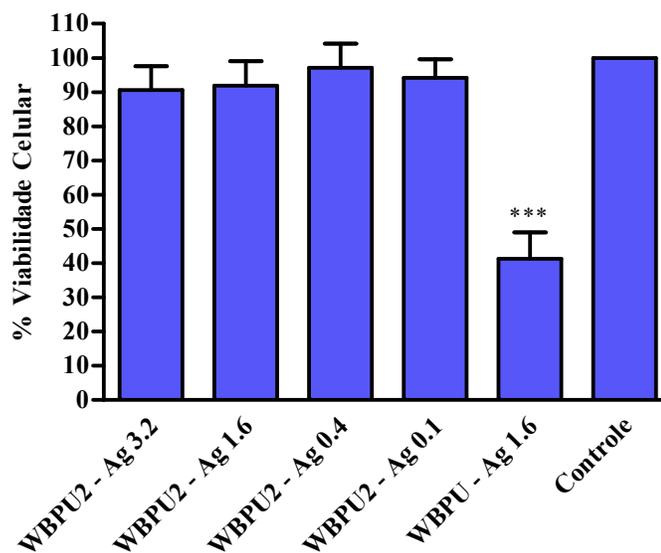


Figura 32- Percentual de viabilidade celular em relação aos filmes de PU com diferentes concentrações de Ag-NPs, expostos ao meio de cultura em 24 horas.
 Fonte: Laboratório de Ensaio Celulares e Engenharia Regenerativa (LECER) da UNIARA.

A figura 33 exibe o gráfico obtido do ensaio de citotoxicidade das amostras de WBPu2 contendo Ag-NPs após o período de 30 dias.

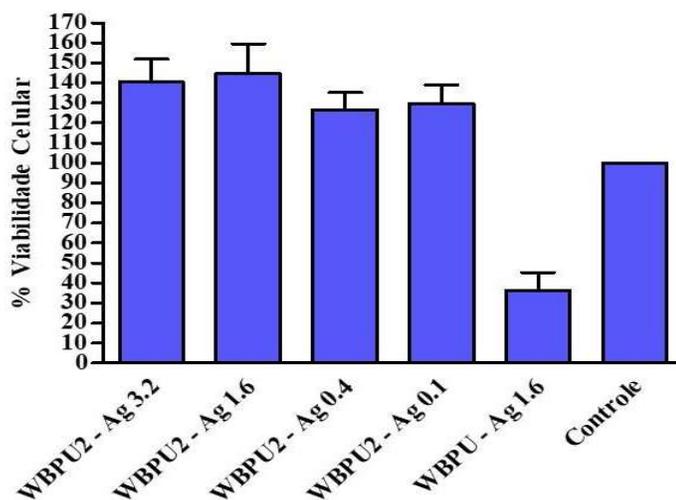


Figura 33- Amostras de WBPu-2 em quatro concentrações com viabilidade acima de 70%, e, amostra de WBPu-1 com viabilidade abaixo de 70%.
 Fonte: Laboratório de Ensaio Celulares e Engenharia Regenerativa (LECER) da UNIARA.

Discussão parcial

A análise estatística t-test não demonstrou diferença significativa ($p < 0,05$) entre o grupo controle e o grupo das amostras de WBPU-2-Ag, no ensaio de 24 horas. Em contrapartida, foi observado diferença estatística significativa (***) entre o grupo controle e o grupo da amostra WBPU-Ag1.6, no mesmo ensaio.

O gráfico da figura 33 mostra nas colunas das amostras uma viabilidade celular acima de 100% em relação ao controle, após o período de um mês, com o “meio condicionado” mantido em estufa a 37° C. Este resultado, repetido após 30 dias, confirma que não houve citotoxicidade. Porém, para investigar o aumento da proliferação celular, seria necessário outro ensaio suplementar, não previsto no cronograma desta pesquisa.

Apesar disto, todas as amostras testadas de WBPU-2-Ag confirmaram não citotoxicidade tanto no ensaio de 24 horas quanto no ensaio de 30 dias. Diante destes resultados, podemos inferir que a WBPU (primeiro lote) tem citotoxicidade repetida e confirmada pelo ensaio de 30 dias.

O protocolo deste experimento de 30 dias é semelhante ao de 24 horas e está descrito no Apêndice D.

Ademais, o objeto desta pesquisa, CVP flexível, tem recomendação de uso sem troca até 96 horas, ou seja, para este formato de dispositivo o período de exposição ao acesso venoso de 30 dias não estaria em conformidade com as boas práticas de manuseio.

6.9 Ensaios de Adesão e Antibiofilme

As amostras de WBPU-2 contendo nanopartículas de prata (concentrações descritas no item 1.3) foram preparadas e cortadas em formato esférico no laboratório de Química Medicinal da UNIARA.

Os discos de WBPU-2 (área de 2 cm²) foram enviadas ao laboratório de microbiologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista (UNESP), dirigido pela Prof^a. Dr^a. Fernanda Brighenti e manipuladas pela Dr^a. Analú Barros de Oliveira. O ensaio foi realizado com a mesma metodologia para ambas as PUs (WBPU-1 e WBPU-2).

As figuras 38 e 39 correspondem aos gráficos obtidos pelos testes de adesão e antibiofilme em relação a amostras de WBPU-2 e WBPU-3 (equivalente a WBPU-1, lote 3) na presença de *S. aureus*.

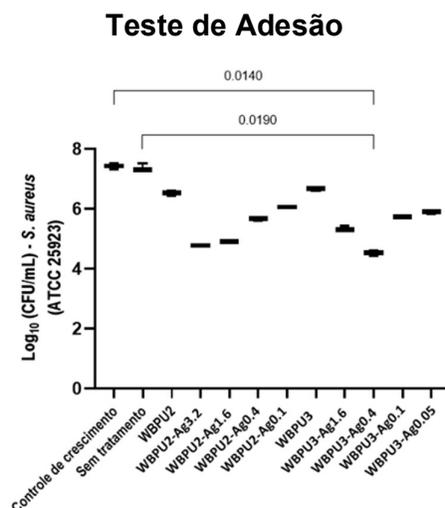


Figura 34- Gráfico de mediana do ensaio de adesão com valores mínimo e máximo em forma de box-plot ilustrando os resultados significativos identificados pelo teste múltiplas comparações de Dunn.
Fonte: Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia da UNESP (Araraquara).

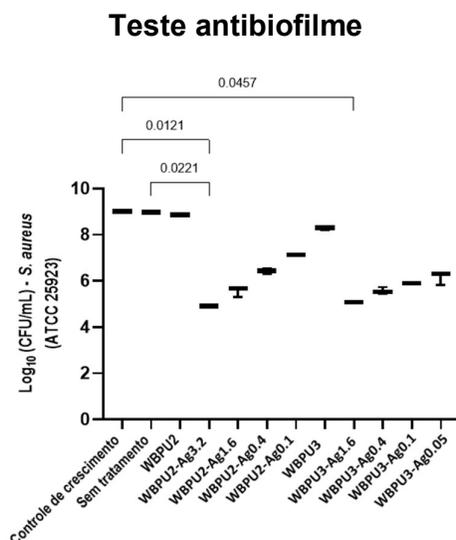


Figura 35- Gráfico de mediana do ensaio de biofilme com valores mínimo e máximo em forma de box-plot ilustrando os resultados significativos identificados pelo teste múltipla comparações de Dunn.
Fonte: Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia da UNESP (Araraquara).

Os grupos investigados foram: WBPU2, WBPU2-Ag3.2, WBPU2-Ag1.6, WBPU2-Ag0.4, WBPU2-Ag0.1 e, WBPU3-Ag1.6, WBPU3-Ag0.4, WBPU3-Ag0.1 e WBPU3-Ag0.05. O ensaio foi repetido para a WBPU-3 (WBPU-1, lote 3).

Para comparar os valores obtidos de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) com o grupo controle, sem tratamento e filmes de PU foi utilizado o teste Kruskal-Wallis considerando as amostras independentes.

Os resultados são apresentados em mediana, desvio padrão, mínimo e máximo, no gráfico Box-plot.

Posteriormente, os dados obtidos nos testes de adesão e antibiofilme são apresentados em escala de \log_{10} e o nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$. O programa prisma foi utilizado para essas análises. Com base nos resultados apresentados no gráfico 34 e 35, a seguinte discussão parcial pode ser apresentada.

Discussão parcial

Os grupos amostrais (WBPU-1) do primeiro experimento microbiológico (Parte I) foram considerados pequenos e, por este motivo, foi feita uma análise percentual e decidido plotar os dados obtidos em gráficos de coluna de barras. Enquanto neste segundo experimento microbiológico, que incluiu a WBPU-3 (WBPU-1, lote 3) e a WBPU-2, obteve-se grupo amostral para se fazer uma análise estatística e foi decidido apresentar em gráfico Box-plot.

Trazendo uma análise em relação as amostras de WBPU-2 contendo Ag-NPs, observa-se na figura 34 uma diminuição de adesão bacteriana conforme aumenta as concentrações de NPs. Analisando o mesmo gráfico para as amostras de WBPU3 (WBPU-1, lote 3) com Ag-NPs, verificamos que aumentando-se a concentração de NPs ocorre uma diminuição de adesão das bactérias. Além disso, no ensaio de adesão, conforme o teste Kruskal-Wallis, a WBPU3-Ag0.4 foi identificada como significativa visto que apresentou o valor $p < 0,05$.

Sobre o teste antibiofilme, observa-se no gráfico 35 que ocorreu um aumento do \log_{10} de UFC de *S.aureus* à medida que diminuiu a concentração de Ag-NPs nas amostras de WBPU-2, assim como nas amostras de WBPU-3 (WBPU-1, lote 3). Este gráfico mostra resultado significativo para as amostras WBPU2-Ag3.2 (em relação ao controle e ao tratamento) e WBPU-3- Ag1.6 (WBPU-1,lote 3) em relação ao controle.

