



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

**Centro de Tecnologia e Ciências**

**Faculdade de Engenharia**

**Uly Guimarães Rocha**

**ANÁLISE DA AÇÃO BACTERICIDA DE SELANTE DE MATRIZ  
POLIMÉRICA COM ADITIVO DE PRATA**

Rio de Janeiro

2022

Ully Guimarães Rocha

**Análise da Ação Bactericida de Selante de Matriz Polimérica com Aditivo de Prata**



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Mecânica dos Sólidos.

Orientador: Prof. Dr. Daniel José Nahid Mansur Chalhub

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marília Garcia Diniz

Rio de Janeiro

2022

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC/B

R672 Rocha, Uly Guimarães.  
Análise da ação bactericida de selante de matriz polimérica com aditivo de prata / Uly Guimarães Rocha. – 2022.  
65f.

Orientador: Daniel José Nahid Mansur Chalhub.  
Coorientadora: Marília Garcia Diniz.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Engenharia.

1. Engenharia mecânica - Teses. 2. Superfícies (Tecnologia) - Teses. 3. Polímeros - Teses. 4. Bactericidas - Teses. 5. Prata - Teses. I. Chalhub, Daniel José Nahid Mansur. II. Diniz, Marília Garcia. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Engenharia. IV. Título.

CDU 621.3.035.15:661.163.4

Bibliotecária: Júlia Vieira – CRB7/6022

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

*Uly G. Rocha*

Assinatura

23/01/2023

Data

Ully Guimarães Rocha

**Análise da Ação Bactericida de Selante de Matriz Polimérica com Aditivo de Prata**

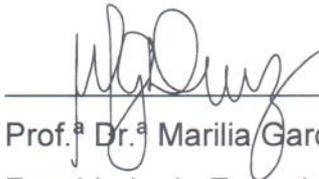
Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Mecânica dos Sólidos.

Aprovado em 19 de dezembro de 2022.

Banca Examinadora:



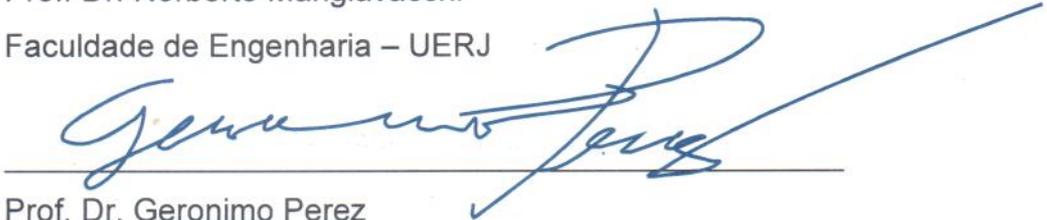
Prof. Dr. Daniel José Nahid Mansur Chalhub (Orientador)  
Faculdade de Engenharia – UERJ



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marília Garcia Diniz (Coorientadora)  
Faculdade de Engenharia – UERJ



Prof. Dr. Norberto Mangiavacchi  
Faculdade de Engenharia – UERJ



Prof. Dr. Geronimo Perez  
Universidade Federal Fluminense - UFF

Rio de Janeiro

2022

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus pelo dom da vida, por sua infinita fidelidade e amor incondicional. Por ter me dado força para buscar minhas metas e pela sustentação nos momentos de dificuldade.

À minha mãe, Ana Lucia de Oliveira, e aos meus irmãos, Lucas e Luna, por serem minha base, meu porto seguro. Agradeço pelos momentos de apoio, carinho e incentivo, que sem dúvida me tornaram uma pessoa mais forte.

À Eliane Martins pelo suporte, parceria e paciência ao longo dessa caminhada, mesmo nos momentos mais difíceis.

À toda minha família, por todos os ensinamentos e pela confiança depositada em mim. E ao meu avô Waldir Souza Nazareth que sempre foi um exemplo de profissional e uma grande inspiração para a escolha da minha profissão.

Aos meus amigos, por estarem presentes em todas as horas, mesmo que, muitas vezes, suportando a minha ausência. Em especial, ao amigo Petterson Soares por toda ajuda e suporte. Sem a amizade de vocês, certamente, a trajetória seria mais complicada e menos divertida.

À UERJ e a todos os professores, que sem dúvida têm uma parcela de contribuição na elaboração deste projeto. Em especial, à coordenadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marília Garcia Diniz, por toda paciência, dedicação e pela rica troca de conhecimentos durante este tempo.

Agradeço aos laboratórios da Engenharia Mecânica da UERJ, Microbiologia de Alimentos na Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, IFRJ-Campos Paracambi e ao Departamento de física da Universidade Federal Fluminense, UFF, pelo apoio nessa pesquisa e disponibilização de suas estruturas para a execução deste trabalho.

Deixo aqui o meu muito obrigada a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a minha formação. Sem vocês, este sonho não teria sido realizado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## RESUMO

ROCHA, Uily Guimarães. **Análise da ação bactericida de selante de matriz polimérica com aditivo de prata**. 2022. 65 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

Este projeto teve como objetivo analisar e caracterizar algumas superfícies poliméricas à base de poliácido láctico (PLA), com e sem o revestimento de um selante de matriz polimérica com aditivos de Nitrato de Prata. Foram utilizadas metodologias para fabricar as placas de PLA por manufatura aditiva (impressão 3D) e o selante à base de Prata. Técnicas de inspeção visual, microscopia óptica (MO), processamento digital de imagens (PDI), microscopia eletrônica de varredura (MEV), análise química semiquantitativa por espectroscopia por dispersão de energia (EDS) e medidas de rugosidade média (Ra) foram usadas para a caracterização dos polímeros. Testes *in vitro* foram realizados para analisar o efeito das superfícies e quantificar o crescimento das bactérias *Escherichia coli* ATCC 11229 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Enquanto que para análise do efeito das superfícies foram realizados testes *in vitro* com o objetivo de quantificar o crescimento das bactérias *Escherichia coli* ATCC 11229 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Os resultados obtidos apresentaram uma redução de aproximadamente 64 vezes na quantidade de bactérias após 30 minutos de contato com a superfície revestida pelo selante quando comparado às superfícies sem o revestimento.

Palavras-chave: PLA. Impressão 3D. Teste *in vitro*. Atividade antimicrobiana.

Nitrato de Prata.

## ABSTRACT

ROCHA, Uily Guimarães. **Analysis of the bactericidal action of polymeric matrix sealant with silver additive**. 2022. 65 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

The aim of this project was to analyse and characterize some properties of polymeric surfaces based on PLA, uncoated and coated with a polymer matrix sealant with Silver Nitrate additives. The methodology included the fabrication of PLA plates by additive manufacturing (3D printing) and the creation of a sealant model to cover these samples silver-based. Techniques like visual inspections, optical microscopy (OM), digital image processing (DIP), scanning electron microscopy (SEM), semi-quantitative chemical analysis by energy dispersive spectroscopy (EDS) and average roughness (Ra) were used to characterize the surfaces. *In vitro* tests were carried out to analyze the effect of the surfaces and quantify the growth of the bacteria *Escherichia coli* ATCC 11229 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. The results obtained showed a reduction in the number of bacteria of approximately 64x for the silver-based material after 30 minutes of contact with the sealant surface, when compared to the non-coated surfaces.

Keywords: PLA. 3D printing. *In vitro* test. Antimicrobial activity. Silver Nitrate.

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| FIGURA 1: NANOPARTÍCULAS DE PRATA ENTRANDO EM CONTATO COM A BACTÉRIA E LIBERANDO ÍONS DE PRATA. FONTE: <a href="https://methanenanosilver.weebly.com/">HTTPS://METHANENANOSILVER.WEEBLY.COM/</a> - ACESSO EM 23/11/2022. ....   | 25 |
| FIGURA 2: NÚMERO DE COLÔNIAS DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA EM PLACAS DE MEIO DE CULTURA LURIA BERTANI (LB) EXPRESSAS COMO UMA PORCENTAGEM DO NÚMERO DE COLÔNIAS CULTIVADAS EM PLACAS DE CONTROLE SEM PRATA. (A) 0; (B) 10; (C) 20; E (D) 50 MG/CM <sup>-3</sup> . FONTE: SONDI (2004). .... | 28 |
| FIGURA 3: CURVAS DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> EM MEIO LB COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SOLUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA E (B) INIBIÇÃO DE COLÔNIAS APÓS A ADIÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA (10 PPM) COM TEMPO DE INCUBAÇÃO (0;2;3,5 HORAS). FONTE: CHO (2005). ....  | 29 |
| FIGURA 4: CURVAS DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> EM MEIO LB COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SOLUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA E (B) INIBIÇÃO DE COLÔNIAS APÓS A ADIÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA (10 PPM) COM TEMPO DE INCUBAÇÃO (0;2;3,5 HORAS). FONTE: CHO (2005). ....   | 29 |
| FIGURA 5: ESTRUTURA MOLECULAR DO PLA. FONTE: PRADELLA (2006). ....  | 31 |
| FIGURA 6: PLACA DE PLA OBTIDA POR IMPRESSÃO 3D. FONTE: O AUTOR. ....  | 33 |
| FIGURA 7: A) VERNIZ COMERCIAL USADO NA FABRICAÇÃO DO SELANTE; B) NITRATO DE PRATA USADO NA FABRICAÇÃO DO SELANTE. FONTE: O AUTOR. ....  | 34 |
| FIGURA 8: PLACA DE PLA REVESTIDA COM O SELANTE NA PROPORÇÃO DE 0,1 GRAMA DE PARTÍCULAS DE NITRATO DE PRATA PARA CADA 1ML DE VERNIZ. FONTE: O AUTOR. ....  | 34 |

|  |    |
|--|----|
| FIGURA 9: PLA SENDO IMERSO EM NITROGÊNIO LÍQUIDO A UMA TEMPERATURA DE -196,15°C. FONTE: O AUTOR.....   | 36 |
| FIGURA 10: CULTURA DE BACTÉRIAS. FONTE: O AUTOR. ....  | 37 |
| FIGURA 11: UFC'S EM UMA PLACA DE PETRI COM BHI APÓS, APROXIMADAMENTE, 24 HORAS NA ESTUFA À 37°C. FONTE: O AUTOR.   | 38 |
| FIGURA 12: PLACAS DE PETRI COM MEIO DE CULTURA BHI PRONTAS PARA RECEBEREM A SOLUÇÃO SALINA CONTAMINADA COM AS BACTÉRIAS. FONTE: O AUTOR.....   | 39 |
| FIGURA 13: A) SOLUÇÃO SALINA CONTAMINADA COM BACTÉRIA NA ESCALA MC FARLAND 1; B) DILUIÇÃO DE 100X; C) TRANSFERÊNCIA DE 10 µL DA SOLUÇÃO DILUÍDA NO BHI; D) CONTAGEM DO INÓCULO INICIAL. FONTE: O AUTOR. .... | 40 |
| FIGURA 14: FLUXOGRAMA DOS TESTES IN VITRO. FONTE: O AUTOR. ...   | 40 |
| FIGURA 15: PERFIL DE RUGOSIDADE DA AMOSTRA 1 DO PLA PURO (SEM REVESTIMENTO) - PERPENDICULAR À DIREÇÃO DE IMPRESSÃO. FONTE: O AUTOR.....  | 42 |
| FIGURA 16: PERFIL DE RUGOSIDADE DA AMOSTRA 1 DO PLA PURO (SEM REVESTIMENTO) - PARALELA À DIREÇÃO DE IMPRESSÃO. FONTE: O AUTOR.....   | 43 |
| FIGURA 17: PERFIL DE RUGOSIDADE DA AMOSTRA 2 DO PLA REVESTIDO COM VERNIZ - PERPENDICULAR À DIREÇÃO DE IMPRESSÃO. FONTE: O AUTOR.....   | 43 |
| FIGURA 18: PERFIL DE RUGOSIDADE DA AMOSTRA 1 DO PLA REVESTIDO COM VERNIZ - PARALELO À DIREÇÃO DE IMPRESSÃO. FONTE: O AUTOR.....  | 43 |
| FIGURA 19: IMAGEM OBTIDA ATRAVÉS DO MICROSCÓPIO ÓTICO, COM LENTE OBJETIVA DE 20X, EVIDENCIANDO AS PARTÍCULAS DE NITRATO DE PRATA APÓS A APLICAÇÃO DO SELANTE.....  | 44 |
| FIGURA 20: IMAGEM OBTIDA ATRAVÉS DO MICROSCÓPIO ÓTICO, COM LENTE OBJETIVA DE 80X, EVIDENCIANDO AS PARTÍCULAS DE NITRATO DE PRATA APÓS A APLICAÇÃO DO SELANTE.....  | 44 |
| FIGURA 21: IMAGEM USADA PARA O PROCESSAMENTO DIGITAL COM AMPLIAÇÃO DE 3,3 VEZES. FONTE: O AUTOR. ....  | 45 |

|   |    |
|---|----|
| FIGURA 22: PORCENTAGEM DE ÁREA OCUPADA PELOS CLUSTERS DE NITRATO DE PRATA OBTIDA ATRAVÉS DO PDI. FONTE: O AUTOR. ....         | 45 |
| FIGURA 23: IMAGEM OBTIDAS ATRAVÉS DO MEV. FONTE: O AUTOR.....   | 46 |
| FIGURA 24: MICROPOROS DA SEÇÃO TRANSVERSAL DO SELANTE. FONTE: O AUTOR.....  | 47 |
| FIGURA 25: REGIÃO VAZIA ENCONTRADA NA SEÇÃO TRANSVERSAL O PLA. FONTE: O AUTOR. ....   | 47 |
| FIGURA 26: IMAGEM OBTIDA ATRAVÉS DO MEV COM A REGIÃO DOS MICROPOROS E DOS VAZIOS. FONTE: O AUTOR.....                         | 48 |
| FIGURA 27:A) REGIÃO ANALISADA; B) ESPECTRO DE ENERGIAS CARACTERÍSTICAS OBTIDOS PARA O MATERIAL ANALISADO. FONTE: O AUTOR..... | 49 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| TABELA 1: PARÂMETROS DE IMPRESSÃO DA PLACA DE PLA .....   | 33 |
| TABELA 2: QUADRO COM A RUGOSIDADE MÉDIA (RA) DA PLACA DE PLA SEM REVESTIMENTO. FONTE: O AUTOR.....      | 41 |
| TABELA 3: QUADRO COM A RUGOSIDADE MÉDIA (RA) DA PLACA DE PLA REVESTIDA COM VERNIZ. FONTE: O AUTOR. .... | 42 |

## LISTA DE GRÁFICOS

|   |    |
|---|----|
| GRÁFICO 1:COMPARATIVO ENTRE O INÓCULO DA ESCHERICHIA COLI ATCC 11229 E DAS BACTÉRIAS RECUPERADAS NAS PLACAS PURA, COM VERNIZ E COM SELANTE. FONTE: O AUTOR.....       | 50 |
| GRÁFICO 2: COMPARATIVO ENTRE O INÓCULO DA STAPHYLOCOCCUS AUREUS ATCC 25923 E DAS BACTÉRIAS RECUPERADAS NAS PLACAS PURA, COM VERNIZ E COM SELANTE. FONTE: O AUTOR..... | 51 |

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| INTRODUÇÃO .....  | 13        |
| <b>1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>   | <b>15</b> |
| 1.1 Microbiologia e as bactérias .....  | 15        |
| 1.2 Infecção hospitalar e pontos focais de transmissão de doenças. 16   |           |
| 1.3 Prevenção e controle de doenças infecciosas .....   | 18        |
| 1.4 Bactericidas e bacteriostáticos .....   | 19        |
| 1.5 Interação entre as bactérias e as superfícies .....   | 21        |
| 1.6 Materiais e biomateriais antimicrobianos .....  | 22        |
| 1.7 A Prata como material antimicrobiano.....   | 23        |
| 1.8 Íons de Prata e seu efeito biocida.....   | 24        |
| 1.9 Nanocompósitos antimicrobianos.....   | 25        |
| 1.10 Testes <i>in vitro</i> .....   | 26        |
| 1.11 Teste <i>in vitro</i> utilizando a Prata .....   | 27        |
| 1.12 Ácido Polilático (PLA).....  | 30        |
| <b>2 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>  | <b>32</b> |
| 2.1 Fabricação das amostras de PLA.....   | 32        |
| 2.2 Produção e composição dos selantes .....  | 33        |
| 2.3 Aplicação do selante.....   | 34        |
| 2.4 Caracterização da superfície da amostra.....  | 35        |
| 2.4.1 Medidas de rugosidade .....   | 35        |
| 2.4.2 Processamento digital de imagens .....  | 35        |
| 2.4.3 Microscopia ótica (MO), microscopia eletrônica de varredura<br>(MEV) e análise química semiquantitativa por espectroscopia por<br>dispersão de energia (EDS)..... | 36        |
| 2.5 Testes <i>in vitro</i> .....  | 37        |

|          |  |    |
|----------|--|----|
| <b>3</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....   | 41 |
| 3.1      | Rugosidade das superfícies do PLA .....  | 41 |
| 3.2      | Microscopia ótica (MO).....  | 44 |
| 3.3      | Processamento digital de imagens (PDI) .....   | 45 |
| 3.4      | Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....   | 46 |
| 3.5      | Análise química semiquantitativa por espectroscopia por<br>dispersão de energia (EDS) das superfícies revestidas com o selante . | 48 |
| 3.6      | Testes <i>in vitro</i> .....   | 49 |
| <b>4</b> | <b>CONCLUSÃO</b> .....   | 52 |
| <b>5</b> | <b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b> .....  | 53 |
|          | <b>REFERÊNCIAS</b> .....   | 54 |

## INTRODUÇÃO

A globalização dos microrganismos ganhou evidência recentemente. Com as viagens aéreas, um indivíduo infectado pode viajar ao redor do mundo em um curto período, o que significa que uma simples viagem pode infectar um mundo inteiro, transformando uma epidemia em uma pandemia com velocidade surpreendente [1].

Há dois tipos de bactérias, as Gram-positivas e as Gram-negativas, que são identificadas respectivamente pelas cores roxa e vermelha quando tratadas com corantes. Cerca de 90 a 95% das bactérias Gram-negativas são patogênicas enquanto as Gram-positivas, possuem, muitas não patogênicas e de grande importância para o meio ambiente. A observação de Gram possibilita também associarmos as bactérias às infecções clínicas, e mais uma vez diferencia-las em positivas ou negativas, o que permite monitorar a infecção e adotar tratamento adequado, mesmo antes que seja feita uma análise mais detalhada. Outras características que diferenciam as bactérias em negativas ou positivas são a composição e as propriedades químicas e físicas das paredes celulares. Ou seja, é o tipo de parede, ligado a coloração, que vai definir sua resistência aos antibióticos e medicamentos e quais tipos de agentes químicos e físicos serão utilizados para eliminar, controlar ou aumentar o crescimento das bactérias de acordo com a necessidade [5,6].

Com o surgimento de novos vírus e bactérias mais resistentes, estudos e pesquisas sobre substâncias biocidas e equipamentos de proteção têm se tornado ainda mais necessários. Em unidades hospitalares, onde riscos de contaminação são ainda mais elevados, os cuidados devem ser ainda maiores, pois nestes locais, as práticas de limpeza mais aprimoradas são de difícil implementação, o que acaba acarretando um percentual baixo de superfícies hospitalares que recebem uma higienização satisfatória, favorecendo os quadros de infecção hospitalar. Além de ser um ambiente de disseminação de doenças ou infecções, quando não atendidos, os hospitais são focos de microrganismos patogênicos, com alta mortalidade, gerando um grande impacto e preocupação na área médica. Na tentativa de combater a proliferação causada pela contaminação de superfícies como macas, mesas, interruptores e materiais

hospitalares, diversas pesquisas têm avaliado a atividade e a eficácia biocida de metais como Prata, cobre e zinco. Neste contexto, superfícies antimicrobianas (com habilidade de matar ou deixar inativos microrganismos do tipo bactérias, fungos e vírus) feitas de materiais compósitos contendo partículas de Prata tem se destacado [2,3].

Os selantes, usados como uma camada superficial para bloquear os poros e minimizar os efeitos da porosidade nas superfícies pois penetram nos defeitos dos revestimentos, são tintas especiais que ajudam a proteger o material base, já que reduzem as áreas expostas. Sua ação se dá através de sua aplicação sobre a superfície para vedação dos poros. Seja a base de resina (epóxi, poliéster ou poliuretano) ou cera, os selantes podem ter pigmentos metálicos ou não. Entretanto, para que seja garantida sua eficácia, eles devem ter baixa viscosidade, absorver pouca água, ser compatível com o ambiente de trabalho e possuir baixa espessura, geralmente 75 µm ou menor [77-81].

Os materiais com ação antimicrobiana são considerados essenciais em ambientes onde deve predominar a limpeza e a higiene. Com isso, o desenvolvimento de materiais biocidas tem sido uma forma eficaz de lidar com situações de risco e estão se tornando interessantes para as indústrias. Na forma de aditivos, os agentes biocidas têm sido acrescentados nas embalagens de alimentos, utensílios de cozinha, tubos, filtros de ar, recipientes e caixas, em produtos médicos como luvas, cateteres, curativos e roupas de cama [4-6,15,16].

O objetivo desta pesquisa é avaliar o efeito biocida de um selante (ou tinta) à base de polímero e contendo partículas de Nitrato de Prata, aplicado sobre a superfície de uma placa de polímero termoplástico (Poliácido Láctico - PLA), obtida por impressão 3D, simulando a superfície de alguns dispositivos hospitalares. Os sistemas com e sem selante serão submetidos às técnicas de caracterização por microscopia óptica (MO), medidas de rugosidade, microscopia eletrônica de varredura (MEV), análise química semiquantitativa por *Energy Dispersive Spectroscopy* (EDS), Processamento Digital de Imagens (PDI). Adicionalmente, os sistemas foram avaliados através de testes *in vitro* expostos às bactérias das estirpes *Escherichia coli* ATCC 11229 (Gram-negativa) e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Gram-positiva), a fim de medir a eficácia do selante ao entrar em contato direto com as bactérias.

## **1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **1.1 Microbiologia e as bactérias**

A microbiologia estuda os seres microscópicos (alguns deles surgiram há milhões de anos) conhecidos como micro-organismos. Dotados de uma grande diversidade de espécies, impossíveis de serem vistos com a vista desarmada, possuem o papel fundamental no ciclo do carbono e do nitrogênio e, automaticamente, na manutenção da atividade biológica [2]. Já a microbiologia médica, está relacionada aos micro-organismos causadores de doenças em humanos e animais [1].

Dentro do grupo de micro-organismos estão as bactérias, com dimensões oscilando entre 0,2 e 2  $\mu\text{m}$ , seres unicelulares que ao aderirem em determinadas superfícies, influenciadas por diversos fatores como alimento, temperatura, humidade, PH e oxigênio, podem aumentar sua população, formando um biofilme [2]. Encontradas em qualquer lugar, elas revestem a pele, as mucosas e cobrem o trato intestinal dos homens e dos animais. Estão intrinsecamente ligadas às vidas de organismos e aos amplos ambientes em que habitam. As bactérias denominadas comensais, são extremamente benéficas e essenciais para a manutenção da vida, integram parte da nossa proteção contra a colonização das patógenas, as quais são nocivas à nossa saúde [3].

Segundo os microbiologistas, as bactérias são classificadas de acordo com as características dos micro-organismos, podendo ser divididas entre Gram-positivas e Gram-negativas [4]. Existem, portanto, algumas particularidades entre essas bactérias, e para diferenciá-las foi criado o método chamado GRAM, em homenagem ao bacteriologista dinamarquês Hans Christian Gram, que realizou um estudo a respeito da cor das bactérias. Em 1884, Hans observou que as bactérias adquiriam cores diferentes, quando tratadas com diferentes corantes. Isso permitiu classificá-las em dois grupos distintos: as que ficavam roxas, que foram chamadas de Gram-positivas, e as que ficavam vermelhas, chamadas de Gram-negativas [5]. A técnica de Gram tem também uma grande importância clínica porque permite que as bactérias associadas a infecções sejam prontamente caracterizadas como Gram-positivas ou Gram-negativas, o que permite monitorar a infecção e adotar certas opções de

tratamento, mesmo antes que seja feita uma análise por cultura, isto é, uma análise mais detalhada.

Além da coloração, é possível diferenciá-las quanto a composição e propriedades químicas e físicas das paredes celulares. As Gram-positivas possuem uma parede celular grossa. Já os organismos Gram-negativos possuem uma parede celular mais fina que é envolvida por outra membrana externa, portanto, os Gram-negativos possuem 2 membranas, a externa difere da interna e contém moléculas de lipossacarídeos tornando-as mais fortes, aumentando sua resistência aos antibióticos e medicamentos. Portanto, é o tipo de parede, ligado a coloração, que vai definir quais tipos de agentes químicos e físicos que serão utilizados para eliminar, controlar ou aumentar o crescimento das bactérias de acordo com a necessidade [6].

Cerca de 90 a 95% das bactérias Gram-negativas são patogênicas e muitas Gram-positivas são não patogênicas e algumas, inclusive, de grande utilidade para o meio ambiente e seres vivos. Outra característica das Gram-negativas é que, geralmente, são mais ameaçadoras do que as Gram-positivas por terem uma maior capacidade de se multiplicar e serem ou se tornarem mais facilmente resistentes aos antibióticos [6].

Dentre as Gram-positivas destacam-se a *Stafilococcus aureus*, *Lactobacillus spp*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Clostridium tetani* e *Enterococcus faecalis*. Já entre as bactérias Gram-negativas destacam-se a *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria*, *Klebsiella*, *Enterobacteriaceae*, *Chlamydia*, *Salmonella*, *Shigella* e *Vibrio* [2].

## **1.2 Infecção hospitalar e pontos focais de transmissão de doenças**

Como já dito na Introdução desta proposta, com a globalização dos micro-organismos, uma simples viagem pode infectar um mundo inteiro, transformando uma epidemia em uma pandemia com uma velocidade surpreendente [7].

Considerando ambientes de possível disseminação de doenças ou infecções, quando não tomados os devidos cuidados, os hospitais são pontos focais de micro-organismos patógenos. A partir do momento em que os doentes passaram a ser tratados em hospitais, a transmissão de agentes infecciosos no ambiente hospitalar tornou-se motivo de preocupação. As infecções adquiridas

nesses locais têm contribuído para aumentar o risco de morte entre os pacientes mais graves e aqueles imunocomprometidos [8].

Com alto índice de mortalidade, este tipo de infecção sempre teve um grande impacto e preocupação na área médica. Por ser um grande problema de saúde pública, necessita de uma vigilância epidemiológica minuciosa, de alta periodicidade e atenção redobrada dos profissionais de saúde, da administração hospitalar, da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar e do Governo [12].

De acordo com o Ministério da Saúde (1998), a Infecção Hospitalar (IH) “é aquela adquirida após a admissão do paciente e que se manifeste durante a internação ou após a alta, quando puder ser relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares” [9].

Numa situação mais ampla, isto é, considerando-se outros ambientes pontos focais para disseminação de doenças e não só os hospitalares, o Programa de Controle de Infecção em Serviços de Saúde é sinônimo de controle de qualidade. Por isso, no Brasil, essa atividade é desenvolvida pela Anvisa com muito engajamento, em parceria com Vigilâncias Sanitárias estaduais, municipais, hospitais públicos e privados, instituições de ensino e profissionais de saúde. A meta é reduzir, em âmbito nacional, a incidência de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e de Resistência Microbiana (RM) em serviços de saúde, por meio da implementação de práticas de prevenção e controle de infecções baseadas em evidências. Além de divulgar ações que possam prevenir as infecções adquiridas nas unidades de saúde - hospitais, clínicas e ambulatórios [10].

Segundo a Organização Mundial de Saúde, até 32% dos pacientes contraem um infecção pós-cirúrgica e centenas de milhões de pacientes são afetados pelas IRAS a cada ano em todo o mundo, ou seja, uma alta taxa de mortalidade, acarretando uma grande perda financeira para todo o sistema de saúde. Além disso, um em cada dez pacientes contraem alguma infecção enquanto recebem cuidados e de cada cem pacientes hospitalizados, sete em países desenvolvidos e dez em países em desenvolvimento irão adquirir pelo menos uma das IRAS [9, 13].

Entretanto, os hospitais também são essenciais para o controle epidemiológico, pois complementam e amplificam a eficácia de muitas outras partes do sistema de saúde. Atualmente, as deficiências do sistema hospitalar e

de saúde estão conduzindo, em boa parte do mundo, uma nova visão, onde os hospitais desempenham um papel fundamental no apoio de outros prestadores de cuidados da saúde, gerando uma rede de referência ao alcance da comunidade [11].

Os hospitais concentram recursos escassos em redes de referência bem planejadas para responder de forma eficiente às necessidades de saúde da população. E, geralmente, fornecem um ambiente para a educação de médicos, enfermeiras e outros profissionais de saúde e são uma base crítica para a pesquisa clínica [11].

### **1.3 Prevenção e controle de doenças infecciosas**

Prevenir a exposição e a infecção é a forma mais eficaz de combater a morbidade e mortalidade causadas pelas doenças infecciosas. Medidas de prevenções, que geralmente se aplicam a muitos patógenos com mesmo modo de transmissão, podem ser tomadas pela comunidade, com objetivo de diminuir a transmissão e automaticamente o risco de exposição dos indivíduos que componham esta comunidade, e pelo próprio indivíduo [1].

Muitas dessas medidas, são relativamente simples e fáceis de implementar. Como por exemplo, a importância de lavar as mãos que foi fundamentada por Ignaz Semmelweiss na década de 1840. Ele demonstrou a relevância desse simples ato, quando identificou o modo de transmissão da sepsé puerperal, e introduziu esta medida para os médicos em hospitais, com o objetivo de reduzir a mortalidade. Porém, muitas vezes uma medida de prevenção não é generalizada entre os indivíduos. Mudanças de comportamentos em torno da prevenção pode ser difícil, pois muitos fatores relacionados ao conhecimento, a motivação e aos recursos disponíveis determinam se uma medida será implementada [2, 12].

Dentre as medidas individuais a serem tomadas, pode-se destacar lavagem das mãos, higiene alimentar, uso de preservativos e medidas contra doenças transmitidas por vetores. Já pensando no âmbito mais geral, pode-se relacionar ao saneamento básico, água potável, isolamento, quarentena, rastreamento de contato, triagem no suprimento de sangue e outros [3].

É possível, como forma de prevenção, trabalhar, também, com o controle da resistência bacteriana. No início do século XX, a descoberta da penicilina,

antibiótico usado durante a segunda guerra mundial, ajudou a controlar as infecções bacterianas, incluindo as hospitalares. Porém, com o aparecimento da bactéria *Staphylococcus aureus*, resistente à penicilina, na metade desse século, levou a uma devastadora epidemia hospitalar com esses agentes. Esta bactéria infectava os pacientes internados nas unidades, com isso a efetividade da descoberta da penicilina e de outros antibióticos posteriores foi substituída pelo número crescente de amostras bacterianas que, rapidamente, adquirem resistência a estas drogas [12].

A bactéria tem a habilidade de se adaptar e conseqüentemente criar uma resistência aos antibióticos. Estudos mostram que na Europa e na América do Norte, *Staphylococcus aureus* se mostrou resistente à metilina, *Streptococcus pneumoniae* é não susceptível à penicilina, *enterococos* é resistente à vancomicina e a própria vancomicina é a única droga que pode tratar o *Staphylococcus aureus*, mas no Japão, algumas cepas já se mostraram resistentes a este antibiótico. Esta resistência antimicrobiana é irreversível devido ao uso indiscriminado de antibióticos. Por isso, é algo preocupante para o meio científico e cada vez aumenta a necessidade de conscientizar os profissionais de saúde e a população quanto ao uso dos antibióticos [3, 12].

O impacto das bactérias resistentes é um problema mundial que representa uma grave ameaça para a humanidade. Além de ser uma grande barreira na saúde pública e de grande amplitude médico-social, cujas conseqüências, para muitos estudiosos, já estão no nosso cotidiano e podem piorar, pois no futuro elas serão ainda mais devastadoras para a humanidade [12].

#### **1.4 Bactericidas e bacteriostáticos**

Há duas maneiras diferentes de lidar com infecção bacteriana. Uma delas é a administração de bacteriostáticos, que impedem a reprodução das bactérias, e a outra são os bactericidas, que matam as bactérias (biocidas). Por não serem categorias absolutas, pode acontecer de um ser bactericida para um determinado organismo e bacteriostático para outros. Por exemplo, o antibiótico vancomicina, já citado anteriormente, é bactericida para o *Staphylococcus aureus*, mas se comporta como um bacteriostático contra o *Enterococos* [4].

Quando se elimina biofilmes ou bactérias de superfícies, nos alimentos, de soluções, não se utiliza antibióticos, mas a técnica de esterilização ou limpeza e desinfecção [4, 14].

A limpeza (ou esterilização) é onde se elimina, de uma determinada superfície, uma sujeira, seja ela visível ou invisível, evitando o acúmulo de resíduos que gerem algum crescimento microbiano, com a destruição de todas as formas de vida micro-orgânicas. Já a desinfecção é definida como o tratamento de superfícies e equipamentos, utilizando meios físicos ou químicos, para descarte total de patógenos e redução da quantidade de micro-organismos presentes para um nível seguro e / ou prevenir o crescimento microbiano na superfície durante o período de produção, evitando assim sua transferência para o consumidor [14].

A literatura apresenta alguns agentes químicos capazes de esterilizar e desinfetar. Entre alguns desses agentes estão o Cloro, Hipocloreto de Sódio (NaClO), Dióxido de Cloro (ClO<sub>2</sub>), Peróxido de Hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Ozônio (O<sub>3</sub>) e os metais Alumínio, Cobre, Mercúrio, Cádmio, Cromo e Prata [4].

O Cloro, um dos desinfetantes mais utilizados e eficazes para tratamento de água, atua rompendo as ligações químicas das biomoléculas presentes nas bactérias e vírus, com uma ação bactericida potente contra a *Escherichia coli*. Porém, armazenar o Cloro em forma de gás, além de ser tóxico para os seres humanos, não é uma tarefa fácil. Com isso, outros desinfetantes, como o Hipoclorito de Sódio (NaClO), Dióxido de Cloro (ClO<sub>2</sub>), vêm sendo estudados como uma alternativa menos nociva a saúde humana [105-107].

Com ampla atividade antimicrobiana e de ação rápida e barata, o Hipoclorito de Sódio é conhecido como um ótimo desinfetante, mas possui alta corrosividade, limitando seu uso em algumas superfícies e, para evitar danos, a limpeza e desinfecção é feita com o pH elevado, entre 10-11, e para alvejantes domésticos, possui uma concentração máxima de 5% em peso de Hipoclorito de Sódio. O Dióxido de Cloro também possui um alto poder oxidante, mas uma efetividade maior que a do Cloro pois não reage com as moléculas de água, acarretando um maior contato com os microrganismos. Além disso, comparado ao Cloro, o Dióxido de Cloro consegue, com doses mais baixas, um efeito desinfetante mais rápido [105,108,109].

O Peróxido de Hidrogênio tem sido utilizado na indústria alimentícia e em hospitais. Barato e fácil de produzir, também é utilizada como desinfetante tópico e oral. Para que o Peróxido de Hidrogênio tenha um efeito bactericida, é necessário altas concentrações e precisa ser misturado com outro agente químico, como por exemplo um ácido [110,111].