Por fim, as demais amostras em relação aos parâmetros utilizados pelo teste Kruskal-Wallis não foram consideradas significativas, conforme análise estatística, podendo serem percebidas pelos APÊNDICES E e F.

7 CONCLUSÃO FINAL

Por meio desta pesquisa foi possível produzir um filme (WBPU2) à base de óleo de mamona antimicrobiano na presença de meio de cultura contendo *S.aureus* e atóxico para Fibroblasto Dérmico Humano – Ad.

A amostra WBPU2-Ag3.2 foi considerada a mais relevante por apresentar resultado estatístico significativo pelo teste Kruskal-Wallis para o teste antibiofilme e atoxidade *in vitro* dentro de 24 horas, visto que esse material ainda pode ser investigado quanto à adequação das propriedades mecânicas em conformidade à aplicação em dispositivos médicos, por exemplo, cateter venoso.

Ademais, a contribuição científica desta pesquisa encontra-se na obtenção de um filme de origem natural com demonstrada propriedade antimicrobiana relevante, que poderá ser direcionado à aplicação futura em produtos na área da saúde.

Considerando o enfretamento global da RAM atual, um revestimento antimicrobiano, sem fazer uso de antibiótico, para a prevenção de infecção relacionada a dispositivo médico, representa uma alternativa de inovação tecnológica que poderá acarretar benefícios a longo prazo.

Perspectivas futuras

As perspectivas esperadas para continuidade do estudo consistem em certificar a ocorrência da adesão dos revestimentos (filmes finos) em poliuretanas semelhantes à do cateter e verificar a menor espessura que o filme poderá ter sem perder suas propriedades antimicrobianas - já que os cateteres venosos são dispositivos que, em geral, apresentam diâmetro pequeno, não sendo adequado a aplicação de filme muito espesso para não comprometer a vazão de fluidos através da luz do dispositivo.

Por conseguinte, poderão ser desenvolvidos revestimentos a partir de filmes antimicrobianos que possam ser aplicados em cateter venoso e/ou superfícies inertes, como em áreas de maior risco de contaminação, por exemplo, ambientes hospitalares.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR. 15487. Membrana de poliuretano para impermeabilização.** 2007.

ANVISA. Agência nacional de vigilância sanitária. **Série 2. Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde. Critérios Diagnósticos de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde.** 2013.

ANVISA. Agência nacional de vigilância sanitária. **PROGRAMA NACIONAL DE PREVENÇÃO E CONTROLE DE INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE (PNPCIRAS).** 2021.

ANVISA. Agência nacional de vigilância sanitária. **NOTA TÉCNICA GVIMS/GGTES Nº 03/2023 Critérios diagnósticos das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS): notificação nacional obrigatória para o ano de 2023.**

ANVISA. Agência nacional de vigilância sanitária. **NOTA TÉCNICA GVIMS/GGTES/ANVISA Nº 04 /2022 Práticas seguras para a prevenção de incidentes envolvendo cateter intravenoso periférico em serviços de saúde – 2022.**

ARAÚJO, S. Acessos Venosos Centrais e Arteriais Periféricos – Aspectos Técnicos e Práticos. **Revista Brasileira Terapia Intensiva.** 2003.

AZEREDO, J; HENRIQUES, M; NOVELLO, J. Adesão microbiana a superfícies bióticas e abióticas. In: CERCA, NUNO., AZEVEDO, NUNO F. **BIOFILMES. NA SAÚDE, NO AMBIENTE, NA INDÚSTRIA.** 1ª Ed., 2012.

BANHA, F.; VIVAS, P.; PIRES, R. Heparinização de cateter. **Dossier Técnico.** 2009. Disponível em: www.forumenfermagem.org/dossiertechnico/revistas/nursing/item/3512-heparinizacao-de-cateteres#.YGJEyZ3Yrrc. Acesso em: 29 de março de 2021.

BASTÚS, N. G.; MERKOCI, F.; PIELLA, J.; PUNTES, V. Synthesis of Highly Monodisperse Citrate-Stabilized Silver Nanoparticles of up to 200 nm: Kinetic Control and Catalytic Properties. **Chemistry of Materials.** 2014.

BLACKMAN, L. D.; Qu, Y.; CASS, P.; Locock, K. E. S. "Approaches for the inhibition and elimination of microbial biofilms using macromolecular agents." **Chemical Society Reviews.** (2021).

BRAGA, L.M.; PARREIRA, P.M.S.D.; ARREGUY-SENA, C.; CARLOS, D.M.; MÓNICO, L.S.M.; HENRIQUES, M.A.P. TAXA DE INCIDÊNCIA E O USO DO FLUSHING NA PREVENÇÃO DAS OBSTRUÇÕES DE CATETER VENOSO PERIFÉRICO. **Texto & Contexto – Enfermagem,** v. 27, n.4. 2018.

BRANDÃO NETO, R. A. Medicinanet. **Cateteres venosos centrais.** 2015. Disponível

em:https://www.medicinanet.com.br/conteudos/revisoes/6474/cateteres_venosos_centrais.htm. Acesso em: 29 de março de 2021.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Medidas de Prevenção de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Brasília: Anvisa, 2017.

BRUNETTI, F. Mecânica dos fluidos. 2ª ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2008.
CANGEMI, J.M.; Dos SANTOS, A.M.; CLARO NETO, S. A Revolução Verde da Mamona. **QUÍMICA NOVA NA ESCOLA**. Vol. 32, N° 1, 2010.

CASIMERO, C.; RUDDOCK, T.; HEGARTY, C.; BARBER, R.; DEVINE, A.; DAVIS J. Minimizing Blood Stream Infection: Developing New Materials for Intravascular Catheters. **Medicines**, v. 7, n. 9, 2020.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. **Descrição das Categorias de recomendações. BSI Guideline**. (2011). Available at: <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/bsi/> Accessed on March 26, 2021.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. **Guidelines for the Prevention of Intravascular Catheter-Related Infections**. (2011). Available at: <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/pdf/guidelines/bsi-guidelines-H.pdf>. Accessed on: March 18, 2021.

CHEN, JEM-KUN; CHANG, CHI-JUNG. Fabrications and Applications of Stimulus-Responsive Polymer Films and Patterns on Surfaces: A Review. **Materials**, v. 7, 2014. p. 805-875; doi:10.3390/ma7020805.

CHEN, Y.; CHEN, Y.-L. *Journal of Applied Polymer Science* **1992**, 46 (3), 435.

CLAYTON, J.M.; ENTWISTLE, B.; PICKERING, S.; TUNE. Collecting the evidence: the nursing management of intravenous therapy. **Clinical Effectiveness in Nursing**, v. 3, n. 1, p.25-33, 1999.

CONSELHO REGIONAL DE ENFERMAGEM (Alagoas). Parecer técnico N° 007/2020. Disponível em: <http://al.corens.portalcofen.gov.br/parecer-tecnico-no-007-2020-coren-al/>. Acesso em: 29 de março de 2021.

CONSELHO REGIONAL DE ENFERMAGEM (São Paulo). PARECER COREN-SP N° 006/2022. SP: COREN, 2022.

CHARACKLIS, W.G. **Microbial Adhesion und Aggregation**, ed. I.C. Marshall, pp. 137-157. 1984. Dahlem Konferenzen. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo: Springer-Verlag.

DAT, N. M.; MANHA, L.D.; HAMANAKA, D.; HUNG, D. V; TANAKA, F.; UCHINO, T. Surface conditioning of stainless-steel coupons with skim milk, buttermilk, and butter serum solutions and its effect on bacterial adherence. **Food Control**, v. 42, p. 94-100, 2014.

DE ALMEIDA, E.L.; SOARES GOULART, G.A.; CLARO NETO, S.; et al. Preparação e caracterização de poliuretanos contendo diferentes quantidades de óleo de baru. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, 2016.

DI SANTO, M. K.; TAKEMOTO, D.; NASCIMENTO R. G.; NASCIMENTO, A. M.; SIQUEIRA, E.; DUARTE, C. T.; JOVINO, M. A. C.; KALIL, J. A. Cateteres venosos centrais de inserção periférica: alternativa ou primeira escolha em acesso vascular?. **Jornal Vascular Brasileiro**. 2017.

Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares (EBSERH) – Ministério da Educação. **PROTOCOLO: – RECOMENDAÇÕES DE PREVENÇÃO DAS INFECÇÕES RELACIONADAS À CONSTRUÇÃO CIVIL**. Hospital Universitario Professor Alberto Antunes – Maceió, 2019.

FICHA TÉCNICA CATETER INTRAVENOSO. Disponível em: <https://www.smerp.com.br/anvisa/?ac=prodDetail&anvisald=80273450027>. Acesso em: 08 de outubro de 2024. REGISTRO ANVISA: 80273450027.

FILIPOVIĆ, N.; UŠJAK, D.; MILENKOVIĆ, M. T.; ZHENG, K.; LIVERANI, L.; BOCCACCINI, A. R.; STEVANOVIĆ, M. M. "Comparative Study of the Antimicrobial Activity of Selenium Nanoparticles With Different Surface Chemistry and Structure". **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, 2021.

GERTZ, S. ENGELMANN, S.; SCHMID, R.; OHLSEN, K.; HACKER, J.; HACKER, M. Regulation of sigmaB-dependent transcription of sigB and asp23 in two different Staphylococcus aureus strains. **Molecular and General Genetics**, v. 261, p. 558-566, 1999.

GONZAGA, HELOISA FARIAS; FONTGALLAND, ISABEL LAUSANNE. DOENÇAS NEUROLÓGICAS CAUSADAS PELA CONTAMINAÇÃO DE METAIS NAS ÁGUAS DO BRASIL. **ARCHIVES OF HEALTH**, CURITIBA, V.4, N.3, P.909-928, 2023.