Dentre os metais com efeito biocida, temos o Alumínio que, na forma iônica, é altamente tóxico e vem sendo usado no combate aos fungos e bactérias na agroindústria como pesticida para tratamento de frutas. Assim como o Alumínio, o Cádmio e o Cromo são comumente usados na agricultura, na composição de fungicidas e bactericidas para evitar pragas. Já o Mercúrio, um dos bactericidas mais conhecidos e usado há anos para obturar dentes, caiu em desuso devido à sua toxicidade elevada, sendo substituído pelo Iodo que além de ser menos tóxico aos seres humanos, possui um efeito microbiano mais vasto [14,112-116].

O Cobre, devido às suas propriedades antimicrobianas, vem sendo utilizado de várias maneiras, sendo na forma de ligas, revestimentos de superfícies, vestuários e tecidos. Porém, vale ressaltar que os seres humanos possuem uma baixa sensibilidade em contato com o cobre, sendo assim o Cobre metálico, em pequenas concentrações, um elemento seguro para o meio ambiente e para o homem. Assim como o Cobre, a Prata é um bactericida amplamente utilizado em âmbito hospitalar. Utilizada para prevenir infecções, despertou grande interesse na odontologia, pois consegue manter seu efeito biocida por um longo período. Os íons de Prata têm o poder de inibir o crescimento celular, danificando as paredes celulares e vem sendo usada como aditivos em matrizes poliméricas, aditivos superficiais e, recentemente, vem sendo testada a adição de nanopartículas de Prata em tecidos para serem utilizados em ambiente hospitalar com o objetivo de combater às bactérias e vírus. E, por ser um metal tóxico para as bactérias é o objeto de estudo deste trabalho [25,117-120].

### **1.5 Interação entre as bactérias e as superfícies**

Uma das maneiras mais comuns de sobrevivência das bactérias, é aderindo às superfícies e formando comunidades, conhecidas como biofilme. As superfícies de materiais de aço inoxidável em geral, vidro, borracha e polipropileno, por exemplo, são locais onde uma bactéria patogêna pode

facilmente colonizar, contaminando a superfície do material. Muitas bactérias são capazes de aderir a superfícies e são de difícil remoção. Na cozinha, por exemplo, e principalmente, nos locais onde são manuseados alimentos, como tábuas de corte e bancadas, acabam comprometendo a segurança alimentar [4,19].

Nos hospitais, esses riscos são elevados. Práticas de limpeza mais aprimoradas são de difícil implementação, o que acaba acarretando um percentual de que apenas 25% a 50% das superfícies hospitalares recebem uma higienização de forma rotineira, desempenhando um importante papel na transmissão de doenças no ambiente hospitalar [19].

Como uma tentativa de combate a proliferação causada pela contaminação das superfícies como macas, mesas, interruptores, corrimãos e materiais hospitalares, há estudos com materiais compósitos que incorporam metais como o Cobre, Zinco ou Prata que possuem comprovada atividade biocida. Alguns trabalhos têm estudado, particularmente, o tempo de eficácia da ação biocida. Em um estudo realizado em uma enfermaria israelense de cuidados crônicos de traumatismo craniano, pôde-se concluir que houve uma redução de 24% de doenças relacionadas à assistência a saúde. Assim como menos dias de febre e redução do uso de antibióticos dos pacientes que estavam usando a roupa de cama impregnada de Óxido de Cobre [19,20,121].

### **1.6 Materiais e biomateriais antimicrobianos**

Com a resistência das bactérias aos antibióticos, novos estudos estão sendo feitos, com o objetivo de criar agente antimicrobianos mais eficazes. Dentre eles, a criação de revestimentos com a finalidade de conter ou quem sabe até eliminar a proliferação das bactérias [14,15].

Os materiais com ação antimicrobiana são considerados essenciais em ambientes onde deve predominar a limpeza e a higiene. Com isso, o desenvolvimento de revestimentos biocidas tem sido uma forma eficaz de lidar com situações de risco e estão se tornando interessantes para as indústrias. Na forma de aditivos, os agentes biocidas são capazes de serem aplicados diretamente na fabricação. Esses aditivos têm sido acrescentados nas embalagens de alimentos, utensílios de cozinha, tubos, filtros de ar, recipientes

e caixas, e, também, em produtos médicos como luvas, cateteres, curativos e roupas de cama [15, 16].

Os biocidas são agentes antimicrobianos que têm efeitos tanto bactericidas como bacteriostáticos e vêm sendo usados em grande variedade de plásticos e materiais poliméricos, seja por depósito de uma camada protetora bactericida ou inseridos dentro da matriz polimérica. Os materiais poliméricos antimicrobianos têm o objetivo de controlar os micro-organismos de forma mais ativa e a incorporação do agente bactericida na matriz polimérica visa melhorar sua vida útil e / ou controlar sua liberação. Estes materiais devem necessariamente oferecer alta confiabilidade para hospitais, indústrias alimentícias e consumidores de produtos alimentícios [14, 15].

A adição de componentes químicos já vem sendo utilizada em polímeros para prevenir a degradação do material, tais como descoloração, corrosão, manchas e outros. Já a adição de um material antimicrobiano tem como ideia principal a de que os íons, por exemplo de Prata ou qualquer outro composto bactericida adicionado, sejam gradativamente liberados na solução que os envolve para eliminar os micro-organismos [14].

Deve-se notar que a criação de um determinado material que irá ter uma relação tão direta e invasiva com um ser vivo, pode envolver a prevenção de alguns outros eventos específicos, como por exemplo, a sua citotoxicidade para pessoas e animais. É preciso que haja uma combinação entre ambos, isto é, a ação bactericida e não toxicidade para humanos e animais [18].

### **1.7A Prata como material antimicrobiano**

A Prata, metal usado pela humanidade há cerca de 7000 anos, tem uma extensa história de uso antibacteriano. Antigamente, era utilizada pelos gregos, egípcios e outros para transportar ou armazenar águas ou alimentos. Seu uso em moedas e talheres é bastante conhecido não só pela sua ação biocida, mas também por sua resistência à corrosão [24-27].

Segundo Moyer (1965), um dos precursores e responsáveis por pesquisas utilizando o Nitrato de Prata no tratamento de queimaduras, a Prata é ingrediente ativo em pomada e que pode ser utilizada para a prevenção da infecção em queimaduras [24, 28-31].

Após a descoberta dos antibióticos, na década de 40, o uso da Prata como agente antimicrobiano teve uma redução. Entretanto, devido à disseminação de *Staphylococcus aureus* e sua resistência aos antibióticos, houve, atualmente, um aumento no uso da Prata em feridas abertas que após análises com a *Staphylococcus aureus* e outros gram-positivos, não tem apresentado nenhuma resistência à Prata [32-35, 39, 40].

Conhecidas há cerca de 120 anos, as nanopartículas de Prata possuem uma grande importância na microbiologia [41, 42]. Com propriedades antimicrobianas bem definidas, podem ser usadas para evitar a proliferação de bactérias em meios aquosos e sólidos. Considerando-se isso, pesquisas estão sendo direcionadas para que sejam empregadas em próteses, cateteres, enxertos vasculares, tecidos tratamento de água e outros [43-51].

Com suas propriedades oligodinâmicas, a Prata tem sido usada em cateteres urinários revestidos com óxido de Prata para infecções do trato urinário e manguitos de colágeno impregnados com Prata em cateteres venosos centrais para sepse associada ao cateter [69-73].

Em alguns estudos *in vitro* foi possível observar a ação microbiana da Prata, com redução bacteriana diretamente proporcional à concentração nanopartículas de Prata, com a quebra da parede celular da *Staphylococcus aureus*, a inibição de biofilmes e um poder de eliminar, sem criar resistência, 650 agentes patogênicos [43, 52, 54-55]. Apesar destes resultados, ainda há controvérsias sobre o tempo de eficácia do poder bactericida e dos mecanismos que envolvem este processo, uma vez que os sistemas estão suscetíveis à variáveis diversas.

### **1.8 Íons de Prata e seu efeito biocida**

Os íons de Prata têm o poder de atacar a célula bacteriana de várias maneiras. Quando o átomo de Prata entra em contato com o oxigênio, íons positivos são liberados devido à oxidação e, conforme Figura 1, possuem a capacidade de perfurar as membranas e parede celular das bactérias, além de se unir a componentes, como o Ácido Desoxirribonucleico, evitando que as bactérias cresçam e realizem funções básicas. Ou seja, essa reação impede a

reprodução das bactéria, danifica o material genético dos microorganismos e interrompe o transporte de nutrientes, acarretando na morte da bactéria [88,125].

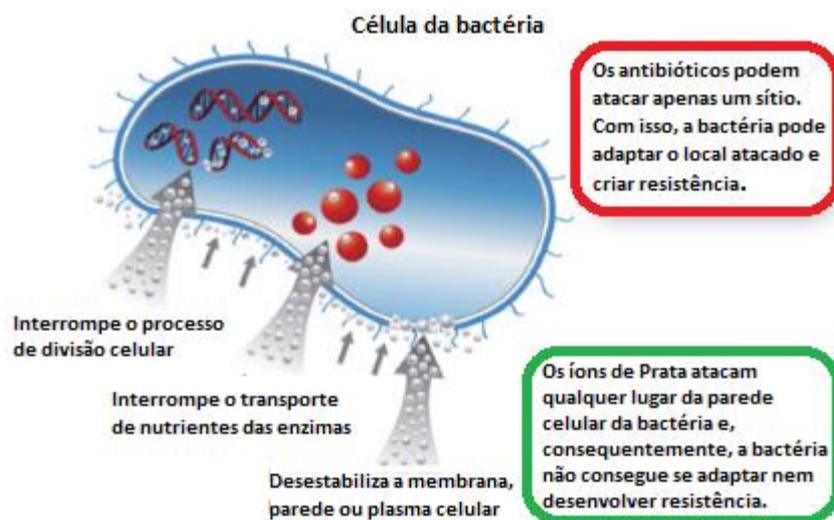


Figura 1: Nanopartículas de Prata entrando em contato com a bactéria e liberando íons de Prata. Fonte: <https://methanenanosilver.weebly.com/> - Acesso em 23/11/2022.

Com dimensões reduzidas e alta relação entre área e volume, as nanopartículas de Prata possuem mais facilidade para penetrar a membrana celular. Além disso, as nanopartículas possuem uma grande capacidade de se unir ao Enxofre e ao Fósforo presentes tanto nas membranas quanto no interior das bactérias, causando danos ao processo de respiração celular e inibindo a capacidade de replicação das bactérias [88,125].

### 1.9 Nanocompósitos antimicrobianos

Há um certo consenso de que um nanomaterial é uma substância produzida intencionalmente em nanoescala (cerca de 1-100 nm) para ter uma determinada propriedade ou composição [20]. Materiais em nanoescala podem ter propriedades físicas, químicas e biológicas únicas, podendo diferir significativamente em relação aos átomos ou moléculas equivalentes e convencionais [21].

A partir da nanociência utilizada para medir, caracterizar e manipular materiais em escala nanométrica, e da nanotecnologia, foi possível entender e criar nanomateriais com efeito bactericida [22, 23]. Dentre eles estão os nanocompósitos poliméricos, que têm chamado bastante atenção com suas

propriedades melhoradas em comparação aos materiais compósitos com carga de escala macroscópica. Os polímeros biocidas que utilizam nanopartículas de Prata dispersas na matriz, parecem possuir propriedades antimicrobianas mais eficientes [23, 36-38].

De amplo espectro e com ação antimicrobiana potente, as nanopartículas de Prata possuem um elevado efeito catalítico, grande área superficial, boa condutividade, uma atividade antimicrobiana excepcional, redução da adesão microbiana e redução biofilme. As nanopartículas de Prata demonstram desestabilizar a membrana externa, colapsar o potencial da membrana plasmática, impedir a divisão celular e esgotar os níveis energia intracelular. Com sistema físico-químico eficiente, tem demonstrado o poder de eliminar mais de 650 agentes patogênicos sem que eles criem resistência, ou seja, possui uma ampla ação bactericida, o que acarreta na utilização de novos nanocompósitos para fabricação dispositivos protéticos, matrizes para preenchimento de defeitos ósseos, cateteres, materiais odontológicos, assim como na medicina veterinária, no tratamento de água, na indústria de alimentos e, inclusive, na fabricação de tintas antibactérias [52, 83-90].

### **1.10 Testes *in vitro***

Os testes *in vitro* são estudos pré-clínicos nos quais a eficácia e a toxicidade de um determinado produto são medidas antes de serem administrados para os seres humanos. Eles têm o objetivo de substituir os ensaios com animais, estes últimos mais complexos, severos e com diversas regras reguladoras. Mesmo não reproduzindo uma real situação, esses estudos fornecem informações importantes sobre a proliferação e morfologia celular, além do comportamento das células durante o período de cultura.

Além de cultivo de tecidos, cultivos celulares, enzimas e proteínas, são utilizados organismos como bactérias, fungos, algas e crustáceos para realização dos testes com a finalidade de detectar a toxicidade de produtos para uso de seres humanos. O desenvolvimento e a padronização desses estudos são fundamentais para evitar reações adversas ou lesões que biomaterial, por exemplo, podem causar ao organismo do paciente.

De acordo com o Órgão Internacional de Padronização - ISO 10993, o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste para se avaliar a

biocompatibilidade de qualquer material para uso em dispositivos biomédicos e, por ser uma análise do comportamento celular através de diferentes mecanismos, somente após comprovada a sua não toxicidade é que o estudo pode dar seguimento à próxima etapa [56-61].

### 1.11 Teste *in vitro* utilizando a Prata

A Prata é comumente usada tanto na forma iônica quanto na forma nanoparticulada como agente bactericida. Isto é geralmente atribuído a uma maior toxicidade para células procarióticas do que para células de mamífero. Encontradas em bactérias e cianobactérias, as células procarióticas, não possuem núcleo definido, não há citoesqueleto e organelas membranosas. Sendo, portanto, uma célula com estrutura simples, sem núcleo definido e material genético distribuído na região do citoplasma. Segundo a teoria evolutiva, as células procarióticas, deram origem as células eucarióticas, encontradas nos mamíferos, que são mais complexas e possuem núcleo concentrando o material genético. Estudos comparativos com íons de Prata e nanopartículas de Prata mostraram que o efeito tóxico da Prata ocorre em uma faixa de concentração semelhante para *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, células-tronco mesenquimais humanas e células mononucleares do sangue periférico, com concentração de 0,5 a 5 ppm para íons de Prata e 12,5 a 50 ppm para nanopartículas de Prata. Ao serem misturadas a algum meio, seja tinta ou gel, as nanopartículas de Prata funcionam como um potente agente antimicrobiano em baixas concentrações, sendo uma alternativa segura e eficaz, comprovado por testes *in vitro* [43; 62-63; 65,82].

Na Figura 2 foram realizados testes com a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* contendo diferentes concentrações de nanopartículas de Prata em placas de Luria Bertani (LB), meio usado para o cultivo e manutenção das bactérias. Na concentração de  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^{-3}$  é possível observar que a Prata inibiu 70% do número de colônias bacterianas cultivadas nas placas e a partir de  $20 \mu\text{g}/\text{cm}^{-3}$  praticamente inibiu a presença dessas colônias, mostrando que a efetividade das nanopartículas de Prata estão diretamente proporcionais às composições [43].

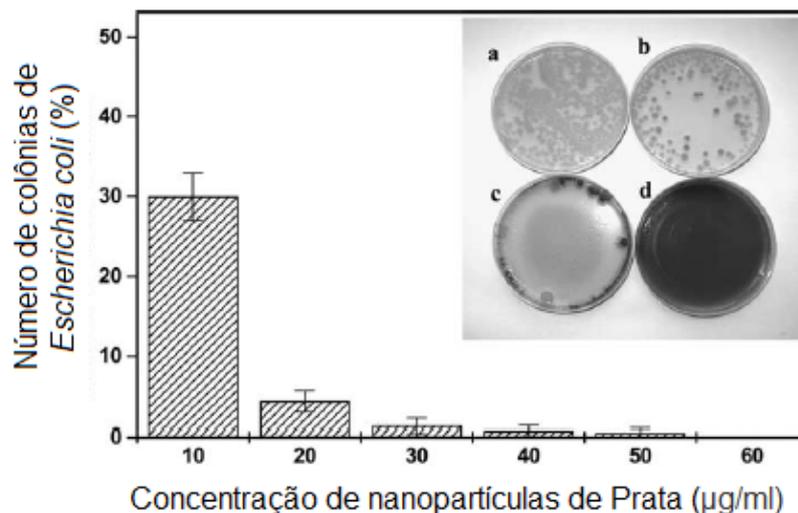


Figura 2: Número de colônias de *Escherichia coli* em função da concentração de nanopartículas de Prata em placas de meio de cultura Luria Bertani (LB) expressas como uma porcentagem do número de colônias cultivadas em placas de controle sem Prata. (a) 0; (b) 10; (c) 20; e (d) 50  $\mu\text{g}/\text{cm}^{-3}$ . Fonte: Sondi (2004).

As atividades antibacterianas de curativos revestidos ou impregnados de Prata, também tem sua ação bactericida comprovada, principalmente contra bactérias Gram-negativas. Em testes *in vitro* realizados com diferentes tipos de bactérias, incluindo a *Staphylococcus aureus* e a *Escherichia coli*, possui rapidez na ação, no entanto, varia amplamente para diferentes curativos, pois alguns demonstraram uma faixa mais estreita de atividades bactericidas [66].