GUGGENBICHLER, J.-P.; BOSWALD, M.; LUGAUER, S.; KRALL, T. A New Technology of Microdispersed Silver in Polyurethane Induces Antimicrobial Activity in Central Venous Catheters. **Infection** (27), Germany, 1999.

HACHEM, R. Y.; WRIGHT, K. C.; ZERMENO, A.; BODEY, G. P. ; RAAD, I.I. Evaluation of the silver iontophoretic catheter in an animal model. **Biomaterials**. 2003.

HEIMAN, SONIA. **Efeito da radiação ionizante nos revestimentos de cateteres de poliuretano com nanopartículas de prata**. 2015. Tese (doutorado) - Curso de Ciências na área de Tecnologia Nuclear - Aplicações. Autarquia associada à Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

HOSNY, A. E. M. S.; FARRAG, H. A.; HELMY, O. M.; HAGRAS, S. A. A.; ALI, A. E. In-vitro evaluation of antibacterial and antibiofilm efficiency of radiation-modified polyurethane–ZnO nanocomposite to be used as a self-disinfecting catheter. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 13, n. 1, 2020. p. 215-225. DOI: 10.1080/16878507.2020.1719328

HØIBY, NIELS. A personal history of research on microbial biofilms and biofilm infections. **Pathogens and Disease**. Federation of European Microbiological Societies. N.70, p. 205–21, 2014.

HUANG, Z.; CHASEMI, H. Hydrophilic polymer-based anti-biofouling coatings: Preparation, mechanism, and durability. **Advances in Colloid and Interface Science**. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102264>

Infravermelho. Disponível em:

file:///C:/Users/Biotecnologia/Downloads/Espectroscopia%20no%20infravermelho.pdf
.Acesso em: 01 de abril de 2024.

JENKINS, J.; I. ISHAK, EALES, MARCUS.; GHOLINIA, ALI.; KULKARNI, SATISHKUMAR.; KELLER, THOMAS F.; MAY, PAUL W.; NOBBS, ANGELA H.; SU, BO. Resolving physical interactions between bacteria and nanotopographies with focused ion beam scanning electron microscopy. **iScience** 24, 2021.

KASNOWSKI, M.A.; MANTILLA, S.P.S.O.; OLIVEIRA, L.A.T.; FRANCO, R.M. FORMAÇÃO DE BIOFILME NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS E MÉTODOS DE VALIDAÇÃO DE SUPERFÍCIES. **REVISTA CIENTÍFICA ELETRÔNICA DE MEDICINA VETERINÁRIA**, n.15, 2010.

KEOGH, S; FLYNN, J; MARSH, N; HIGGINS, N; DAVIES, K; RICKARD, CM. Nursing and midwifery practice for maintenance of vascular access device patency. A cross-sectional survey. **International Journal of Nursing Studies**. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijnurstu.2015.07.001>. Acesso em: 17 de julho de 2020.

KNETSCH, M.L.W; KOOLE, L.H. New Strategies in the Development of Antimicrobial Coatings: The Example of Increasing Usage of Silver and Silver Nanoparticles. **Polymers**, v.3, 2011.

LEE, H. C.; Jeong, J.; JO, S.; CHOI, D.Y.; KIM, G. M.; KIM, W. Development of a Subpath Extrusion Tip and Die for Peripheral Inserted Central Catheter Shaft with Multi Lumen. **Polymers**, 2021.

IIDA, Y.; HONGO, K.; ONODA, T.; KITA, Y.; ISHIHARA, Y.; TAKABAYASHI, N.; KOBAYASHI, R.; HIRAMATSU, T. Use of catheter with 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymer coating is associated with long-term availability of central venous port. **Scientific Reports**, 2021.

LI, X.; SUN, L.; ZHANG, P.; WANG, Y. Novel Approaches to Combat Medical Device-Associated BioFilms. **Coatings**, 2021. doi.org/10.3390/coatings11030294

LOPES, W.A.; FASCIO, M. ESQUEMA PARA INTERPRETAÇÃO DE ESPECTROS DE SUBSTÂNCIAS ORGÂNICAS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO. **Química Nova**, 2004.

MANDOLFO, S.; ANESI, A.; ROGNONI, V. The epidemiology of central venous catheter-related bloodstream infection in our renal units is changing. **The journal of**

vascular access, v.23, n.2, 2021. p.328-329.

MASSABNI, V.; MAURO, A. E.; SARGENTELLI, A. C. Aspectos do metabolismo do cobre no homem. **Química Nova**, São Paulo, v. 19, n. 3, p. 290-293, mai./jun. 1996.

MARINO, P.L. **Compêndio de UTI**. 4 ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2015.

MARSH, N.; WEBSTER, J.; LARSON, E.; COOKE, M.; MIHALA, G.; RICKARD, C. M. Observational Study of Peripheral Intravenous Catheter Outcomes in Adult Hospitalized Patients: A Multivariable Analysis of Peripheral Intravenous Catheter Failure. **Journal of Hospital Medicine**, 2018. <https://doi.org/10.12788/jhm.2867>.

Metais pesados. Disponível em: <https://www.ufsm.br/laboratorios/laqia/metais-pesados-heavy-metals>. Acesso em: 02 de novembro de 2024.

MILIANI, K.; TARAVELLA, R.; THILLARD, D.; CHAUVIN, V.; MARTIN, E.; EDOUARD, S.; Astagneau, P.; CATHEVAL Study Group. Peripheral Venous Catheter-Related Adverse Events: Evaluation from a Multicentre Epidemiological Study in France (the CATHEVAL Project). **PLoS ONE**, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168637>.

MORTON, R. D. Aerobic plate count. In: DOWNES, F. P.; ITO K (Eds.). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4 ed. Washington: **American Public Health Association**, cap. 7, p. 66 – 67, 2001.

MOSCHEM, JORGE DA CRUZ; GONÇALVES, PAOLA ROCHA. IMPACTO TOXICOLÓGICO DE METAIS PESADOS: UMA ANÁLISE DE EFEITOS BIOQUÍMICOS E CELULARES. **HEALTH AND BIOSCIENCES**, v.1, n.2. Agosto, 2020. Disponível em: <https://periodicos.ufes.br/healthandbiosciences>. Acesso em: 02 de outubro de 2024.

NARAYAN, R.; CHATTOPADHYAY, D. K.; SREEDHAR, B.; RAJU, K. V. S. N.; MALLIKARJUNA, N. N.; Aminabhavi, T. M. *Journal of Applied Polymer Science* **2006**, 99 (1), 368.

OLMOS, DANIA, and JAVIER GONZÁLEZ-BENITO. "Polymeric Materials with Antibacterial Activity: A Review." **Polymers**, 2021.

PARLAK, O.; RICHTER-DAHLFORS, A. Bacterial Sensing and Biofilm Monitoring for Infection Diagnostics. **Journal Macromolecular Bioscience**, 2020.

QUINI, J.C. POLÍMEROS TERMOFIXOS PARA IMPERMEABILIZAÇÃO MOLDADA IN LOCO. **13º Simpósio Brasileiro de Impermeabilização**. 2013.

QIU, H.; SI, Z.; LUO, Y.; FENG, P.; WU, X.; HOU, W.; ZHU, Y.; CHAN-PARK, M. B.; XU, L.; HUANG, D. The Mechanisms and the Applications of Antibacterial Polymers in Surface Modification on Medical Devices. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 2020.

ROHDE DEPNER, RONISE FARIA; ALEXANDRE DEPNER, RÔMULO; LUCCA,

VIVIAN; LOVATO, MARISTELA. O COBRE COMO SUPERFÍCIE DE CONTATO ANTIMICROBIANA E SUA POTENCIAL APLICAÇÃO NA MEDICINA VETERINÁRIA. *Rev. Veterinária e Zootecnia*. 2015 dez.; 22(4): 532-543.

RECOMENDAÇÕES PARA CATETERES PERIFÉRICOS. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2017. Disponível em: <https://biblioteca.cofen.gov.br/cateteres-perifericos-novas-recomendacoes-anvisa-garantem-seguranca-assistencia/>. Acesso em: 01 de outubro de 2024.

ROE, D.; KARANDIKAR, B.; BONN-SAVAGE, N.; GIBBINS, B.; ROULLET, j. B. Antimicrobial surface functionalization of plastic catheters by silver nanoparticles. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2008.

ROSENTHAL, V.D.; BAT-ERDENE, IDER; GUPTA, DEBKISHORE. Six-year study on peripheral venous catheter-associated BSI rates in 262 ICUs in eight countries of South-East Asia: International Nosocomial Consortium findings. The *Journal of Vascular Access*. Buenos Aires, 2020.

SEMEDO, MARIANA FILIPE DE FIGUEIREDO ROCHA. **Importância Médico-Legal dos Metais Essenciais: Cobre e Zinco**. Dissertação de mestrado em Medicina Legal (2014). Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto (2014).

SOARES, F. **Cateteres Periféricos: Novas Recomendações da Anvisa Garantem Segurança na Assistência**, 2019. Disponível em: <https://biblioteca.cofen.gov.br/cateteres-perifericos-novas-recomendacoes-anvisa-garantem-seguranca-assistencia/#>. Acesso em: 21 de outubro de 2024.

SOUZA, MAX JOSÉ BELO. **Toxicidade dos Metais Pesados**. Instituto Federal do Espírito Santo, Aracruz, ES, PDF. [2010?].

TARDIVO, T. B.; FARHAT NETO, J.; FARHAT JUNIOR, J. Infecções Sangüíneas Relacionadas aos Cateteres Venosos. *Revista Brasileira de Clínica Médica*, 2008.

ZERATI, A. E.; WOLOSKER, N.; LUCCIA, N.; PUECH-LEÃO, P. Cateteres venosos totalmente implantáveis: histórico, técnica de implante e complicações. *Jornal Vascular Brasileiro*, 2017 Apr. - Jun.; 16(2):128-139.

World Health Organization. Technical consultation on the WHO Antimicrobial Resistance Diagnostic Initiative: strategic and operational framework for strengthening bacteriology and mycology diagnostic capacity, Geneva, Switzerland, 5-7 July 2023. Geneva. 2024. <https://doi.org/10.2471/B09049>. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

WU, X.H.; LIEW, Y.K.; MAI, C.-W.; THEN, Y.Y. Potential of Superhydrophobic Surface for Blood-Contacting Medical Devices. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22,3341. <https://doi.org/10.3390/ijms22073341>

REFERÊNCIAS DE PATENTES

BERTON, Marcos Antônio Coelho., MARANGONI, Paulo Roberto Dantas., PIMENTEL, Ida Chapaval., DALZOTO, Patrícia do Rocio. SISTEMA EM FLUXO CONTÍNUO PARA MONITORAMENTO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME EM SUBSTRATO SÓLIDO POR TÉCNICAS MICROSCÓPICAS E ELETROQUÍMICAS. PATENTE N. BR 102013026485A2. DATA DA PUBLICAÇÃO: 24/05/2016.

SALOMONI, Roseli., RODRIGUES, Maria Filomena de Andrade., OLIVEIRA, Adriano Marim., REDIGUIERI, Carolina Fracalossi. NANOFIBRAS COM NANOPRATA COM ATIVIDADE ANMICROBIANA PARA APLICAÇÃO EM CATETERES INTRALUMINAIS E PROCESSO. PATENTE N.102018076890-5 A2. DATA DA PUBLICAÇÃO: 07/07/2020

APÊNDICE A: SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA (MÉTODO BOTTOM-UP)

OBSERVAÇÃO IMPORTANTE:

Neste trabalho foram utilizadas nanopartículas de prata (Ag-NPs) comerciais adquiridas da empresa NanoBoost. No entanto, antes da aquisição das nanopartículas, foi feita a síntese de nanopartículas no nosso próprio laboratório. Essas partículas foram obtidas em solução e caracterizadas. Logo em seguida, essa solução foi enviada para análise de suas propriedades antimicrobianas e, na concentração em que foram obtidas, não apresentaram efeito antimicrobiano. Após esses resultados, decidimos pela aquisição das nanopartículas comerciais, ao invés de continuarmos a síntese de novas nanopartículas. Tal decisão foi necessária, em virtude do tempo curto que tínhamos para preparar as novas partículas e depois impregná-las nos revestimentos poliméricos de poliuretanas.

Entretanto, mesmo não tendo sido utilizadas, decidimos adicionar a síntese, caracterização e resultados antimicrobianos destas partículas de prata neste Apêndice.

A.1. Parte Experimental

A.1.1- Síntese das Ag-NPs:

A síntese de nanopartículas de prata (Ag-NPs) com tamanho controlado entre 10 nm e 200 nm baseou-se em procedimentos descritos anteriormente na literatura (BASTÚS; MERKOCI; PIELLA, et al.,2014). Em vista disso, a síntese foi feita via redução do nitrato de Ag pela combinação de dois agentes redutores, sendo eles: o citrato de sódio e o ácido tânico. O ácido tânico atua como redutor auxiliar e estabilizador e o controle cinético é conseguido por meio do ajuste dos parâmetros das reações, incluindo a concentração dos agentes redutores, a temperatura e o tempo.

Inicialmente, todas as vidrarias foram higienizadas, lavadas com acetona e água deionizada. Em seguida, as soluções foram preparadas com água Milli-Q e

adicionadas concentrações distintas de ácido tânico. A síntese química das Ag-NP_s a partir da reação de 10 mL de citrato trissódico (5 mM) com soluções aquosas de ácido tânico (AT) em três concentrações (5 mM em 10 mL, 0,025 mM em 0,05 mL e 0,25 mM em 0,50 mL) da “solução estoque de AT” respectivamente, e acrescido o nitrato de prata (25 mM) em 1 mL. Para cada solução, em balão volumétrico de fundo chato, foi adicionado um volume de 100 mL, e colocado em agitação magnética ajustada a 60 rpm e temperatura de 150 °C. Foi acrescentado 1 mL de nitrato de prata no início do ponto de ebulição e mantido por 15'. Em seguida, as amostras foram resfriadas em banho de água gelada, acondicionadas em tubos recobertos por papel alumínio, protegidos da luz e armazenadas em geladeira. O procedimento baseou-se em rota de reação típica descrita por BASTUS; MERKOCI; PIELLA, et al. (2014).

Para a lavagem e separação das NPs, foi utilizada uma ultracentrífuga Z 36 HK. As suspensões coloidais foram centrifugadas em 3 ciclos nas condições de: 21.000 g, 10°C, 2h, 9Acc e, feitas duas lavagens.

A figura 1 refere-se à montagem do condensador para a síntese das Ag-NPs.



Figura 1: Síntese de Ag-NPs em sistema de agitador magnético utilizando o condensador para evitar evaporação do solvente.

Fonte: próprio autor.

A.1.2 - Caracterização:

Espectroscopia de espalhamento dinâmico de luz (DLS)

Para cubeta de quartzo com caminho óptico de 10 mm em temperatura ambiente. As leituras do tamanho e da distribuição das nanopartículas foram investigadas através de DLS, que avalia o raio hidrodinâmico utilizando um sistema zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, UK). As medidas foram realizadas nas seguintes condições: comprimento de onda do laser (He-Ne) em 633 nm, o ângulo das leituras foi realizado com cubeta de poliestireno (DTS0012) utilizando um volume de 1,5 mL com um fator de diluição de 3x.

Espectrometria de absorção atômica

As determinações quantitativas de prata nas amostras foram realizadas por espectrometria de absorção atômica utilizando-se o espectrômetro *A Analyst 300-Perkin Elmer*, localizado no Laboratório de Química Analítica do Instituto de Química de Araraquara – UNESP.

A.1.3 - Ensaio por difusão em discos (CLSI 2021) para determinação da atividade antibacteriana das Ag-NPs

O ensaio foi realizado aplicando-se as suspensões coloidais de Ag-NPs, em triplicata, em discos de papel de filtro *Whatman* n.3. Os discos foram desidratados por incubação em estufa bacteriológica a 37 ° C. Após secagem, os discos foram depositados na superfície do meio Muller Hinton Agar (MHA), inoculado com as cepas bacterianas da espécie *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas em estufa bacteriológica. Após 24 horas as placas foram avaliadas para verificação da formação de halo de inibição ao redor dos discos impregnados com as Ag-NPs.

A.2 Resultados e Discussão:

A.2.1 - Síntese das Ag-nps

A figura 2 mostra a imagem dos tubos de falcon contendo suspensão coloidal (5,0 mM de AT) na cor amarela indicando que ocorreu a formação de Ag-NPs. A cor amarelada é explicada pela absorção da radiação eletromagnética devido a ressonância com os plasmons de superfície (MELO JR.; SANTOS; GONÇALVES, et.al., 2012).

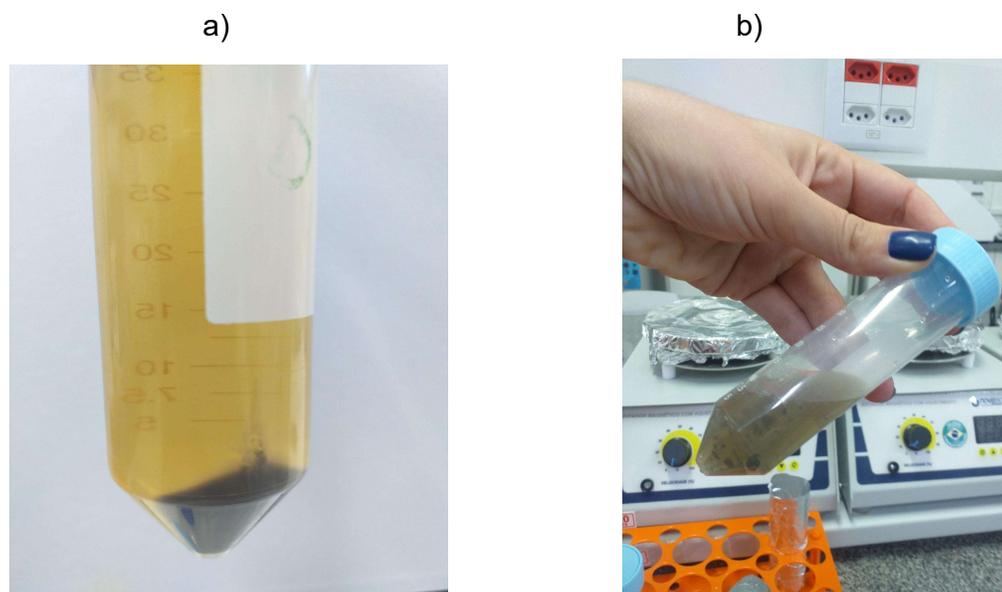


Figura 2 (a e b):Figura-a -mostra o tubo de falcon com suspensão amarela e Ag-NPs ao fundo após ultracentrifugação. E a figura-b. mostra as nanopartículas desprendidas do fundo do tubo de falcon após exposição ao equipamento ultrassônico.

Fonte: próprio autor.

A figura 3 (a, b, b' e c) ilustram imagens das nanopartículas obtidas de 3 concentrações de AT. As quais foram observadas após ultracentrifugação.