A ação biocida da inserção de Prata na forma de nanopartículas em matriz poliéster foi avaliada através de testes *in vitro*. Foi evidenciada uma redução do crescimento de micro-organismos do tipo *E. coli* e do tipo *S. aureus*. A presença das nanopartículas de Prata inibiu o surgimento de colônias de bactérias e a contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC's), que foi duas vezes menor na superfície onde havia as nanopartículas de Prata [14]. Para investigar o efeito das nanopartículas de Prata contra o crescimento da *Staphylococcus aureus* e da *Escherichia coli*, foram testadas diferentes concentrações e, a partir dessas mudanças, realizada a contagem das colônias de bactérias, além de mensurada a concentração mínima inibitória. Nas Figuras 3 e 4, é possível observar que essa concentração mínima inibitória das nanopartículas de Prata é de 5 ppm para a Gram-positiva *Staphylococcus aureus* e de 10 ppm para a Gram-negativa *Escherichia coli*, respectivamente. A solução de nanopartículas de Prata de 10 e 20 ppm foi suficiente para inibir todas as células viáveis de

*Staphylococcus aureus* dentro de 3,3 e 4 horas, respectivamente. Enquanto, para inibir todas as células viáveis da *Escherichia coli*, com a concentração de 10 e 20 ppm foram necessárias, respectivamente, 2,5 e 3,5 horas. Ou seja, as nanopartículas de Prata apresentam forte ação atividade antibacteriana [65].

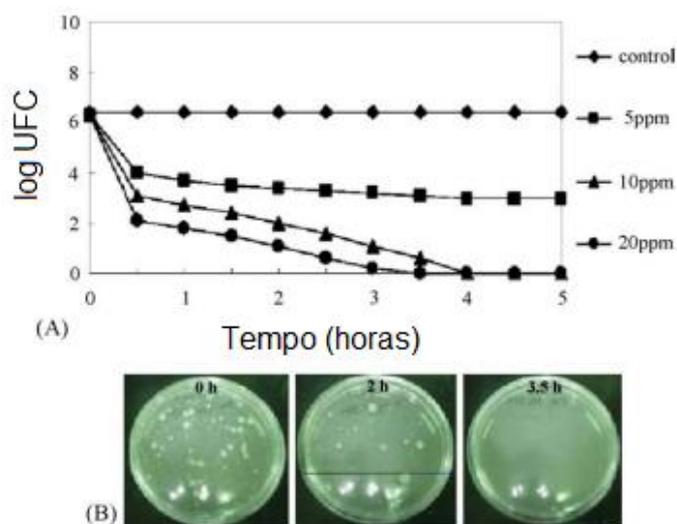


Figura 3: Curvas de inibição de crescimento de *Staphylococcus aureus* em meio LB com diferentes concentrações de solução de nanopartículas de Prata e (B) inibição de colônias após a adição de nanopartículas de Prata (10 ppm) com tempo de incubação (0;2;3,5 horas). Fonte: Cho (2005).

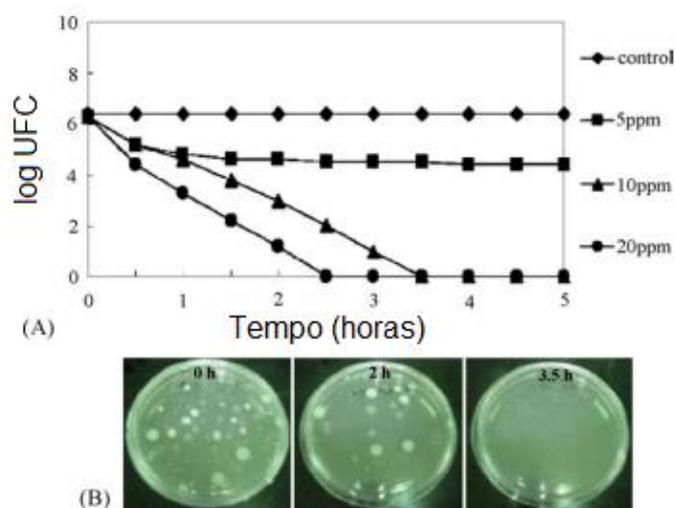


Figura 4: Curvas de inibição de crescimento de *Escherichia coli* em meio LB com diferentes concentrações de solução de nanopartículas de Prata e (B) inibição de

colônias após a adição de nanopartículas de Prata (10 ppm) com tempo de incubação (0;2;3,5 horas). Fonte: Cho (2005).

Revestimentos de Prata em cateteres tem sido proposto como uma tecnologia que pode reduzir a incidência de infecção associada ao cateter. Em cateteres de diálise peritoneal de silicone, a presença da Prata conferiu um efeito antimicrobiano tanto *in vitro* quanto em modelos de testes com animais, pelo menos em curtos períodos. No entanto, como o cateter deve durar muito tempo em uso, uma limitação de qualquer forma de revestimento de Prata pode ser seu potencial esgotamento ao longo do tempo [69-73].

Em estudo *in vitro* realizado por Kubey (1995), dois tipos de tratamentos foram utilizados para revestir segmentos de cateteres de silicone, um foi a aplicação de óxido de Prata micronizado revestido por imersão e o outro foi impregnado com Prata metálica usando um processo de deposição por feixe de íons, ambos em uma matriz de silicone. Testados durante um período de 9 meses com o objetivo de medir seu efeito antimicrobiano, mostrou uma maior eficiência na redução da viabilidade celular do revestimento obtido através da imersão, comparado ao revestimento obtido com a deposição do feixe de íons. Houve, inicialmente, uma queda com ambos os tipos de revestimento, mas após 2 meses de imersão no meio *in vitro*, foi atingido um estado estável. Por ainda possuir atividade antimicrobiana detectada após 10 meses, este resultado indicou que esses revestimentos potencialmente justificam uma avaliação clínica [67,68].

### **1.12 Ácido Polilático (PLA)**

O Ácido Polilático (PLA), com nome dado pela IUPAC de ácido 2-hidróxiopropanóico e estrutura molecular apresentada na Figura 5, é da família dos poliésteres alifáticos, termoplástico e resistentes. Uma das formas de produção se dá por síntese química do ácido láctico por meio da fermentação bacteriana do amido ou de glicose extraído do milho [91,92].

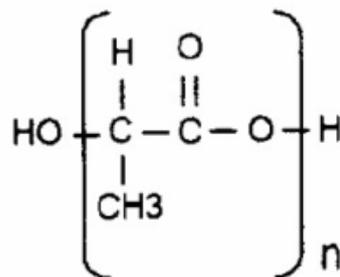


Figura 5: Estrutura molecular do PLA. Fonte: Pradella (2006).

O PLA tem sido aplicado como polímero biodegradável em diversos materiais nos últimos anos, pois tem características próximas de termoplásticos sintéticos derivados do petróleo, como o tereftalato de polietileno, conhecido como PET [91]. A principal aplicação do PLA, na atualidade, é para a produção de embalagens, representando aproximadamente 70% do uso. Outras aplicações se dão nos setores de têxteis, agricultura e eletrônicos [92].

A produção de Ácido Polilático (PLA) se destaca por ser uma opção na substituição de plásticos derivados de petróleo. Um polímero versátil, o PLA possui várias características desejáveis como transparência, brilho, resistência mecânica, resistência térmica e biodegradabilidade. No setor de engenharia, fatores como a resistência mecânica e módulo de elasticidade são características relevantes do PLA, mas vem acoplada ao baixo percentual de alongamento de ruptura e baixa tenacidade, o que acaba limitando quando sua aplicação exige uma boa deformação plástica sob alta tensão [93-95].

O PLA, um dos principais materiais utilizados na impressão 3D, além da sua popularidade, possui uma vasta opção de cores, fabricantes e grande facilidade de manuseio na impressão. Com boa resistência mecânica e menor coeficiente de expansão, suas chances de empenamento durante a impressão são bem menores [96-99].

Conhecida como manufatura aditiva, a impressão 3D é um processo que, através da deposição de uma determinada matéria prima, são fabricados objetos tridimensionais. Controladas digitalmente, camadas são sobrepostas sucessivamente até que complete o objetivo final, criação de um objeto previamente programado. Comparada com os processos de fabricação comum, a impressão 3D se destaca por sua eficiência de produção, economia, rapidez,

acessibilidade - devido às opções e preços mais acessíveis de materiais e máquinas, e versatilidade, pois tem a capacidade de criar inúmeras opções geométricas dos materiais [100-104].

Diante do aumento de microrganismos com características diversas no meio ambiente e com alta capacidade de reprodução, cresce também a necessidade de obter substâncias de controle a fim de neutralizar esses microrganismos por meio de agentes antivirais. Considerando a área de materiais, muitos estudos são desenvolvidos com nanopartículas com ação antimicrobiana, para diminuir o seu potencial de infecção. Com isso, a adição de nanopartículas de Prata ao PLA ganha destaque devido a sua alta ação antiviral, ótima biodegradabilidade, biocompatibilidade e baixa toxicidade. Por tudo isso, são utilizadas no desenvolvimento de nanomedicamentos e como opção para combater doenças virais [85,86,122].

O PLA vem sendo usado como matriz de inserção de nanopartículas de Prata em objetos diversos para obter a ação antimicrobiana. Entretanto, não há ainda nenhum resultado que garanta uma eficiência duradoura da inserção de nanopartículas de Prata no efeito biocida. O que se sabe é que a Prata é eficaz em seu controle de proliferação de bactérias, porém, pouco se sabe sobre a eficácia da duração do efeito biocida desse sistema [74-76].

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Fabricação das amostras de PLA**

Foram confeccionadas por manufatura aditiva 100 placas de PLA com as dimensões 25 x 25 x 5 mm, conforme Figura 6, através de uma impressora 3D da marca Sethi, modelo BB, com mesa de 400mm x 400mm x 400mm. Todo o processo foi realizado com PLA do mesmo lote e com parâmetros de impressão conforme Tabela 1.

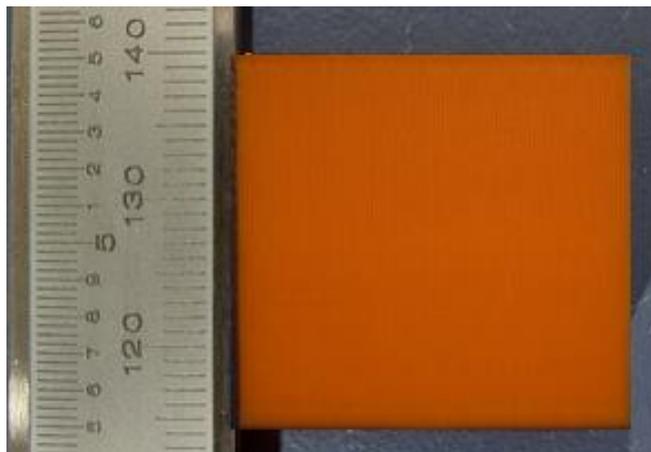


Figura 6: Placa de PLA obtida por impressão 3D. Fonte: O Autor.

|                         |         |
|-------------------------|---------|
| Velocidade de impressão | 35 mm/s |
| Temperatura             | 210°C   |
| Altura da camada        | 0,30 mm |
| Largura da linha        | 0,48 mm |
| Nº de paredes           | 2       |
| Camadas de base         | 3       |
| Camadas de topo         | 3       |

Tabela 1: Parâmetros de impressão da placa de PLA

## 2.2 Produção e composição dos selantes

A fabricação do selante se deu através da mistura de verniz da marca Revell, modelo VER 32101, e partículas sólidas de Nitrato de Prata ( $\text{AgNO}_3$ ) da marca ACS, com pureza analítica (PA), sendo sua composição 0,1 grama de partículas de Nitrato de Prata para cada 1mL de verniz. Para pesar as partículas de Nitrato de Prata, utilizou-se uma balança de precisão, marca Marte, modelo AY220 (Capacidade máxima: 220g, Mínimo: 0,01g, precisão de medida 0,0001g). Já para medir a quantidade de verniz, foi utilizada uma pipeta plástica. Na Figura 7 é possível observar o Nitrato de Prata e o verniz que, ao serem misturados manualmente, formam o selante utilizado para os testes dos efeitos biocidas.



Figura 7: a) Verniz comercial usado na fabricação do selante; b) Nitrato de Prata usado na fabricação do selante. Fonte: O Autor.

### 2.3 Aplicação do selante

O selante foi aplicado manualmente através da utilização de um pincel da marca Tigre, número 267-6, e em apenas um dos lados das superfícies das placas de PLA. O tempo de secagem foi de 24 horas. Após esse período, as misturas mostraram-se aparentemente bem aderidas, de acordo com uma inspeção visual e qualitativa. A Figura 8 mostra o aspecto de uma das amostras após o período de cura do selante sobre a placa de PLA.



Figura 8: Placa de PLA revestida com o selante na proporção de 0,1 grama de partículas de Nitrato de Prata para cada 1mL de verniz. Fonte: O Autor.

## **2.4 Caracterização da superfície da amostra**

### **2.4.1 Medidas de rugosidade**

A fim de avaliar a rugosidade das superfícies (do PLA impresso sem nada como recobrimento e recoberto apenas com verniz), foi usado o rugosímetro digital Mitutoyo da Faculdade de Engenharia Mecânica de Universidade de Estado do Rio de Janeiro, modelo SJ210, com ponta de prova com raio de 5  $\mu\text{m}$ , calibrado conforme Certificado de Calibração INSTEMAQ nº 7464/14C de 27-12-2014, equipado com *software* ST Communication Tool. Para os ensaios, foram utilizados parâmetros conforme as normas ABNT NBR ISO 4288:2008 e ABNT NBR ISO 4287:2002 [127-128].

Foram analisadas dez amostras com o PLA puro, sem nenhum revestimento, e cinco amostras revestidas com o verniz. As quinze placas foram ensaiadas duas vezes, obtendo trinta medidas diferentes, das quais quinze foram paralelas ao sentido das linhas de impressão e as outras quinze com defasagem de 90°, perpendiculares ao sentido das linhas de impressão para que pudesse ser evidenciada a anisotropia do material. Como a capacidade de medida do rugosímetro era de até 100  $\mu\text{m}$ , foram analisadas apenas as medidas das placas puras e com verniz, pois as partículas metálicas sobre a superfície estavam com dimensões fora da capacidade de medida do equipamento.

### **2.4.2 Processamento digital de imagens**

O processamento digital das imagens (PDI) foi a técnica usada para calcular a fração da superfície recoberta com o selante e que era ocupada por partículas de Nitrato de Prata (fração de área  $Aa$  % ou fração volumétrica  $Vv$  % de partículas). Este cálculo foi realizado através do *software* FIJI Image J, versão 2.0, utilizando técnicas de segmentação colorida (sistema RGB: Red-Green-Blue). Nesta análise, dez imagens da placa revestida com selante foram processadas, todas com ampliação de 3,3 vezes para que dados como média e desvio padrão fossem obtidos.

### 2.4.3 Microscopia ótica (MO), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e análise química semiquantitativa por espectroscopia por dispersão de energia (EDS)

Das superfícies das placas impressas, sem selante e recobertas com selante, foram obtidas imagens por microscopia ótica (MO) e por microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando, respectivamente, o microscópio óptico Olympus 8ZX16 e o microscópio eletrônico JEOL JSM 7100F, este último operando a 15kV em modo elétrons retroespalhados (BSE).

Para observação de aspectos referentes ao selante e de como as partículas estavam nele inseridas, diversas amostras foram submetidas à processo de fratura frágil após serem imersas em Nitrogênio líquido por tratamento de criogenia. No departamento de física da Universidade Federal Fluminense (UFF), com o apoio do Doutor Geronimo Perez, as amostras ficaram a temperatura de  $-196,15^{\circ}\text{C}$  (Figura 9) e ao serem fraturadas, suas seções transversais ficaram expostas. Através da técnica de recobrimento de íons de Cromo, as superfícies fraturadas foram recobertas com uma camada de  $2\ \mu\text{m}$  permitindo uma análise mais precisa no MEV e com melhor resolução nas imagens sem que houvesse dano à superfície do material [133].

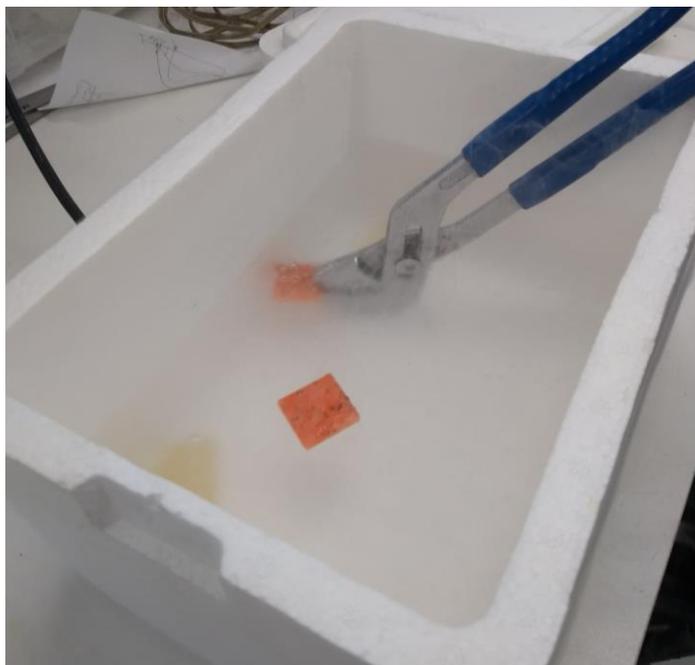


Figura 9: PLA sendo imerso em Nitrogênio líquido a uma temperatura de  $-196,15^{\circ}\text{C}$ .  
Fonte: O Autor.

Informações sobre a composição química (análise semiquantitativa) do material foram obtidas através de um detector de EDS acoplado ao MEV da Bruker, modelo X Flash MIN SVE. Os elementos químicos presentes nas superfícies das amostras foram mapeados para amostras sem recobrimento e para amostras recobertas com selante.

## 2.5 Testes *in vitro*

Os testes *in vitro* foram realizados com orientação do Doutor Marco Antonio Lemos Miguel, no laboratório de Microbiologia de Alimentos na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) para avaliar o efeito bactericida do selante proposto. Para realizar os testes, foram utilizados microrganismos armazenados a 4°C em ágar Trypticaseína de soja (TSA), da marca Kasvi - um meio rico em triptona e peptona, fontes de carboidratos, lipídeos e proteínas, elementos que contribuem para o crescimento das bactérias [27].

Foram utilizados dois tipos de bactérias, uma Gram-negativa (*Escherichia coli* ATCC 11229) e outra Gram-positiva (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923), já que ambas são muito representativas no campo dos estudos relacionados à saúde pública [124]. A Figura 10 mostra o aspecto da cultura das bactérias preparadas para serem usadas para os testes.



Figura 10: Cultura de bactérias. Fonte: O Autor.

As bactérias foram inoculadas, ou seja, a *Escherichia coli* ATCC 11229 e a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foram inseridas em um caldo de infusão de cérebro de bezerro e coração de boi (BHI) solidificado com ágar, com o

objetivo de favorecer o crescimento bacteriológico. Após as inoculações, ambas foram colocadas em uma estufa à 37°C por 18 a 24 horas, para que ocorresse o desenvolvimento das UFC's (Unidades Formadoras de Colônias), conforme Figura 11.



Figura 11: UFC's em uma placa de petri com BHI após, aproximadamente, 24 horas na estufa à 37°C. Fonte: O Autor.

Após essa etapa, as bactérias cultivadas foram colocadas com o auxílio de uma alça microbiológica em 10 mL de solução salina (0,85g/L de NaCl), esta última previamente preparada para receber estes microrganismos, até atingir a escala Mc Farland 1, utilizada para confirmar a presença de microrganismos através de turvação que varia de 0 a 10. Com concentração de  $3 \times 10^8$  UFC/mL (unidade formadora de colônias por mililitro de solução), a escala Mc Farland 1, é o padrão mais utilizado em laboratórios de microbiologia [123,124].

As superfícies a serem testadas quanto a ação bactericida foram então desinfetadas com etanol 70% (vol/vol), ficando submersas pelo período de 10 minutos. Após esta etapa, foram expostas à radiação Ultravioleta (UV) por 15 minutos. Todos os utensílios usados nos experimentos, que além da desinfecção com etanol e exposição ao UV, foram autoclavados a 121°C durante 15min, com o objetivo de fazer uma esterilização completa dos equipamentos, evitando assim contaminações.

Com testes realizados em triplicata para cada tipo de bactéria, foram inoculados 10µL da solução salina misturada com o microrganismo escolhido (um Gram negativo e um Gram positivo), na escala Mc Farland 1:

- direto na superfície das placas de PLA impressos;
- nas placas de PLA apenas recobertas com o verniz;
- nas placas recobertas com selante (verniz + Nitrato de Prata).

Estima-se que cada placa tenha sido exposta a três milhões de unidades formadoras de colônia de bactérias [123,124]. Trinta minutos após essa exposição, as placas foram submersas em 5 mL de solução salina e escovadas por um minuto para que as bactérias pudessem ser retiradas da superfície e passadas para a solução salina. Foram retirados 10  $\mu$ L desta solução e adicionados em 20 mL de BHI depositados em placas de petri, conforme Figura 12. Após realizar este procedimento para as duas estirpes de bactéria (*Escherichia coli* ATCC 11229 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) e para todas as condições de superfícies testadas (PLA puro, PLA revestido com o verniz e PLA revestido com o selante), as placas de petri foram levadas para a estufa a 37°C por 24 horas. Após esse período, as culturas foram retiradas da estufa para quantificar as colônias sobreviventes e comparar o efeito que cada superfície teve em relação à exposição dos microrganismos.



Figura 12: Placas de petri com meio de cultura BHI prontas para receberem a solução salina contaminada com as bactérias. Fonte: O Autor.

Em paralelo, com a mistura da bactéria com solução salina inicial, foi realizado um experimento no qual 10  $\mu$ L foram diluídos em 99,9 mL de solução salina e, após essa diluição, 10  $\mu$ L foram aplicados no BHI e levados para a estufa a 37°C por 24 horas para crescimento bacteriológico, conforme Figura 13. Com o objetivo de reduzir a quantidade de microrganismos para

aproximadamente 1000 UFC's e facilitar na contagem do inóculo inicial. A Figura 14 mostra um fluxograma das etapas realizadas durante os testes *in vitro*.

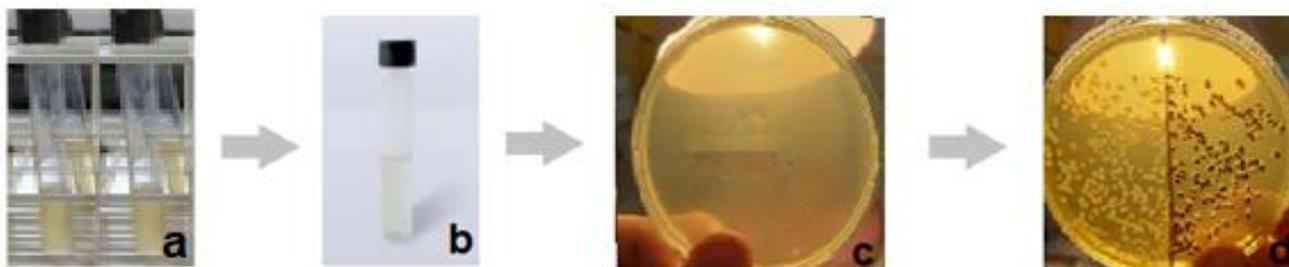


Figura 13: a) Solução salina contaminada com bactéria na escala McFarland 1; b) Diluição de 100x; c) Transferência de 10 µL da solução diluída no BHI; d) Contagem do inóculo inicial. Fonte: O Autor.

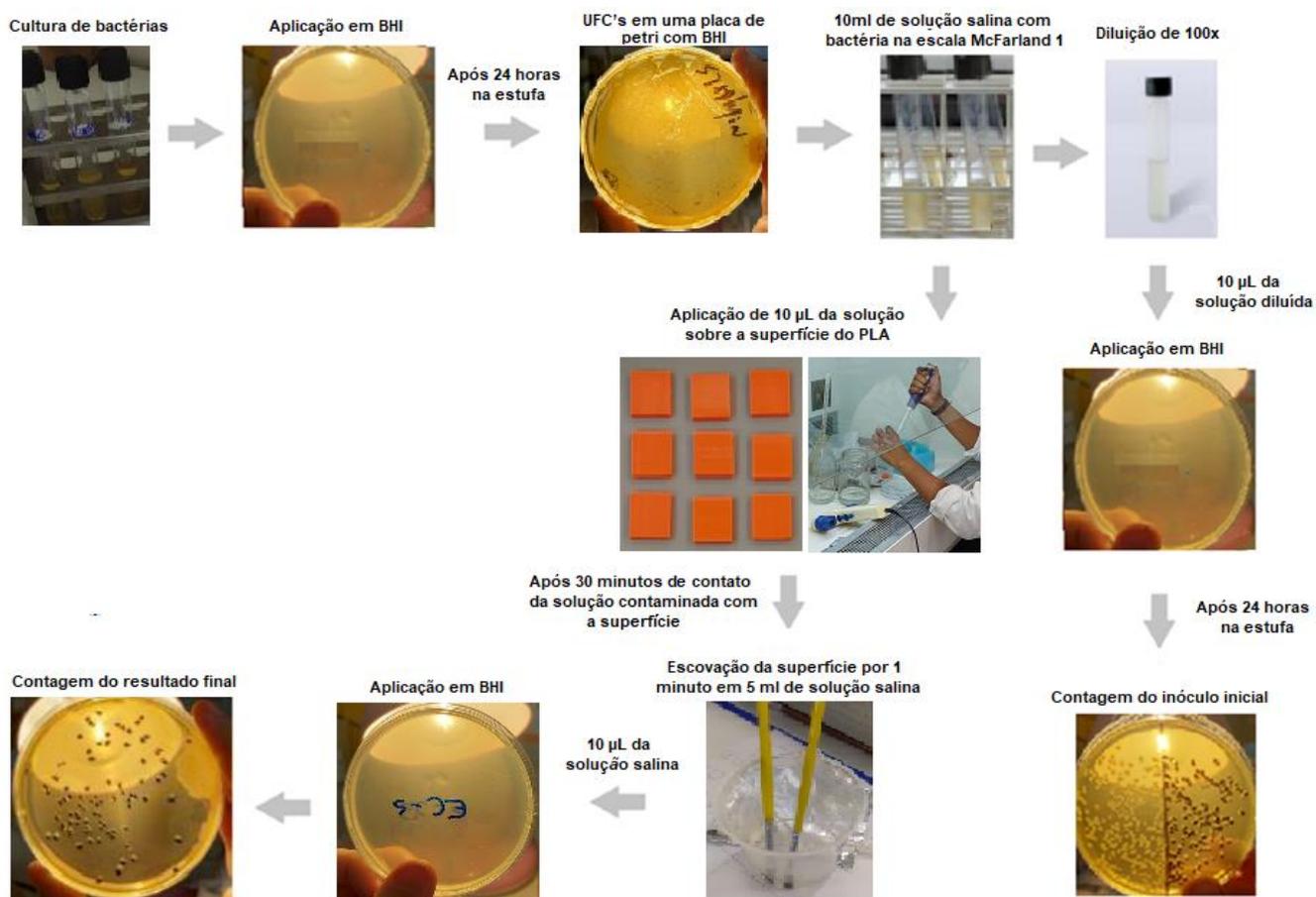


Figura 14: Fluxograma dos testes *in vitro*. Fonte: O Autor.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.1 Rugosidade das superfícies do PLA

A Tabela 2 mostra os valores obtidos das medidas de rugosidade média (Ra) das dez amostras da placa de PLA sem nenhum revestimento. Essas medidas foram obtidas paralelamente e perpendicularmente à direção de impressão com médias 6,582  $\mu\text{m}$  e 22,508  $\mu\text{m}$  e desvios padrão de 1,087  $\mu\text{m}$  e 1,197  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Na Tabela 3 podemos observar os valores obtidos das medidas de rugosidade média (Ra) das cinco amostras da placa de PLA revestidas com verniz. Essas medidas foram obtidas paralelamente e perpendicularmente à direção de impressão com médias 4,362 e 18,102  $\mu\text{m}$  e desvios padrão de 0,813 e 0,672  $\mu\text{m}$ , respectivamente.

| Medidas de Rugosidade Média<br>Placa de PLA puro (sem revestimento) |  |   |
|---|--|---|
| Amostras  | Perpendicular à<br>direção de<br>impressão ( $\mu\text{m}$ ) | Paralela à<br>direção de<br>impressão ( $\mu\text{m}$ ) |
| 1   | 23,229   | 7,284   |
| 2   | 22,928   | 7,495   |
| 3   | 22,853   | 5,686   |
| 4   | 22,545   | 5,532   |
| 5   | 22,286   | 5,469   |
| 6   | 23,690   | 6,614   |
| 7   | 22,501   | 8,651   |
| 8   | 23,036   | 6,05  |
| 9   | 22,915   | 5,345   |
| 10  | 19,098   | 7,698   |
| Média   | 22,508   | 6,582   |
| Desvio padrão   | 1,197  | 1,087   |

Tabela 2: Quadro com a rugosidade média (Ra) da placa de PLA sem revestimento.

Fonte: O Autor.

| Medidas de Rugosidade Média<br>Placa de PLA revestido com verniz |  |   |
|--|--|---|
| Amostras   | Perpendicular à<br>direção de<br>impressão ( $\mu\text{m}$ ) | Paralela à<br>direção de<br>impressão ( $\mu\text{m}$ ) |
| 1  | 18,327   | 3,639   |
| 2  | 17,571   | 4,907   |
| 3  | 17,081   | 5,687   |
| 4  | 18,722   | 3,987   |
| 5  | 18,808   | 3,592   |
| Média  | 18,102   | 4,362   |
| Desvio padrão  | 0,672  | 0,813   |

Tabela 3: Quadro com a rugosidade média (Ra) da placa de PLA revestida com verniz.  
Fonte: O Autor.

As Figuras 15, 16, 17 e 18 mostram os perfis de rugosidade obtidos para as amostras de PLA com e sem revestimento, onde os resultados mostraram uma forte anisotropia em ambos os casos. Os valores da rugosidade média quando obtidos nas duas direções com defasagem de  $90^\circ$ , apresentaram valores aproximadamente três vezes maior quando medidos perpendicularmente à direção de impressão e isso se deu por conta do processo de fabricação, a impressão 3D. Este tipo de processo possui uma direção preferencial para deposição do material, conhecida como linhas de impressão. Esta característica do processo de fabricação se refletiu nos resultados das rugosidades tanto das placas de PLA puro quanto das placas recobertas apenas com verniz [129].

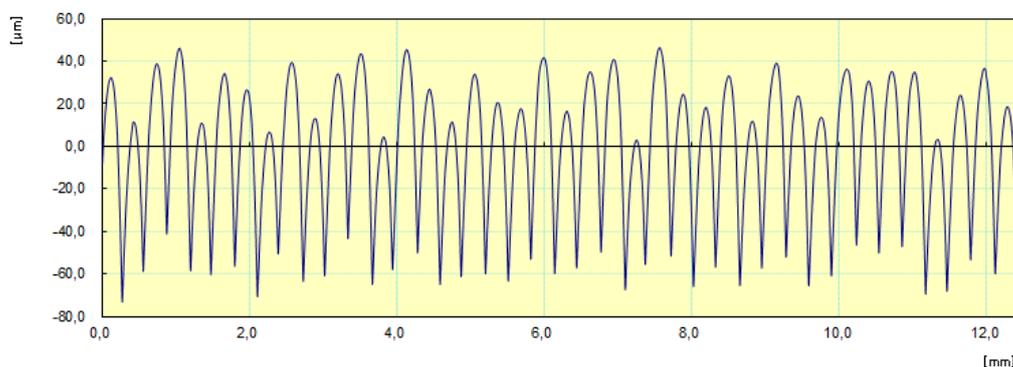


Figura 15: Perfil de rugosidade da amostra 1 do PLA puro (sem revestimento) - perpendicular à direção de impressão. Fonte: O Autor.

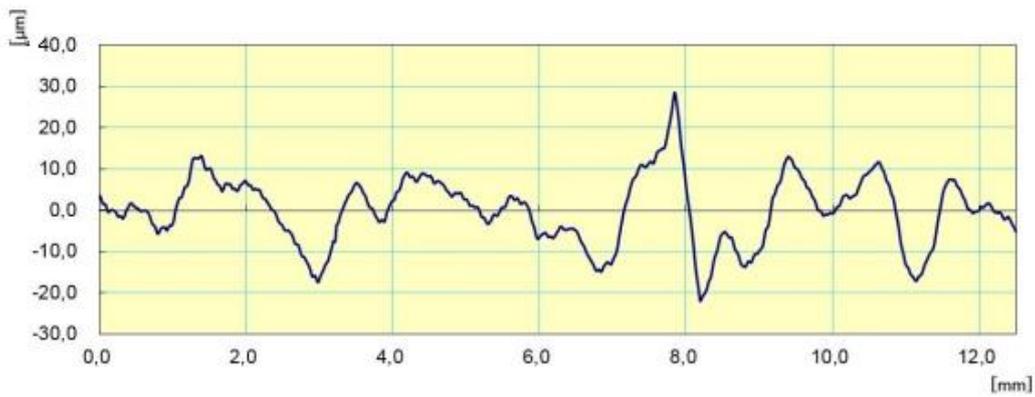


Figura 16: Perfil de rugosidade da amostra 1 do PLA puro (sem revestimento) - paralela à direção de impressão. Fonte: O Autor.

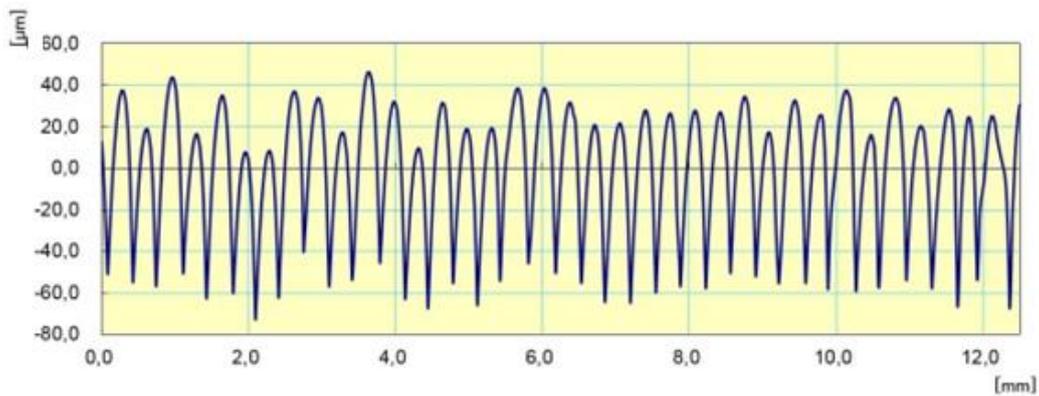


Figura 17: Perfil de rugosidade da amostra 2 do PLA revestido com verniz - perpendicular à direção de impressão. Fonte: O Autor.

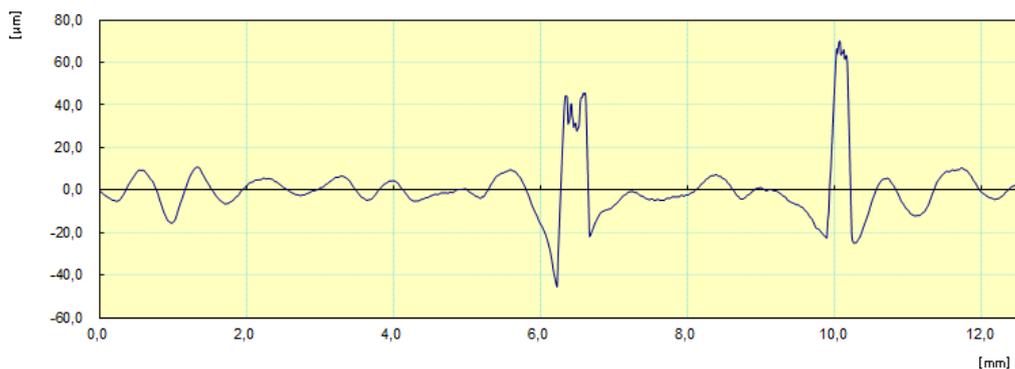


Figura 18: Perfil de rugosidade da amostra 1 do PLA revestido com verniz - paralelo à direção de impressão. Fonte: O Autor.