Na figura 3-a, pode ser observado a dispersão de Ag-NPs (0,025 mM de AT) ao fundo do tubo de falcon após aspiração do sobrenadante da primeira lavagem. A figura 3-b, mostra a suspensão coloidal da amostra de Ag-NPs (0,25 mM de AT) de cor marrom escura e a figura3- b' mostra as Ag-NPs (0,25 mM de AT) ao fundo do tubo de falcon após lavagem e ultracentrifugação. E a figura 3-c mostra nanopartículas

de Ag (5,0 mM de AT) visualizadas no fundo dos tubos de falcon após a segunda lavagem com o sobrenadante mais claro. As suspensões foram identificadas como a (0,025 mM de AT), b (0,25 mM de AT) e c (5,0 mM de AT).

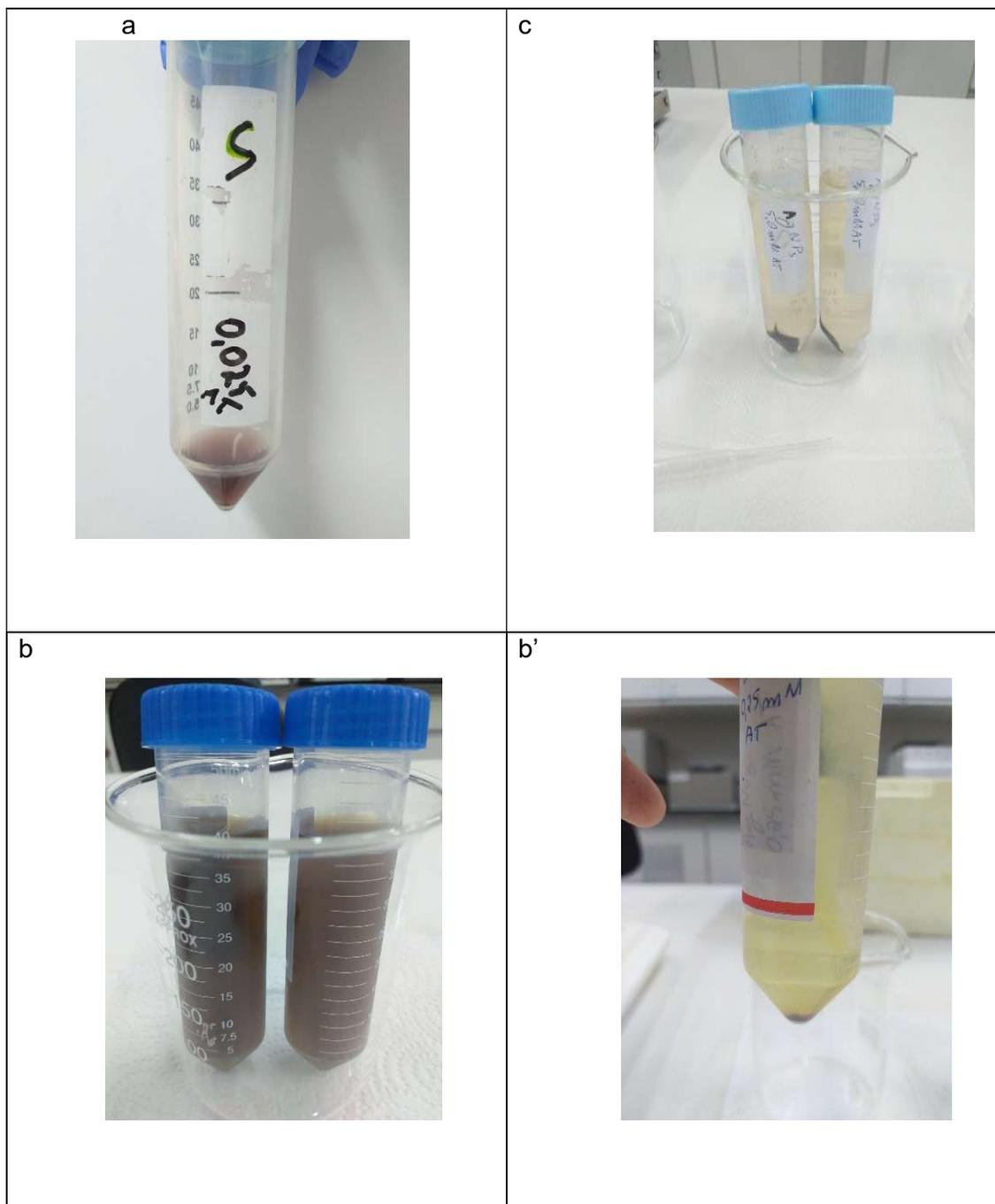


Figura 3 (a, b, b' e c): Imagens das nanopartículas de obtidas de 3 concentrações de AT.

A.2.2 - Caracterização das Ag-NPs (Absorção Atômica E DIs)

Espectroscopia de Absorção Atômica

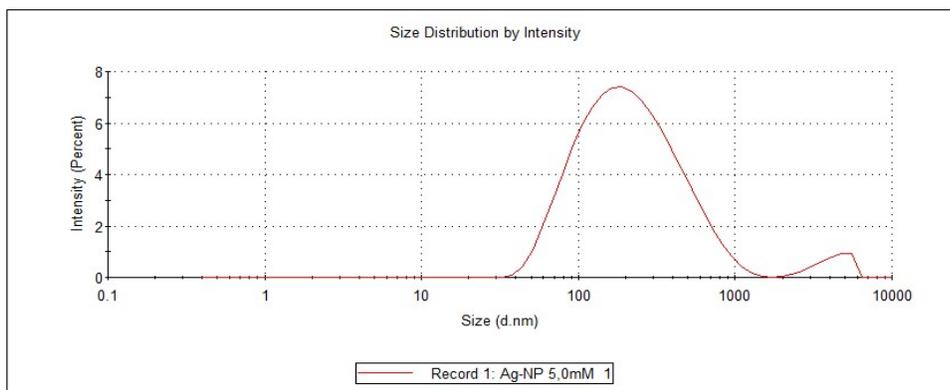
Em relação as concentrações, foram obtidas 55,6 mg/ L para a suspensão a, 1,8 mg/ L para a suspensão b e 45 mg/ L para a suspensão c.

Embora tenha sido possível produzir nanopartículas, essa quantidade de Ag-NPs obtida foi considerada insuficiente para outros ensaios e o preparo dos filmes.

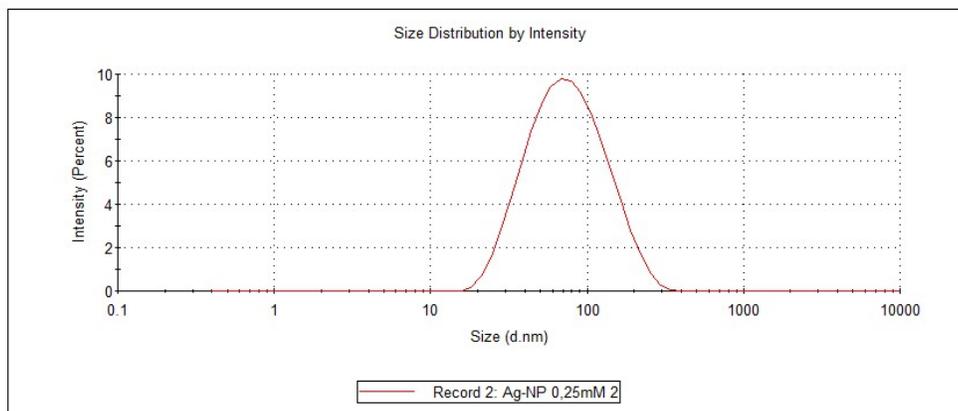
Por isso, os filmes foram preparados por meio da aquisição de NPs comerciais, conforme descrito na metodologia anteriormente.

Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

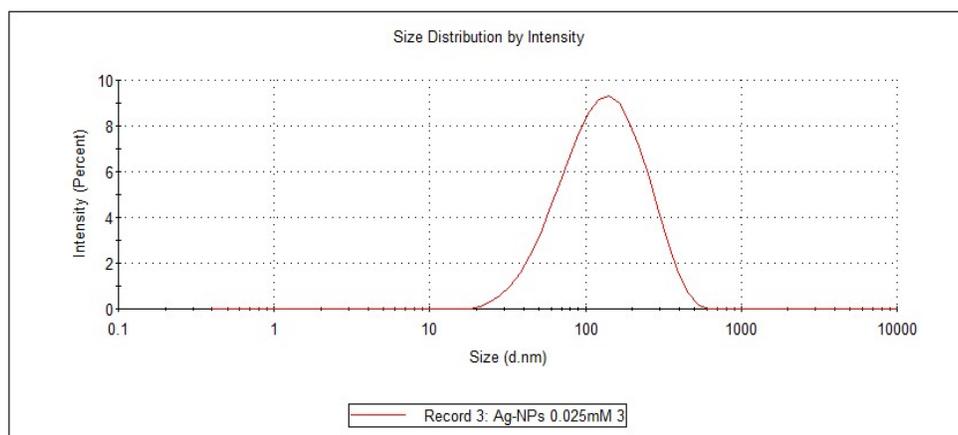
A análise de distribuição de tamanho das partículas (DLS) permitiu determinar o tamanho médio das nanopartículas sintetizadas no laboratório. Os diâmetros encontrados foram: Ag-NP 5,0 = 190 nm; Ag-NP 0,25= 85nm e Ag-NP 0,025 = 150nm, como exemplificado nos gráficos da Figura 4 (A, B e C). Os tamanhos produzidos são maiores do que inicialmente pretendíamos obter. Apesar do fato de termos produzido partículas maiores, não se exclui o uso destas partículas. Todavia, a expectativa de atividade antimicrobiana dessas NPs é menor em comparação a nanopartículas da ordem de 5 a 10nm, conforme explicado na literatura, quanto menor o tamanho da partícula, maior a área superficial e maior a atividade antimicrobiana.



a) Distribuição média de tamanho das Ag-NPs obtidas com 5,0 mM de ácido tânico.



b) Distribuição média de tamanho das Ag-NPs obtidas com 0,25 mM de ácido tânico.



c) Distribuição média de tamanho das Ag-NPs obtidas com 0,025 mM de ácido tânico.