Quando comparadas as medidas do PLA puro e do PLA revestido com verniz foi possível observar uma redução na rugosidade da placa com o revestimento de aproximadamente 19,6% e 33,7%, nas direções perpendicular

e paralela às linhas de deposição, respectivamente. Este resultado mostrou que o verniz, ao ser aplicado na superfície do PLA, preencheu as cavidades e suavizou a rugosidade superficial do material.

### 3.2 Microscopia ótica (MO)

As Figuras 19 e 20 mostram os aspectos obtidos por MO da superfície do PLA com a presença do selante. Com diferentes magnificações, as imagens obtidas através do microscópio ótico evidenciaram as ranhuras e cavidades do PLA, consequência do seu processo de fabricação. As partículas de Nitrato de Prata (transparentes) aderidas na superfície do PLA apresentavam-se em tamanhos variados e aderidas umas às outras formando “clusters” distribuídos de modo randômico.

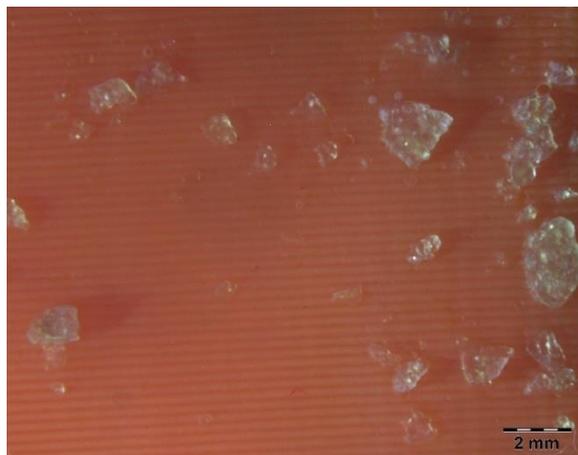


Figura 19: Imagem obtida através do microscópio ótico, com lente objetiva de 20x, evidenciando as partículas de Nitrato de Prata após a aplicação do selante.

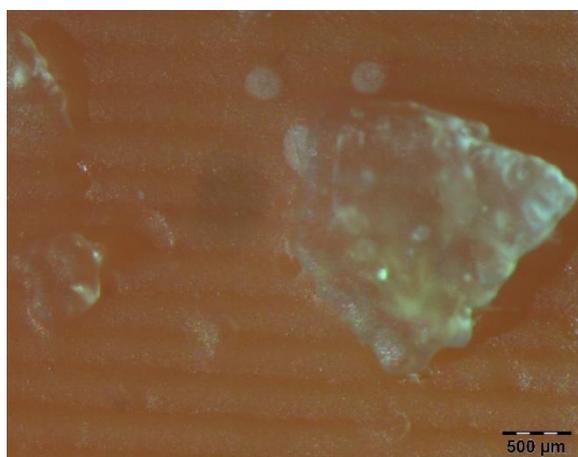


Figura 20: Imagem obtida através do microscópio ótico, com lente objetiva de 80x, evidenciando as partículas de Nitrato de Prata após a aplicação do selante.

### 3.3 Processamento digital de imagens (PDI)

O processamento digital de imagens, através da técnica de estereologia quantitativa, evidenciou que a porcentagem média da área recoberta e da fração volumétrica é de 12%, ou seja, a partir das dez imagens processadas concluiu-se que 12% da área superficial analisada correspondia às partículas metálicas adicionadas durante a aplicação manual do selante composto pelo verniz e as partículas sólidas de Nitrato de Prata. Nas Figuras 21 e 22 é possível observar uma das imagens utilizada para o processamento digital e o resultado obtido através do software, respectivamente.



Figura 21: Imagem usada para o processamento digital com ampliação de 3,3 vezes. Fonte: O Autor.

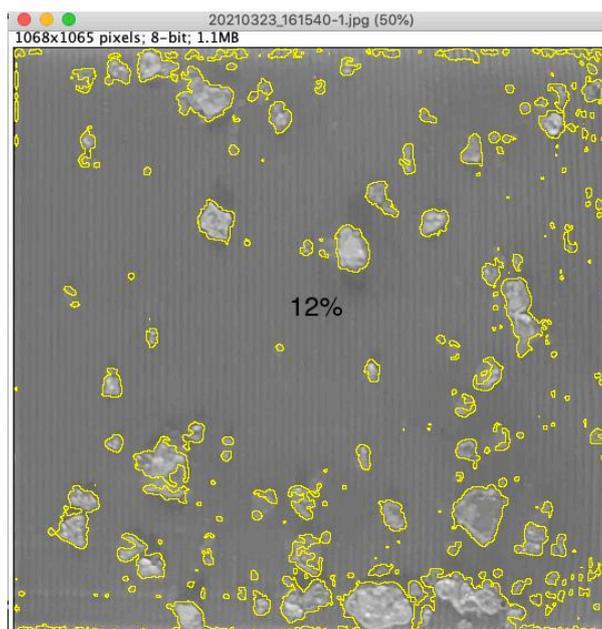


Figura 22: Porcentagem de área ocupada pelos clusters de Nitrato de Prata obtida através do PDI. Fonte: O Autor.

### 3.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A Figura 23 foi obtida através do MEV e, assim como as imagens de microscopia ótica, evidenciou as ranhuras e os *clusters* de Prata na superfície do PLA. Por operar através da técnica de elétrons retroespalhados, o MEV permite que diferenças no relevo e diferenças na composição química dos elementos e fases presentes sejam evidenciadas através de uma escala de cinza [132]. Os resultados mostraram as pequenas diferenças nas tonalidades de cinza características da presença do relevo e dos “clusters” de partículas de Nitrato de Prata. Outro ponto importante, é que a tonalidade de cinza de toda a superfície, tirando a parte que há alguma diferença no relevo, permaneceu a mesma indicando que possuía o mesmo composto químico por toda a superfície e que as partículas de Prata estavam totalmente encapsuladas pelo verniz.

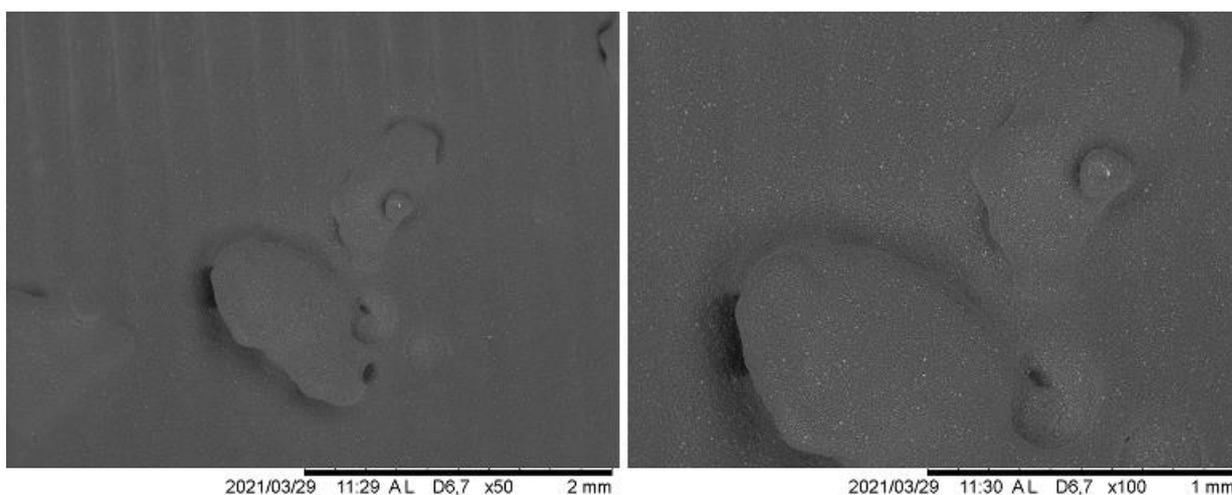


Figura 23: Imagem obtidas através do MEV. Fonte: O Autor.

Para conservar e analisar a seção transversal sem que ocorresse alteração ou deformação em decorrência do corte, as amostras foram submetidas ao endurecimento ou congelamento rápido a partir da imersão em nitrogênio líquido permitindo que as mesmas pudessem sofrer uma fratura frágil sem modificar a microestrutura da seção transversal [53]. Após essa fratura, foi possível analisar a seção transversal do selante, conforme Figura 24, e observar a presença de microporos na camada do selante.

Vale ressaltar que, de acordo com a Figura 25, também foram encontradas regiões vazias no substrato do material decorrente da deposição de camadas na

fabricação do PLA [64]. Já na Figura 26 foi possível observar os microporos na superfície do material e junto com as regiões vazias na seção transversal.

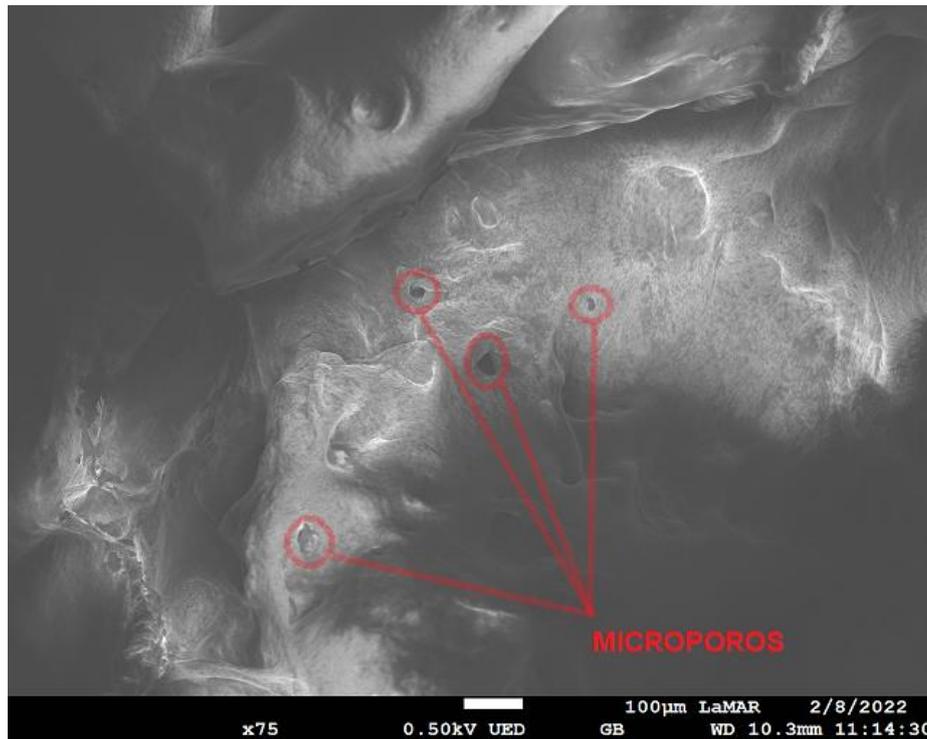


Figura 24: Microporos da seção transversal do selante. Fonte: O Autor

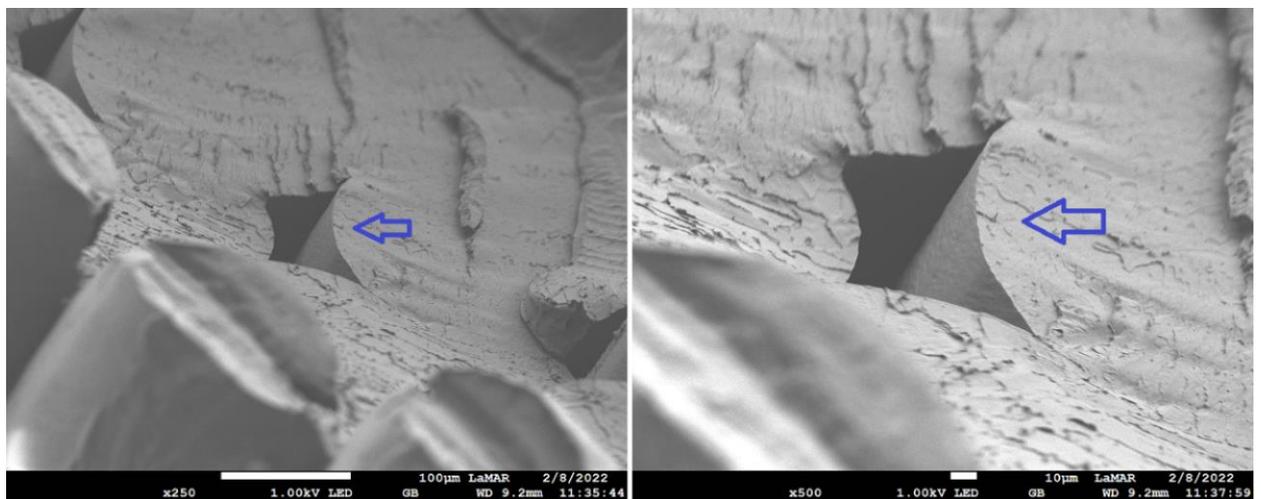


Figura 25: Região vazia encontrada na seção transversal o PLA. Fonte: O Autor.



Figura 26: Imagem obtida através do MEV com a região dos microporos e dos vazios.  
Fonte: O Autor.

### 3.5 Análise química semiquantitativa por espectroscopia por dispersão de energia (EDS) das superfícies revestidas com o selante

Os espectros de energias características obtidos pela técnica de EDS mostraram uma quantidade significativa de Carbono e Silício, o que já era esperado, visto que são elementos presentes na composição do verniz utilizado no selante. Porém o fato de não ter sido encontrada a presença da Prata, um elemento de fácil identificação por possuir maior peso atômico quando comparado ao Carbono e Silício, evidencia, mais uma vez, que as partículas metálicas estavam encapsuladas e, além disso, a espessura de verniz que revestia as partículas de Prata era maior do que a camada limite de detecção do equipamento [130; 131]. A Figura 27 apresenta uma região da superfície revestida com selante submetida à microanálise química e seu respectivo espectro de energias de elementos químicos obtidos. Apenas os picos característicos de Carbono e Silício foram identificados e estão associados ao verniz.

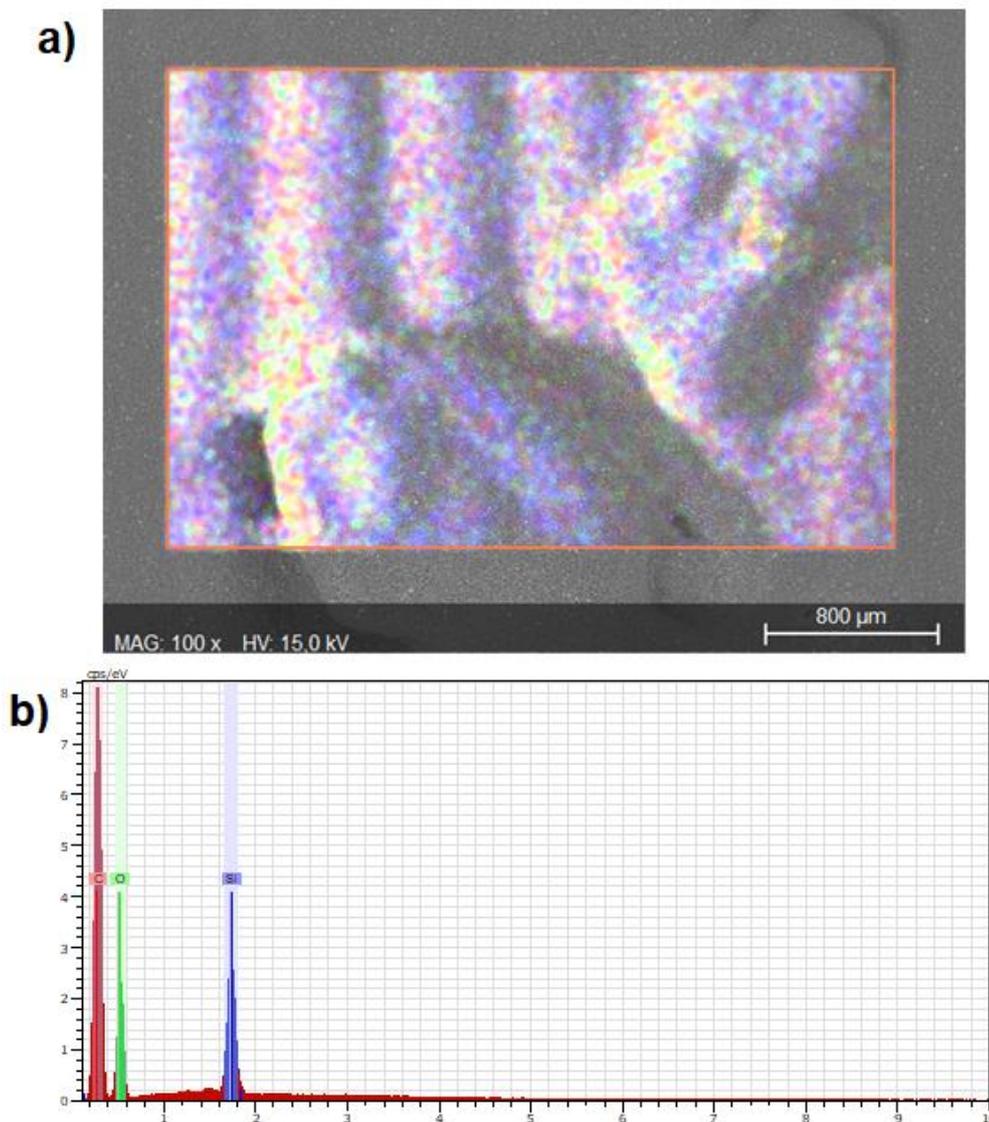


Figura 27:a) Região analisada; b) Espectro de energias características obtidos para o material analisado. Fonte: O Autor.

### 3.6 Testes *in vitro*

Nos Gráficos 1 e 2 foi possível observar o efeito biocida do selante (verniz + Nitrato de Prata) em relação à *Escherichia coli* ATCC 11229 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Os gráficos apresentam a quantidade do inóculo inicial que foi adicionado à placa de petri e a quantidade que foi recuperada após a escovação para que pudessem ser comparados. Em relação à *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 é possível ver um número 64x menor quando comparadas as quantidades das bactérias recuperadas após a escovação da placa pura e da placa com selante. Já com a *Escherichia coli* ATCC 11229 foi possível observar uma redução total dos microrganismos.

Placas recobertas apenas com verniz também foram utilizadas nos experimentos e expostas às bactérias para comprovar que o mesmo não possuía efeito biocida. Essa ineficiência ficou comprovada a partir dos resultados obtidos, pois em ambos os casos a quantidade recuperada das placas pura e com verniz foram próximas, com destaque para o caso da *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, que foram recuperados 5.300 e 5.200 UFC's, respectivamente.

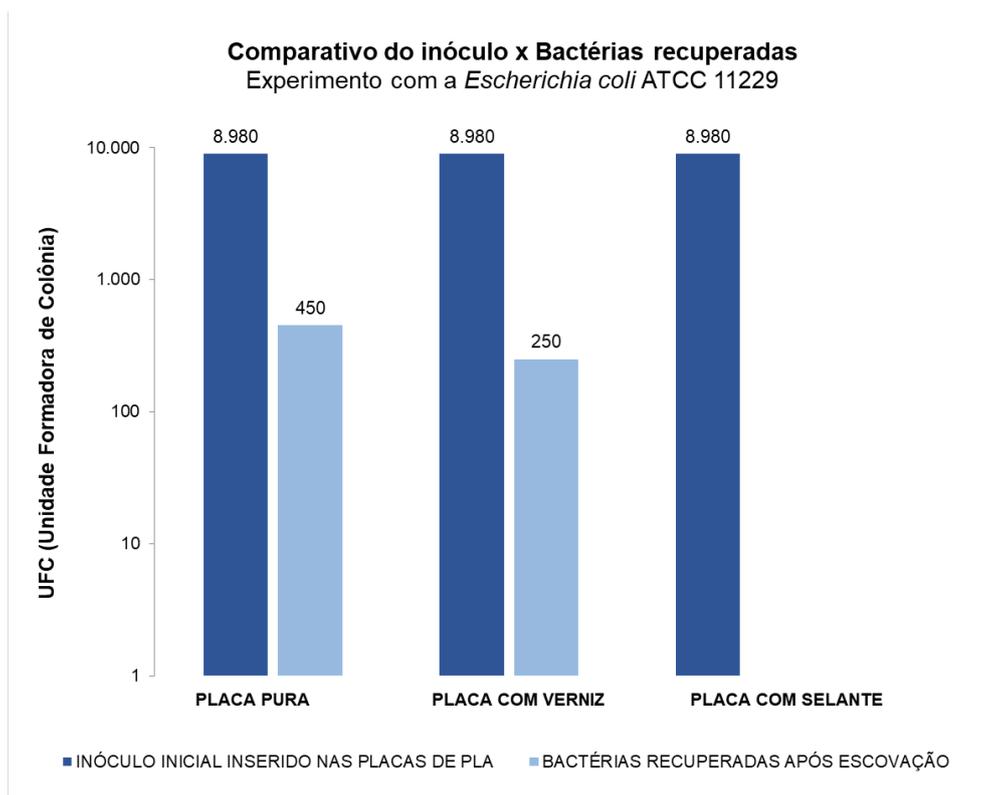


Gráfico 1: Comparativo entre o inóculo da *Escherichia coli* ATCC 11229 e das bactérias recuperadas nas placas pura, com verniz e com selante. Fonte: O Autor

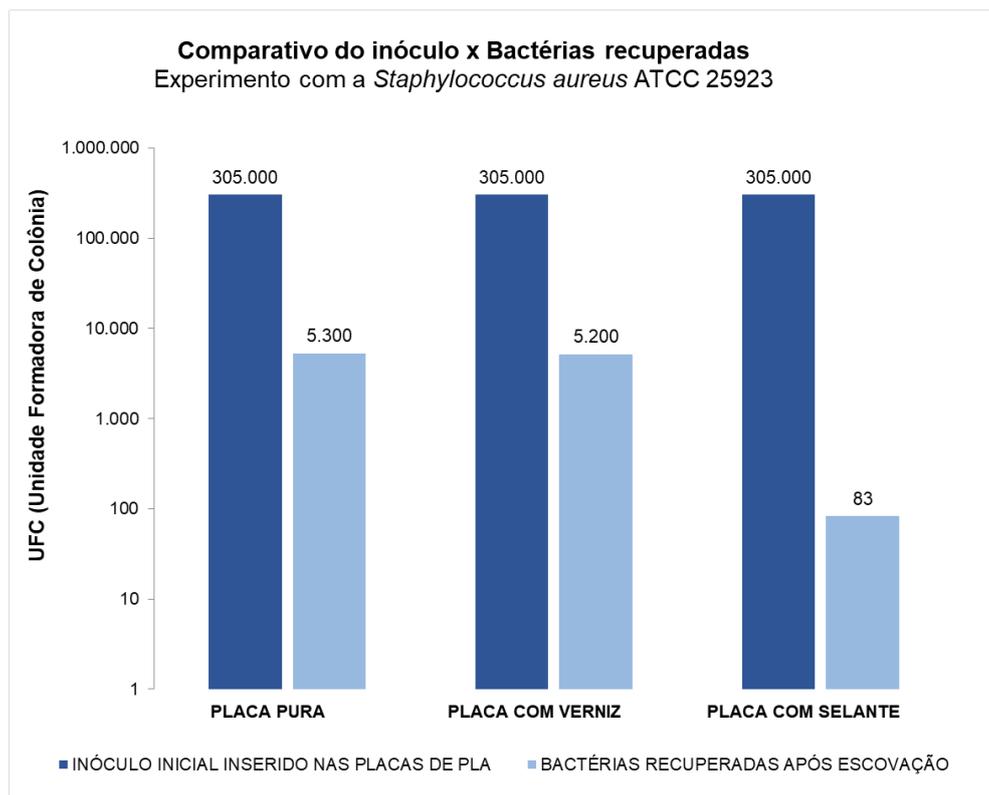


Gráfico 2: Comparativo entre o inóculo da *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e das bactérias recuperadas nas placas pura, com verniz e com selante. Fonte: O Autor

A diferença de acabamento superficial observado nas análises de rugosidade não teve nenhum efeito no resultado dos testes bactericidas, pois foi possível observar que a recuperação das bactérias, após a escovação da placa pura e da placa com verniz, se manteve a mesma. Já o efeito biocida foi explicado com presença dos microporos observados durante a análise do MEV. Esses microporos podem funcionar como um canal com o ambiente externo, com isso, mesmo que os *clusters* pareçam encapsulados, é possível que esse seja o meio de contato com o ambiente e, automaticamente, o meio pelo qual a Prata entra em contato com as bactérias.

#### 4 CONCLUSÃO

Através das técnicas de análise e caracterização utilizadas, pôde-se concluir que a superfície do PLA possui característica anisotrópica, devido ao processo de fabricação por impressão 3d, que ao ser recoberta com o selante tem seu efeito de rugosidade superficial amenizado. Com 12% da área superficial ocupada pelas partículas metálicas do Nitrato de Prata, não foi possível detectar a presença desse elemento no EDS pois elas ficaram revestidas pelo verniz. Na análise transversal foi observada a presença de microporos no interior do selante que serviram como um caminho aberto para que os aglomerados de Prata entrassem em contato com o meio externo, possibilitando seu efeito biocida.

Em comparação ao crescimento bacteriológico da superfície sem o selante, foi possível observar uma redução mínima de 64x no número de bactérias inoculadas inicialmente nas superfícies revestidas pelo selante em apenas 30 minutos de contato. Com isso, foi possível concluir que houve uma ação bactericida eficaz quando as bactérias testadas, *Escherichia coli* ATCC 11229 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, entraram em contato com o agente bactericida.

## 5 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para os trabalhos futuros sugere-se que sejam consideradas outras estirpes de bactérias para realização dos testes *in vitro*, com o objetivo de analisar a diversidade da ação do selante.

Também se sugere que seja avaliada através de testes *in vitro* a atividade antimicrobiana após limpezas da superfície recoberta com o selante, criando uma relação entre efetividade e quantidade ou tipos de limpezas.

Outra sugestão é variar o tempo de exposição das bactérias aos selantes, estabelecendo uma relação entre efetividade e tempo de exposição.

Considerar a fabricação das placas de PLA com partículas ou nanopartículas de Prata.

Para a fabricação do selante, sugere-se estudar maneiras de cominuir as partículas de Nitrato de Prata e medir sua granulometria, assim como melhorar a dispersão do Nitrato de Prata na superfície das amostras.

## REFERÊNCIAS

- [1] NELSON, Kenrad E.; WILLIAMS, Carolyn M. Infectious Disease Epidemiology: theory and practice. 3ª ed. Jones and Bartlett Publishers, 2014.
- [2] FRAILE, Manuel R.; PRIETO, José P.; MARÍ, José M. N. Microbiología em ciências de la salud, Elsevier España, 2011.
- [3] SOUZA, Isabelle P. S.; FRANCISCO, Kellen D.; GAMA, Deborah M.; SOUZA, Juliana G.; MOREIRA, Jane P.; GAMA, Leonardo M. Fatores que contribuem para o desenvolvimento de bactérias resistentes em unidades de terapia intensiva. Revista de trabalhos acadêmicos - universo campos dos goytacazes, n11 (2018).
- [4] VALERO, Patricia L. Materiales inorgánicos nanoestructurados basados en plata: aplicaciones bactericidas. Repositório da Universidade de Zaragoza, 2013.
- [5] MARTINS, Cláudia R. F.; FERREIRA, José A. P. S.; SIQUEIRA, Luiz F. G.; FERREIRA, Luís A. P.; BAZZO, Maria L.; FRANCHINI, Miriam F.; BERRO, Jorge o.; VALLE, Sílvio. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde Programa Nacional de DST e Aids. Técnica de Coloração de GRAM. Brasília, 2001.
- [6] FILHO, Alonso A. M.; OLIVEIRA, Vandenise K. Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas: o que são? Como é a técnica de Gram? Quais as vantagens de diferenciar as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas? ABCMED, 2014.
- [7] UJVARI, Stefan C. The History of the Dissemination of Microorganisms. Estudos avançados 22 (64).
- [8] TURRINI, Ruth N. T. Infecção hospitalar e mortalidade. Rev Esc Enferm USP 2002; 36(2): 177-83;
- [9] HOYASHI, Clarice M. T.; SILVA, Paôla S.; SILVA, Renata M.; SILVA, Talita R. Prevenção e controle de infecções relacionadas a assistência à saúde: fatores extrínsecos ao paciente. HU Revista, Juiz de Fora, v. 43, n. 3, p. 277-283, jul./set. 2017.
- [10] ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. PROGRAMA NACIONAL DE PREVENÇÃO E CONTROLE DE INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE (PNPCIRAS), 2021 a 2025.
- [11] OMS. Organização mundial da Saúde. [https://www.who.int/health-topics/hospitals#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/hospitals#tab=tab_1). Acesso em 03/10/2021.
- [12] SANTOS, Neusa Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. Texto Contexto Enferm 2; 13(n.esp):64-70, 2004.

- [13] OMS. Organização mundial da Saúde. [https://www.who.int/health-topics/infection-prevention-and-control#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/infection-prevention-and-control#tab=tab_1). Acesso em 03/10/2021.
- [14] UMAÑA, Fabio F. Estudio de la eficacia bactericida y bacteriostática de productos químicos embebidos en materiales. Tese de doutorado da Universidade Autônoma de Barcelona, 2014.
- [15] MENDES, Elton. MENDES, Erlon. SAVI, G.D.; ANGIOLETTO, E.; RIELLA, H.G.; FIORI, M. A. High performance bactericidal glass: evaluation of the particle size and silver nitrate concentration effect in ionic exchange process. *Cerâmica* 64 (2018) 156-165, 2018.
- [16] SIMMONS, Julie. Antimicrobial additive systems see increased use in polymers. *Plastics, Additives and Compounding*, v. 3, n. 12, p. 16-18, 2001.
- [17] REGÍ, María V. Biomateriales para sustitución y reparación de tejidos. Asociación Española de Científicos, 2004.
- [18] WILLIAMS, David F. On the nature of biomaterials. *Biomaterials*, v. 30, n. 30, p. 5897-5909, 2009.
- [19] SIFRI, Costi D.; BURKE, Gene H.; ENFIELD, Kyle B. Reduced health care-associated infections in an acute care community hospital using a combination of self-disinfecting copper-impregnated composite hard surfaces and linens. *American Journal of Infection Control*, v. 44, n. 12, p. 1565-1571, 2016.
- [20] KREYLING, Wolfgang G.; SEMMLER-BEHNKE, Manuela; CHAUDHRY, Qasim. A complementary definition of nanomaterial. *Nano today*, v. 5, n. 3, p. 165-168, 2010.
- [21] NSTC, The National Nanotechnology Initiative. Executive Office of the President of the United States. Strategic Plan., 2007.
- [22] SANCHEZ, Florence; SOBOLEV, Konstantin. Nanotechnology in concrete—a review. *Construction and building materials*, v. 24, n. 11, p. 2060-2071, 2010.
- [23] DALLAS, Panagiotis; SHARMA, Virender K.; ZBORIL, Radek. Silver polymeric nanocomposites as advanced antimicrobial agents: classification, synthetic paths, applications, and perspectives. *Advances in colloid and interface science*, v. 166, n. 1-2, p. 119-135, 2011.
- [24] KLASSEN, H. J. Historical review of the use of silver in the treatment of burns. I. Early uses. *Burns*, v. 26, n. 2, p. 117-130, 2000.
- [25] CHERNOUSOVA, Svitlana; EPPLE, Matthias. Silver as antibacterial agent: ion, nanoparticle, and metal. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 52, n. 6, p. 1636-1653, 2013.
- [26] ALEXANDER, J. W. History of the medical use of silver. *Surgical infections*, v. 10, n. 3, p. 289-292, 2009.

- [27] MORTON, R. D. Aerobic plate count. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. p. 63-67.
- [28] MOYER, Carl A.; BRENTANO, L.; GRAVENS, D. L.; MARGRAF, H. W.; MONAFO, W. W. Treatment of large human burns with 0.5% silver nitrate solution. *Archives of surgery*, v. 90, n. 6, p. 812-867, 1965.
- [29] FEODOROV, N. A.; SKURKOVITH, S. V.; FREEMAN, V. T.; MUZICHENKA, A. P. *Pathological Physiology and Experimental Therapy*. Medgiz (Russian), v. 6, p. 53, 1959.
- [30] KLASSEN, H. J. A historical review of the use of silver in the treatment of burns. I. Early uses. *Burns*, v. 26, n. 2, p. 117-130, 2000.
- [31] KLASSEN, H. J. A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. *Burns*, v. 26, n. 2, p. 131-138, 2000.
- [32] CHOPRA, Ian. The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern? *Journal of antimicrobial Chemotherapy*, v. 59, n. 4, p. 587-590, 2007.
- [33] PERCIVAL, Steven L.; BOWLER, P. G.; RUSSELL, D. Bacterial resistance to silver in wound care. *Journal of hospital infection*, v. 60, n. 1, p. 1-7, 2005.
- [34] GEMMELL, C. G.; EDWARDS, D. I., Fraise, A. P.; GOULD, F. K.; RIDGWAY, G. L.; WARREN, R. E. Guidelines for the prophylaxis and treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections in the UK. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, v. 57, n. 4, p. 589-608, 2006.
- [35] MAPLE, P. A. C.; HAMILTON-MILLER, J. M. T.; BRUMFITT, W. Comparison of the in-vitro activities of the topical antimicrobials azelaic acid, nitrofurazone, silver sulphadiazine and mupirocin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, v. 29, n. 6, p. 661-668, 1992.
- [36] VASEASHTA, A.; DIMOVA-MALINOVSKA, D. Nanostructured and nanoscale devices, sensors and detectors. *Science and Technology of Advanced Materials*, v. 6, n. 3-4, p. 312-318, 2005.
- [37] COMINI, Elisabetta. Metal oxide nano-crystals for gas sensing. *Analytica chimica acta*, v. 568, n. 1-2, p. 28-40, 2006.
- [38] RAVEH, A.; ZUKERMAN, I.; SHNECK, R.; AVNI, R.; FRIED, I. Thermal stability of nanostructured superhard coatings: a review. *Surface and Coatings Technology*, v. 201, n. 13, p. 6136-6142, 2000.
- [39] KIDAMBI, Srividhya; BRUENING, Merlin L. Multilayered polyelectrolyte films containing palladium nanoparticles: synthesis, characterization, and application in selective hydrogenation. *Chemistry of materials*, v. 17, n. 2, p. 301-307, 2005.