Figura 4: Gráficos das distribuições de tamanhos das nanopartículas sintetizadas. a) Ag-NP 5,0; b) Ag-NP 0,25 e c) Ag-NP 0,025.

A.2.3 - Ensaio por Difusão em Discos (CIsi 2021) para Determinação da Atividade Antibacteriana das AG-NPS

A figura 5 (a e b) mostram triplicatas de discos de papel Whatman n.3 contendo dispersões coloidais de Ag-NPs em placas de petri preparadas com meio de Muller Hinton Agar (MHA), onde foi inoculado dois tipos de cepas bacterianas da espécie *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), deixadas em estufa à 37°C e verificadas após 24 horas.

Foi observado a ausência de halo de inibição em torno dos discos de papel em ambos meios de cultura bacteriana, como pode ser notado nas figuras 3a e 3.b.

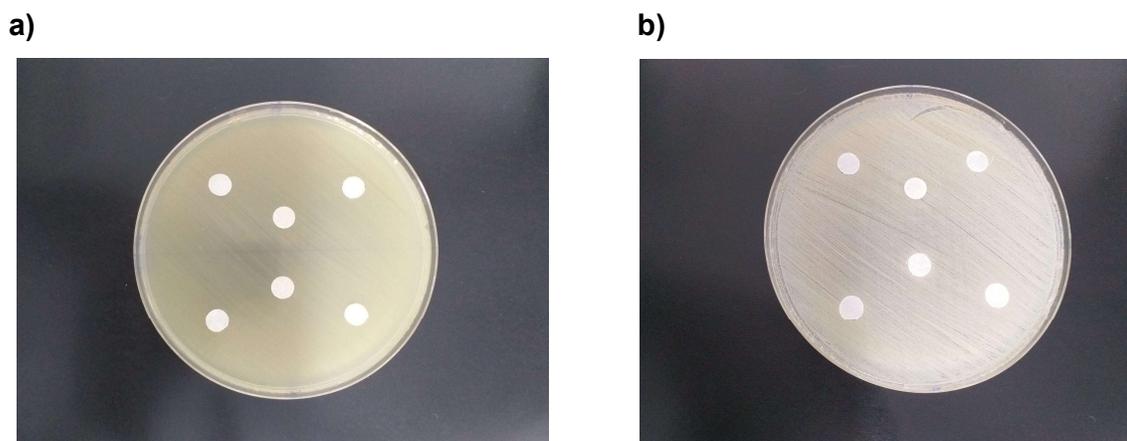


Figura 5 (a e b): Halo de inibição. Ausência para ambas as cepas bacterianas *S. aureus* e *E. coli.*, respectivamente.

A.3 Discussão e conclusões

Embora, tenha sido possível produzir NPs de prata nos tamanhos de 107 nm, 58 nm e 153 nm, não foi obtida atividade antimicrobiana pelo método disco-difusão.

Isto mostra que não ocorreu desprendimento de NPs para ter contato com o meio bacteriano e o objetivo deste trabalho é a produção de filmes de PU impregnados e preferencialmente sem difusão.

Neste trabalho, a quantidade produzida de Ag-NPs foi 55,6 mcg/mL, 1,8 mcg/mL e 45 mcg/mL das dispersões a, b e c, respectivamente. Portanto, essa concentração não foi suficiente para gerar uma atividade antimicrobiana. Portanto, seria necessária uma nova síntese para obtermos nanopartículas numa concentração maior e, desta forma, obtermos uma atividade antimicrobiana. Com essa solução mais concentrada, seria possível adicioná-las à dispersão de PU para formar um revestimento antimicrobiano após a secagem. Logo, se a concentração for muito baixa, não haverá nanopartículas suficientes na superfície do filme, para que haja um contato eficiente com as bactérias e não haverá atividade antimicrobiana.

Desta forma, optou-se por utilizar nanopartículas comerciais de prata para produzir os filmes.

APÊNDICE B: PROTOCOLO DE DESINFECÇÃO POR GLUTARALDEÍDO

Protocolo adaptado para desinfecção de amostras de PUs impregnadas com Ag-NPs usando glutaraldeído.

Indicação: desinfecção de amostras termossensíveis para o ensaio de MTT.

1. Preparar a amostra de experimento
2. Paramentar-se com equipamentos de proteção individual (luvas, óculos, máscara e avental próprios para manipular substância que produz vapor orgânico);
3. Preparar o corpo da amostra no tamanho que achar necessário;
4. Separar um recipiente limpo de plástico com tampa, preferencialmente com tampas herméticas;
5. Rotular o recipiente do glutaraldeído com data e nome do responsável pela ativação;
6. No recipiente da amostra colocar o horário, a data e o nome do manipulador;
7. Colocar no recipiente a quantidade da solução de glutaraldeído aquoso (2% ativado) suficiente para imersão completa das amostras; manter o recipiente fechado e tampado (preferencialmente com tampas com alças que travam).
 - ✓ Para a desinfecção de alto nível, manter o material imerso por 30 minutos.
 - ✓ Manter em lugar e ambiente seguros (sem risco de derramamento) com ventilação adequada e protegido da luz.
 - ✓ Certifique-se antes da retirada das amostras da solução de glutaraldeído que o ambiente é adequado, área limpa, ventilada ou com ar-condicionado (18° e 22°C) e/ou capela de exaustão, (RDC 15 de 2012 do Ministério da Saúde).
 - ✓ Paramentar-se com avental ou jaleco de manga comprida, protetor respiratório para vapores orgânicos, óculos de proteção e luvas estéreis.
 - ✓ Usar compressas ou gazes estéreis; usar pinças estéreis; usar recipientes estéreis.
8. Proceder a retirada das amostras de dentro da solução de glutaraldeído utilizando pinça estéril e técnica asséptica;
9. Fazer a retirada das amostras sobre um campo estéril (compressa estéril), preferencialmente em capela de fluxo laminar;
Para a retirada das amostras do glutaraldeído, utilizar pinça estéril e luvas estéreis;
10. Proceder a lavagem das amostras individualmente com água estéril;

No mínimo três lavagens das amostras para a retirada de resíduos do glutaraldeído.

11. Após lavagem, colocar cada uma delas em um recipiente estéril; preferencialmente placas de poços;

12. Colocar o recipiente com as amostras lavadas em uma estufa para secar a 45°C por 1 hora;

13. Após secagem, encaminhar imediatamente ao laboratório para proceder o ensaio de citotoxicidade.

14. Descarte: Sempre que possível, os resíduos poderão ser tratados no laboratório e descartados na rede de esgoto. Resíduos aquosos ácidos ou básicos, por exemplo, devem ser neutralizados antes do descarte. Entretanto, deve ser consultado a legislação Municipal para fazer o descarte de resíduo tóxico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO PROTOCOLO

ANVISA. Agência nacional de vigilância sanitária. Glutaraldeído em estabelecimentos de assistência à saúde: Fundamentos para a utilização. **INFORME TÉCNICO n.04/07**, março, 2007.

ACPO. Associação de Combate aos POPs: Associação de Consciência à Prevenção Ocupacional. **PROTOCOLO: PROCEDIMENTOS COMPULSÓRIOS PARA O USO DO GLUTARALDEÍDO. DIVISÃO DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA DO TRABALHO – SÃO PAULO, 02 DE ABRIL DE 2005.**

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). **Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities**, 2008. Disponível em: <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/disinfection/>. Acesso em: 25 de setembro de 2023.

Conservação do glutaraldeído. Disponível em: <https://www.vetsmart.com.br/cg/estudo/13799/esterilizacao-e-desinfeccao-de-ambientes-hospitalares-glutaraldeido>). Acesso em: 23 de setembro de 2023.

Esterilização química (indicação). Disponível em: <https://kasvi.com.br/esterilizacao-quais-os-tipos-e-sua-importancia-na-saude>. Acesso em: 23 de setembro de 2023.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RESOLUÇÃO - RDC Nº 15, DE 15 DE MARÇO DE 2012.** Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/>. Acesso em: 23 de setembro de 2023.

APÊNDICE C: PROTOCOLO DE ENSAIO DE CITOTOXICIDADE DAS AMOSTRAS DE WBPU-1

Protocolo utilizado para avaliar as amostras de WBPU-1 pura e impregnadas com Ag-NPs, descrito e realizado pela pesquisadora doutora Marina Fontes.

C.1. Avaliação da Citotoxicidade

Para o ensaio, utilizou-se fibroblastos murino derivados de tecido conjuntivo (L929) adquiridos da ATCC (American Type Culture Collection), que foram gentilmente cedidas pelo laboratório da Prof^a. Gisele Faria da Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP.

Inicialmente, as células foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e antibióticos (penicilina 100 U/mL; estreptomicina 0,1 mg/mL), com posterior incubação em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após 2 repiques consecutivos, iniciou-se o ensaio de citotoxicidade, empregando uma concentração de 2x10⁴ células/poço, que foram incubadas em placa de 96 poços. A placa foi mantida por 24 h em incubadora, respeitando os mesmos parâmetros de temperatura e porcentagem de CO₂ descritos anteriormente.

Paralelamente ao plaqueio das células, foi realizado o preparo dos eluatos da amostra de PU (material nativo) e das amostras nomeadas de 1 a 5. Para isso, 1 cm² de cada amostra foi inserido em tubo cônico contendo 1 mL de meio DMEM com 10% de SFB (solução diluente). Cada amostra foi preparada em triplicata e mantidas em agitação por 24 h a 150 rpm a 37°C. Após o término das 24 h, os eluatos oriundos do contato dos diferentes materiais com a solução diluente foram filtrados em filtro de seringa de 0.22 micras. Simultaneamente, verificou-se o estabelecimento da monocamada celular, seguindo com a retirada do meio de cultura e a adição dos diferentes eluatos (100 uL/poço), que foram mantidos em contato com as células por 24 h. Decorrido as 24 h de tratamento, os poços foram lavados por duas vezes consecutivas com solução salina tamponada. Finalizado essa etapa, 100 µL de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide), previamente diluído na concentração de 1 mg/mL foram adicionados em cada poço. A placa foi novamente incubada a 37°C, ao abrigo da luz, até a observação da formação dos cristais violeta

de formazan (3 horas). Finalizado o período de incubação, o MTT foi retirado dos poços e os cristais de formazan formados foram dissolvidos adicionando-se 50 µL de álcool isopropílico absoluto.

Os valores de absorvância (Abs) foram obtidos em espectrofotômetro de microplacas (SoftMax® Pro 5), com leitura em comprimento de onda a 570 nm. Como controle de morte celular (controle positivo), as células foram tratadas com DMSO (Dimetilsulfóxido) a 10% e como controle de sobrevivência (controle negativo), as células foram tratadas com DMEM + 10% SFB. O branco consistiu apenas nos reagentes utilizados em cada etapa do ensaio sem a presença de monocamada celular. Os experimentos foram conduzidos em triplicata, em três ensaios independentes, incluindo os controles (MOSMANN et al., 1983). Com os valores de Abs, calculou-se a média da porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle de sobrevivência (100%), conforme apresentado pela equação abaixo (norma ISO 10993-5):

$$\frac{(\text{Abs da amostra} - \text{Abs branco})}{(\text{Abs do controle de sobrevivência} - \text{Abs branco})} \times 100$$

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO PROTOCOLO

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, “Biological evaluation of medical devices”. Part 12: Sample preparation and reference materials”, 4ed, ISO 10993-12, 2012.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, “Biological evaluation of medical devices”. Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods”, 3st ed, ISO 10993-5, 2009.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 16, p. 55-63, 1983. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.

APÊNDICE D: PROTOCOLO DE ENSAIO DE CITOTOXICIDADE DAS AMOSTRAS DE WBPU-1- e WBPU-2-

Protocolo utilizado para avaliar as amostras de WBPU-1 e WBPU-2 pura e impregnadas com Ag-NPs, descrito e realizado pelo pesquisador doutorando Domingos Neto.

D.1 Cultivo Celular

As células HDFa (fibroblasto humano dermal) foram cultivadas em Meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com soro fetal bovino (FBS) a 10% (v/v), antibióticos (penicilina 100 IU/mL; estreptomicina 100 µg/mL) e antifúngico (anfotericina B 1,25 µg/mL), e mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Os experimentos foram conduzidos apenas quando as células atingiram 90% de confluência.

D.2 Avaliação da viabilidade celular in vitro pelo ensaio de MTT

O método escolhido para avaliar a citotoxicidade do material foi o ensaio de MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium]). Para essa avaliação, as células HDFa foram cultivadas na presença do meio condicionado dos materiais.

Em uma placa de 24 poços, foi adicionado 1 mL de meio de cultura DMEM suplementado aos poços parcialmente preenchidos com amostras dos materiais. A placa foi então incubada em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 24 horas ou por 30 dias. Após esse período, os sobrenadantes foram cuidadosamente removidos, obtendo-se assim o meio condicionado dos materiais.

As células HDFa foram cultivadas em uma placa de 96 poços (1x10⁴ células/poço), em triplicata, na presença do meio condicionado dos materiais por 24 horas a 37°C. Em seguida, foi adicionado 50 µL/poço de uma solução de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium bromide) a 5 mg/mL, e a placa foi incubada por 4 horas a 37°C. Após a redução do MTT e a solubilização dos cristais de formazan com DMSO, a absorbância foi medida a 570 nm utilizando o leitor de placa Spectra Max Gemini XS (Molecular Devices).

APÊNDICE E: TESTE DE KRUSKAL-WALLIS DE ADESÃO

O teste de adesão das amostras de WBPU2 e WBPU3 (equivalente a WBPU) foi realizado no laboratório de microbiologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista (UNESP). Os dados do teste de adesão foram tratados pelo programa Prisma e são exibidos nas tabelas abaixo.

ADESÃO			
Controle de crescimento	7,425969	7,30103	7,522879
Sem tratamento	7,522879	7,30103	7,30103
WBPU2	6,60206	6,425969	6,522879
WBPU2-Ag3.2	4,778151	4,726999	4,778151
WBPU2-Ag1.6	4,937852	4,90309	4,90309
WBPU-Ag0.4	5,726999	5,60206	5,669007
WBPU-Ag0.1	6,079181	6,028029	6,054358
WBPU3	6,726999	6,669007	6,60206
WBPU3-Ag1.6	5,30103	5,425969	5,30103
WBPU3-Ag0.4	4,425969	4,60206	4,522879
WBPU3-Ag0.1	5,669007	5,726999	5,726999
WBPU3-Ag0.05	5,90309	5,823909	5,937852

ADESÃO	
Kruskal-Wallis test	
P value	0,0003
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	***
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	Yes
Number of groups	12
Kruskal-Wallis statistic	34,61
Data summary	
Number of treatments (columns)	12
Number of values (total)	36

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Controle de crescimento vs. Sem tratamento	0,6667	No	ns	>0.9999
Controle de crescimento vs. WBPU2	7,667	No	ns	>0.9999
Controle de crescimento vs. WBPU2-Ag3.2	28,83	No	ns	0,0524

Controle de crescimento vs. WBPU2-Ag1.6	25,83	No	ns	0,1748
Controle de crescimento vs. WBPU-Ag0.4	19	No	ns	>0.9999
Controle de crescimento vs. WBPU-Ag0.1	10,83	No	ns	>0.9999
Controle de crescimento vs. WBPU3	5	No	ns	>0.9999
Controle de crescimento vs. WBPU3-Ag1.6	22,83	No	ns	0,5208
Controle de crescimento vs. WBPU3-Ag0.4	31,83	Yes	*	0,014
Controle de crescimento vs. WBPU3-Ag0.1	17,67	No	ns	>0.9999
Controle de crescimento vs. WBPU3-Ag0.05	13,83	No	ns	>0.9999
Sem tratamento vs. WBPU2	7	No	ns	>0.9999
Sem tratamento vs. WBPU2-Ag3.2	28,17	No	ns	0,0692
Sem tratamento vs. WBPU2-Ag1.6	25,17	No	ns	0,225
Sem tratamento vs. WBPU-Ag0.4	18,33	No	ns	>0.9999
Sem tratamento vs. WBPU-Ag0.1	10,17	No	ns	>0.9999
Sem tratamento vs. WBPU3	4,333	No	ns	>0.9999
Sem tratamento vs. WBPU3-Ag1.6	22,17	No	ns	0,6537
Sem tratamento vs. WBPU3-Ag0.4	31,17	Yes	*	0,019
Sem tratamento vs. WBPU3-Ag0.1	17	No	ns	>0.9999
Sem tratamento vs. WBPU3-Ag0.05	13,17	No	ns	>0.9999
WBPU2 vs. WBPU2-Ag3.2	21,17	No	ns	0,9099
WBPU2 vs. WBPU2-Ag1.6	18,17	No	ns	>0.9999
WBPU2 vs. WBPU-Ag0.4	11,33	No	ns	>0.9999
WBPU2 vs. WBPU-Ag0.1	3,167	No	ns	>0.9999
WBPU2 vs. WBPU3	-2,667	No	ns	>0.9999
WBPU2 vs. WBPU3-Ag1.6	15,17	No	ns	>0.9999
WBPU2 vs. WBPU3-Ag0.4	24,17	No	ns	0,3251
WBPU2 vs. WBPU3-Ag0.1	10	No	ns	>0.9999
WBPU2 vs. WBPU3-Ag0.05	6,167	No	ns	>0.9999
WBPU2-Ag3.2 vs. WBPU2-Ag1.6	-3	No	ns	>0.9999
WBPU2-Ag3.2 vs. WBPU-Ag0.4	-9,833	No	ns	>0.9999
WBPU2-Ag3.2 vs. WBPU-Ag0.1	-18	No	ns	>0.9999
WBPU2-Ag3.2 vs. WBPU3	-23,83	No	ns	0,3665
WBPU2-Ag3.2 vs. WBPU3-Ag1.6	-6	No	ns	>0.9999
WBPU2-Ag3.2 vs. WBPU3-Ag0.4	3	No	ns	>0.9999

WBPU2-Ag3.2 vs. WBPU3-Ag0.1	-11,17	No	ns	>0.9999
WBPU2-Ag3.2 vs. WBPU3-Ag0.05	-15	No	ns	>0.9999
WBPU2-Ag1.6 vs. WBPU-Ag0.4	-6,833	No	ns	>0.9999
WBPU2-Ag1.6 vs. WBPU-Ag0.1	-15	No	ns	>0.9999
WBPU2-Ag1.6 vs. WBPU3	-20,83	No	ns	>0.9999
WBPU2-Ag1.6 vs. WBPU3-Ag1.6	-3	No	ns	>0.9999
WBPU2-Ag1.6 vs. WBPU3-Ag0.4	6	No	ns	>0.9999
WBPU2-Ag1.6 vs. WBPU3-Ag0.1	-8,167	No	ns	>0.9999
WBPU2-Ag1.6 vs. WBPU3-Ag0.05	-12	No	ns	>0.9999
WBPU-Ag0.4 vs. WBPU-Ag0.1	-8,167	No	ns	>0.9999
WBPU-Ag0.4 vs. WBPU3	-14	No	ns	>0.9999
WBPU-Ag0.4 vs. WBPU3-Ag1.6	3,833	No	ns	>0.9999
WBPU-Ag0.4 vs. WBPU3-Ag0.4	12,83	No	ns	>0.9999
WBPU-Ag0.4 vs. WBPU3-Ag0.1	-1,333	No	ns	>0.9999
WBPU-Ag0.4 vs. WBPU3-Ag0.05	-5,167	No	ns	>0.9999
WBPU-Ag0.1 vs. WBPU3	-5,833	No	ns	>0.9999
WBPU-Ag0.1 vs. WBPU3-Ag1.6	12	No	ns	>0.9999
WBPU-Ag0.1 vs. WBPU3-Ag0.4	21	No	ns	0,9603
WBPU-Ag0.1 vs. WBPU3-Ag0.1	6,833	No	ns	>0.9999
WBPU-Ag0.1 vs. WBPU3-Ag0.05	3	No	ns	>0.9999
WBPU3 vs. WBPU3-Ag1.6	17,83	No	ns	>0.9999
WBPU3 vs. WBPU3-Ag0.4	26,83	No	ns	0,1185
WBPU3 vs. WBPU3-Ag0.1	12,67	No	ns	>0.9999
WBPU3 vs. WBPU3-Ag0.05	8,833	No	ns	>0.9999
WBPU3-Ag1.6 vs. WBPU3-Ag0.4	9	No	ns	>0.9999
WBPU3-Ag1.6 vs. WBPU3-Ag0.1	-5,167	No	ns	>0.9999
WBPU3-Ag1.6 vs. WBPU3-Ag0.05	-9	No	ns	>0.9999
WBPU3-Ag0.4 vs. WBPU3-Ag0.1	-14,17	No	ns	>0.9999
WBPU3-Ag0.4 vs. WBPU3-Ag0.05	-18	No	ns	>0.9999
WBPU3-Ag0.1 vs. WBPU3-Ag0.05	-3,833	No	ns	>0.9999

APÊNDICE F: TESTE DE KRUSKAL-WALLIS DE BIOFILME

O teste de biofilme das amostras de WBPU2 e WBPU3 (equivalente a WBPU) foi realizado no laboratório de microbiologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista (UNESP). Os dados do teste de adesão foram tratados pelo programa Prisma e são exibidos nas tabelas abaixo.

BIOFILME			
Controle de crescimento	8,937852	9	9,079181
Sem tratamento	8,937852	8,970037	8,970037
WBPU2	8,865301	8,823909	8,937852
WBPU2-Ag3.2	4,90309	4,90309	4,865301
WBPU2-Ag1.6	5,669007	5,669007	5,30103
WBPU-Ag0.4	6,30103	6,522879	6,425969
WBPU-Ag0.1	7,102662	7,166331	7,124939
WBPU3	8,30103	8,185637	8,31527
WBPU3-Ag1.6	5,079181	5,079181	5,102662
WBPU3-Ag0.4	5,726999	5,425969	5,522879
WBPU3-Ag0.1	5,865301	5,90309	5,90309
WBPU3-Ag0.05	6,30103	6,30103	5,823909

BIOFILME	
Kruskal-Wallis test	
P value	0,0003
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	***
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	Yes
Number of groups	12
Kruskal-Wallis statistic	34,44
Data summary	
Number of treatments (columns)	12
Number of values (total)	36

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Controle de crescimento vs. Sem tratamento	1,333	No	ns	>0.9999

Controle de crescimento vs. WBPU2	5,167	No	ns	>0.9999
Controle de crescimento vs. WBPU2-Ag3.2	32,17	Yes	*	0,0121
Controle de crescimento vs. WBPU2-Ag1.6	24,83	No	ns	0,2553
Controle de crescimento vs. WBPU-Ag0.4	14,5	No	ns	>0.9999
Controle de crescimento vs. WBPU-Ag0.1	11,17	No	ns	>0.9999
Controle de crescimento vs. WBPU3	8,167	No	ns	>0.9999
Controle de crescimento vs. WBPU3-Ag1.6	29,17	Yes	*	0,0457
Controle de crescimento vs. WBPU3-Ag0.4	24,5	No	ns	0,2886
Controle de crescimento vs. WBPU3-Ag0.1	19,17	No	ns	>0.9999
Controle de crescimento vs. WBPU3-Ag0.05	17,83	No	ns	>0.9999
Sem tratamento vs. WBPU2	3,833	No	ns	>0.9999
Sem tratamento vs. WBPU2-Ag3.2	30,83	Yes	*	0,0221
Sem tratamento vs. WBPU2-Ag1.6	23,5	No	ns	0,4135
Sem tratamento vs. WBPU-Ag0.4	13,17	No	ns	>0.9999
Sem tratamento vs. WBPU-Ag0.1	9,833	No	ns	>0.9999
Sem tratamento vs. WBPU3	6,833	No	ns	>0.9999
Sem tratamento vs. WBPU3-Ag1.6	27,83	No	ns	0,0795
Sem tratamento vs. WBPU3-Ag0.4	23,17	No	ns	0,4648
Sem tratamento vs. WBPU3-Ag0.1	17,83	No	ns	>0.9999
Sem tratamento vs. WBPU3-Ag0.05	16,5	No	ns	>0.9999
WBPU2 vs. WBPU2-Ag3.2	27	No	ns	0,1112

WBPU2 vs. WBPU2-Ag1.6	19,67	No	ns	>0.9999
WBPU2 vs. WBPU-Ag0.4	9,333	No	ns	>0.9999
WBPU2 vs. WBPU-Ag0.1	6	No	ns	>0.9999
WBPU2 vs. WBPU3	3	No	ns	>0.9999
WBPU2 vs. WBPU3-Ag1.6	24	No	ns	0,346
WBPU2 vs. WBPU3-Ag0.4	19,33	No	ns	>0.9999
WBPU2 vs. WBPU3-Ag0.1	14	No	ns	>0.9999
WBPU2 vs. WBPU3-Ag0.05	12,67	No	ns	>0.9999
WBPU2-Ag3.2 vs. WBPU2-Ag1.6	-7,333	No	ns	>0.9999
WBPU2-Ag3.2 vs. WBPU-Ag0.4	-17,67	No	ns	>0.9999
WBPU2-Ag3.2 vs. WBPU-Ag0.1	-21	No	ns	0,9619
WBPU2-Ag3.2 vs. WBPU3	-24	No	ns	0,346
WBPU2-Ag3.2 vs. WBPU3-Ag1.6	-3	No	ns	>0.9999
WBPU2-Ag3.2 vs. WBPU3-Ag0.4	-7,667	No	ns	>0.9999
WBPU2-Ag3.2 vs. WBPU3-Ag0.1	-13	No	ns	>0.9999
WBPU2-Ag3.2 vs. WBPU3-Ag0.05	-14,33	No	ns	>0.9999
WBPU2-Ag1.6 vs. WBPU-Ag0.4	-10,33	No	ns	>0.9999
WBPU2-Ag1.6 vs. WBPU-Ag0.1	-13,67	No	ns	>0.9999
WBPU2-Ag1.6 vs. WBPU3	-16,67	No	ns	>0.9999
WBPU2-Ag1.6 vs. WBPU3-Ag1.6	4,333	No	ns	>0.9999
WBPU2-Ag1.6 vs. WBPU3-Ag0.4	-0,3333	No	ns	>0.9999
WBPU2-Ag1.6 vs. WBPU3-Ag0.1	-5,667	No	ns	>0.9999
WBPU2-Ag1.6 vs. WBPU3-Ag0.05	-7	No	ns	>0.9999
WBPU-Ag0.4 vs. WBPU-Ag0.1	-3,333	No	ns	>0.9999
WBPU-Ag0.4 vs. WBPU3	-6,333	No	ns	>0.9999
WBPU-Ag0.4 vs. WBPU3-Ag1.6	14,67	No	ns	>0.9999
WBPU-Ag0.4 vs. WBPU3-Ag0.4	10	No	ns	>0.9999

WBPU-Ag0.4 vs. WBPU3-Ag0.1	4,667	No	ns	>0.9999
WBPU-Ag0.4 vs. WBPU3-Ag0.05	3,333	No	ns	>0.9999
WBPU-Ag0.1 vs. WBPU3	-3	No	ns	>0.9999
WBPU-Ag0.1 vs. WBPU3-Ag1.6	18	No	ns	>0.9999
WBPU-Ag0.1 vs. WBPU3-Ag0.4	13,33	No	ns	>0.9999
WBPU-Ag0.1 vs. WBPU3-Ag0.1	8	No	ns	>0.9999
WBPU-Ag0.1 vs. WBPU3-Ag0.05	6,667	No	ns	>0.9999
WBPU3 vs. WBPU3-Ag1.6	21	No	ns	0,9619
WBPU3 vs. WBPU3-Ag0.4	16,33	No	ns	>0.9999
WBPU3 vs. WBPU3-Ag0.1	11	No	ns	>0.9999
WBPU3 vs. WBPU3-Ag0.05	9,667	No	ns	>0.9999
WBPU3-Ag1.6 vs. WBPU3-Ag0.4	-4,667	No	ns	>0.9999
WBPU3-Ag1.6 vs. WBPU3-Ag0.1	-10	No	ns	>0.9999
WBPU3-Ag1.6 vs. WBPU3-Ag0.05	-11,33	No	ns	>0.9999
WBPU3-Ag0.4 vs. WBPU3-Ag0.1	-5,333	No	ns	>0.9999
WBPU3-Ag0.4 vs. WBPU3-Ag0.05	-6,667	No	ns	>0.9999
WBPU3-Ag0.1 vs. WBPU3-Ag0.05	-1,333	No	ns	>0.9999