- [40] CHALOUPKA, Karla; MALAM, Yogeshkumar; SEIFALIAN, Alexander M. Nanosilver as a new generation of nanoproduct in biomedical applications. *Trends in biotechnology*, v. 28, n. 11, p. 580-588, 2010.
- [41] NOWACK, Bernd; KRUG, Harald F.; HEIGHT, Murray. 120 years of nanosilver history: implications for policy makers. *Sci. Technol*, v. 45, 1177, 2011.
- [42] SMITH, Andrew M.; DUAN, H.; RHYNER, M. N.; RUAN, G.; NIE, S. A systematic examination of surface coatings on the optical and chemical properties of semiconductor quantum dots. *Physical Chemistry Chemical Physics*, v. 8, n. 33, p. 3895-3903, 2006.
- [43] SONDI, Ivan; SALOPEK-SONDI, Branka. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of colloid and interface science*, v. 275, n. 1, p. 177-182, 2004.
- [44] GUZMÁN, Maribel G.; DILLE, Jean; GODET, Stephan. Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method and their antibacterial activity. *Int J Chem Biomol Eng*, v. 2, n. 3, p. 104-111, 2009.
- [45] Roldán M.V., Frattini A.L., Sanctis O.A., Pellegrini N.S. Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method. *Anales AFA* 17, 212-217, 2005.
- [46] YIN, H.; YAMAMOTO, T.; WADA, Y.; YANAGIDA, S. Large-scale and size-controlled synthesis of silver nanoparticles under microwave irradiation. *Materials chemistry and Physics*, v. 83, n. 1, p. 66-70, 2004.
- [47] ZHU, Zhendong; KAI, Luo; WANG, Yuechuan. Synthesis and applications of hyperbranched polyesters—preparation and characterization of crystalline silver nanoparticles. *Materials Chemistry and Physics*, v. 96, n. 2-3, p. 447-453, 2006.
- [48] FECHT, H. J.; EDLESTEIN, A. S.; CAMMARATA, R. C. Nanomaterials: synthesis, properties and applications. *Neranga Gamage*, v. 2, p. 105-110, 1996.
- [49] MOCK, J. J.; BARBIC, M.; SMITH, D.R.; SCHULTZ, D.A.; SCHULTZ, S. Shape effects in plasmon resonance of individual colloidal silver nanoparticles. *The Journal of Chemical Physics*, v. 116, n. 15, p. 6755-6759, 2002.
- [50] PACIOS, R.; MARCILLA, R.; POZO-GONZALO, C.; POMPOSO, J. A.; GRANDE, H.; AIZPURUA, J.; MECERREYES, D. Combined electrochromic and plasmonic optical responses in conducting polymer/metal nanoparticle films. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, v. 7, n. 8, p. 2938-2941, 2007.
- [51] CHOU, Wen-Li; YU, Da-Guang; YANG, Ming-Chien. The preparation and characterization of silver-loading cellulose acetate hollow fiber membrane for water treatment. *Polymers for advanced technologies*, v. 16, n. 8, p. 600-607, 2005.

[52] PETICA, A.; GAVRILIU, S.; LUNGU, M.; BURUNTEA, N.; PANZARU, C. Colloidal silver solutions with antimicrobial properties. *Materials Science and Engineering: B*, v. 152, n. 1-3, p. 22-27, 2008.

[53] DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores. EdIPUCRS, 2007.

[54] MIRZAJANI, F.; GHASSEMPOUR, A.; ALIAHMADI, A.; ESMAEILI, M. Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *Research in microbiology*, v. 162, n. 5, p. 542-549, 2011.

[55] KALISHWARALAL, K.; BARATHMANIKANTH, S.; PANDIAN, S. R. K.; DEEPAK, V.; GURUNATHAN, S. Silver nanoparticles impede the biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 79, n. 2, p. 340-344, 2010.

[56] ISO. ISO 10993-1: 2018 Biological evaluation of medical devices— Part 1: Evaluation and testing within a risk management process. 2018.

[57] LORENZI, T.F. Atlas de Hematologia/ Clínica Hematológica Ilustrada, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 2006.

[58] FRAZIER, J. M. In vitro Toxicity testing. Applications to safety evaluation. New York, Marcel Dekker, Inc., 1992. p. 300.

[59] BEDNARCZUK, V. O.; VERDAM, M. C. S.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Testes in vitro e in vivo utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. *Visão Acadêmica*, v. 11, n. 2, 2010.

[60] SONG, J.; JIN, P.; LI, M.; LIU, J.; WU, D.; YAO, H.; WANG, J. Antibacterial properties and biocompatibility In Vivo and vitro of composite coating of pure magnesium ultrasonic micro-arc oxidation phytic acid copper loaded. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 30, n. 5, p. 49, 2019.

[61] ZHUANG, Y.; ZHANG, S.; YANG, K.; REN, L.; DAI, K. Antibacterial activity of copper-bearing 316L stainless steel for the prevention of implant-related infection. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v. 108, n. 2, p. 484-495, 2020.

[62] JAIN, J.; ARORA, S.; RAJWADE, J. M.; OMRAY, P.; KHANDELWAAL, S.; PAKNIKAR, K. M. Silver nanoparticles in therapeutics: development of an antimicrobial gel formulation for topical use. *Molecular pharmaceutics*, v. 6, n. 5, p. 1388-1401, 2009.

[63] GREULICH, C.; BRAUN, D.; PEETSCH, A.; DIENDORF, J.; SIEBERS, B.; EPPLE, M.; KOLLER, M. The toxic effect of silver ions and silver nanoparticles towards bacteria and human cells occurs in the same concentration range. *RSC advances*, v. 2, n. 17, p. 6981-6987, 2012.

- [64] LOVO, J. F. Projeto e fabricação de componentes mecânicos por manufatura aditiva e estruturação interna. 2017. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- [65] CHO, K. H.; PARK, J. E.; OSAKA, T.; PARK, S. G. The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. *Electrochimica Acta*, v. 51, n. 5, p. 956-960, 2005.
- [66] IP, M.; LUI, S. L.; POON, V. K.; LUNG, I.; BURD, A. Antimicrobial activities of silver dressings: an in vitro comparison. *Journal of medical microbiology*, v. 55, n. 1, p. 59-63, 2006.
- [67] Kubey W.; LUNEBURG, P.; ERICSON, S.; BROWN, J.; HOLMES, C. J. A longitudinal in vitro antimicrobial evaluation of two silver polymer surface treatments for peritoneal dialysis catheters. In: *Advances in Peritoneal dialysis. Conference on Peritoneal Dialysis*. 1995. p. 193-196.
- [68] DASGUPTA, M. K. Silver peritoneal catheters reduce bacterial colonization. In: *Advances in Peritoneal dialysis. Conference on Peritoneal Dialysis*. 1994. p. 195-198.
- [69] WOODWARD, Richard L. Review of the bactericidal effectiveness of silver. *Journal-American Water Works Association*, v. 55, n. 7, p. 881-886, 1963.
- [70] CHAMBERS, Cecil W.; PROCTOR, Charles M.; KABLER, Paul W. Bactericidal effect of low concentrations of silver. *Journal-American Water Works Association*, v. 54, n. 2, p. 208-216, 1962.
- [71] FOX, Charles L. Silver sulfadiazine—a new topical therapy for pseudomonas in burns: therapy of pseudomonas infection in burns. *Archives of surgery*, v. 96, n. 2, p. 184-188, 1968.
- [72] JOHNSON, J. R.; ROBERTS, P.L.; OLSEN, R.J.; MOYER, K. A; STAMM, W. E. Prevention of catheter-associated urinary tract infection with a silver oxide-coated urinary catheter: clinical and microbiologic correlates. *Journal of Infectious Diseases*, v. 162, n. 5, p. 1145-1150, 1990.
- [73] MAKI, D. G.; COBB, L.; GARMAN, J. K.; SHAPIRO, J. M.; RINGER, M.; HELGERSON, R. B. An attachable silver-impregnated cuff for prevention of infection with central venous catheters: a prospective randomized multicenter trial. *The American journal of medicine*, v. 85, n. 3, p. 307-314, 1988.
- [74] ULLAH, F.; OTHMAN, M. B. H.; JAVED, F.; AHMAD, Z.; AKIL, H. M. Classification, processing and application of hydrogels: A review. *Materials Science and Engineering: C*, v. 57, p. 414-433, 2015.
- [75] ZAPATA, P. A.; TAMAYO, L.; PÁEZ, M.; CERDA, E.; AZÓCAR, I.; RABAGLIATI, F. M. Nanocomposites based on polyethylene and nanosilver particles produced by metallocenic “in situ” polymerization: synthesis,

characterization, and antimicrobial behavior. *European Polymer Journal*, v. 47, n. 8, p. 1541-1549, 2011.

[76] BUSOLO, M. A.; FERNANDEZ, P.; OCIO, M. J.; LAGARON, J. M. Novel silver-based nanoclay as an antimicrobial in polylactic acid food packaging coatings. *Food Additives and Contaminants*, v. 27, n. 11, p. 1617-1626, 2010.

[77] ISO 8501-1. Preparation of Steel Substrates Before Application of Paints and Related Products – Visual Assessment of Surface Cleanliness. 1988.

[78] JIAO, J.; LUO, Q.; WEI, X.; WANG, Y.; SHEN, J. Influence of sealing treatment on the corrosion resistance of Fe-based amorphous coatings in HCl solution. *Journal of Alloys and Compounds*, v. 714, p. 356-362, 2017.

[79] STERN, M.; GEARY, A.L. Electrochemical Polarization – A Theoretical Analysis of the Shape of Polarization Curves. *Journal of the Electrochemical Society*, v. 104, n. 1, p.56, 1957.

[80] MENEZES, D.D. Avaliação da Resistência à Corrosão de Revestimentos de Alumínio Aplicados pelas Técnicas de Arco Elétrico e Chama Convencional, em Meio Cloreto. Tese de Doutorado. COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2007.

[81] AMOUSOLTANI, N.; SALIMIJAZI, H.; GOLOZAR, M. Study of alumina sealing of HVOF thermally sprayed WC-Co coatings by sol-gel method. *Materials Research Express*, v. 7, n. 1, p. 016410, 2019.

[82] SOUTO, M. H.; DUARTE, E. R.; BRANDI, I. V. Estrutura e organização celular dos micro-organismos. *Microbiologia Básica para Ciências Agrárias*, p. 35.

[83] GOUVÊA, C. C. M. Avaliação da ação antimicrobiana do trimetafosfato de sódio associado ao fluoreto e nanopartículas de Prata, *Brazilian Oral Research*, v. 36, 2016.

[84] LOK, C. N.; HO, C. M.; CHEN, R.; HE, Q. Y.; YU, W. Y.; SUN, H.; ...; CHE, C. M. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *Journal of proteome research*, v. 5, n. 4, p. 916-924, 2006.

[85] GUZMAN, M.; DILLE, J.; GODET, S. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, And Medicine*, p. 37-45, 2012

[86] ANTUNES, F.S. Síntese, caracterização e avaliação do potencial antimicrobiano de nanopartículas de Prata em tintas e vernizes acrílicos à base d'água. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013.

[87] Mendes-Gouvea C. C.; DO AMARAL, J. G.; FERNANDES, R. A.; FERNANDES G. L.; GORUP, L. F.; CAMARGO, E. R.; ...; BARBOSA, D. B. Sodium trimetaphosphate and hexametaphosphate impregnated with silver

nanoparticles: Characteristics and antimicrobial efficacy. *Biofouling*, v. 34, n. 3, p. 299-308, 2018.

[88] MORONES, J. R.; ELECHIGUERRA, J. L.; CAMACHO, A.; RAMIREZ, J. T.; The Bacterial Effect of Silver Nanoparticles. *Nanotechnology*, v.16, p.2346-2353, 2005.

[89] MIRANDA, M.; FERNÁNDEZ, A.; DÍAZ, M.; ESTEBAN-TEJEDA, L.; LÓPEZ-ESTEBAN, S.; MALPARTIDA, F.; MOYA, J.S. Silver-hydroxyapatite nanocomposites as bactericidal and fungicidal materials. *International Journal of Material Research*, v. 101, n. 1, p. 122-127, 2010.

[90] MONTEIRO, D. R.; GORUP, L. F.; TAKAMIYA, A. S.; RUVOLLO-FILHO, A. C.; DE CAMARGO, E. R.; BARBOSA, D. B. The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 34, n. 2, p. 103-110, 2009.

[91] WANG, N.; YU, J.; CHANG, P. R.; MA, X. Influence of formamide and water on the properties of thermoplastic starch/poly (lactic acid) blends. *Carbohydrate Polymers*, v.71, p.109- 118, 2008.

[92] PRADELLA, J. G. C. Biopolímeros e Intermediários Químicos. Relatório Técnico n. 84396-205. Centro de Tecnologia de Processos e Produtos - Laboratório de Biotecnologia Industrial. São Paulo, 2006.

[93] RODRIGUES, G. D. A.; FRANCO, T.T.; CONTIERO, J.; GONÇALVES, A. R.; ROSSELL, C. E. V.; MACEDO, G. A. Produção de ácido láctico a partir do bagaço da cana de açúcar. 2012. Tese de Doutorado. Tese de Doutorado, Campinas 2012, Universidade Estadual de Campinas.

[94] NAMPOOTHIRI, K. M.; NAIR, N. R.; JOHN, R. P. An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. *Bioresource technology*, v. 101, n. 22, p. 8493-8501, 2010.

[95] RASAL, R. M.; JANORKAR, A. V.; HIRT, D. E. Poly (lactic acid) modifications. *Progress in polymer science*, v. 35, n. 3, p. 338-356, 2010.

[96] CICALA, G.; LATTERI, A.; DEL CURTO, B.; LO RUSSO, A.; RECCA, G.; FARE, S. Engineering thermoplastic for additive manufacturing: a critical perspective with experimental evidence to support functional applications. *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials*, v.15, n.1, p. 10-18, 2017.

[97] TANIKELLA, N. G.; WITTBRODT, B.; PEARCE, J. M. Tensile strength of commercial polymer materials for fused filament fabrication 3D printing. *Additive Manufacturing*, v. 15, p. 40-47, 2017.

[98] BARNATT, C. 3D printing, 2 ed., England, Explainingthefuture.com, 2014.

- [99] CASAVOLA, C.; CAZZATO, A.; MORAMARCO, V.; PAPPALETTERA, G. Residual stress measurement in Fused Deposition Modelling parts. *Polymer Testing*, v.58, p. 249-255, 2017.
- [100] SANTANA, L.; ALVES, J. L.; SABINO NETTO, A. D. C.; MERLINI, C. Estudo comparativo entre PETG e PLA para Impressão 3D através de caracterização térmica, química e mecânica. *Matéria (Rio de Janeiro)*, v. 23, 2018.
- [101] AMBROSI, A.; PUMERA, M. 3D-printing technologies for electrochemical applications. *Chemical Society Reviews*, v. 45, n.10, p. 2740-2755, 2016.
- [102] GEBHARDT, A. *Understanding additive manufacturing*. Munich, Hanser Publishers, 2011.
- [103] DAVIM, J. P., *Machining: fundamentals and recent advances*, London, Springer-Verlag, 2008.
- [104] SONG, C.; LIN, F.; BA, Z.; REN, K.; ZHOU, C.; XU, W. My smartphone knows what you print: Exploring smartphone-based side-channel attacks against 3d printers. In: *Proceedings of the 2016 ACM SIGSAC Conference on Computer and Communications Security*, p. 895-907, 2016.
- [105] RUTALA, William A. APIC guideline for selection and use of disinfectants. *American journal of infection control*, v. 24, n. 4, p. 313-342, 1996.
- [106] KOSKI, T. A.; STUART, L. S.; ORTENZIO, L. F. Comparison of chlorine, bromine, and iodine as disinfectants for swimming pool water. *Applied microbiology*, v. 14, n. 2, p. 276-279, 1966.
- [107] HUA, G.; RECKHOW, D. A. Comparison of disinfection byproduct formation from chlorine and alternative disinfectants. *Water research*, v. 41, n. 8, p. 1667-1678, 2007.
- [108] RICKETTS, R. T.; LEBHERZ III, W. B.; KLEIN, F.; GUSTAFSON, M. E.; FLICKINGER, M. C. Application, sterilization and decontamination of ultrafiltration systems for large-scale production of biologicals D. LeRoith, J. Shiloach, T.J. Leahy (Eds.), *Purification of Fermentation Products*, ACS Symposium series (ACS), Washington, DC, USA, p. 21-49, 1985.
- [109] ZUO, J. L.; CUI, F. Y.; BO, Q. U.; ZHU, G.B. Removal effect on *Mesocyclops leukarti* and mutagenicity with chlorine dioxide. *Journal of Environmental Sciences*, v. 18, n. 5, p. 891-896, 2006.
- [110] Codinep. Grupo asesor de control d infecciones y epidemiología. Argentina.
- [111] CARDOSO, C. F.; FARIA, J. D. A. F.; WALTER, E. H. M. Modeling of sporicidal effect of hydrogen peroxide in the sterilization of low density polyethylene film inoculated with *Bacillus subtilis* spores. *Food Control*, v. 22, n. 10, p. 1559-1564, 2011.

- [112] HUANG, C. F.; YAMAJI, N.; MITANI, N.; YANO, M.; NAGAMURA, Y.; MA, J.F. A Bacterial-Type ABC Transporter Is Involved in Aluminum Tolerance in Rice. *The Plant Cell*, v. 21, n. 2, p. 655-667, 2009.
- [113] SÁNCHEZ-SALDAÑA, L.; SAENZ-ANDUAGA, E. Antisépticos y desinfectantes. *Dermatología Peruana*, v. 15, n. 2, p. 82-103, 2005.
- [114] LORSCHIEDER, F. L.; VIMY, M. J.; SUMMERS, A. O. Mercury exposure from "silver" tooth fillings: emerging evidence questions a traditional dental paradigm. *The FASEB Journal*, v. 9, n. 7, p. 504-508, 1995.
- [115] BANERJEE, D.; DAS, P. K.; SINGHA, H.; BAGCHI, S. Fluorimetric study of interaction of merbromin with trypsin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 70, n. 5, p. 1109-1113, 2008.
- [116] BURKE, B. E.; PFISTER, R. M. Cadmium transport by a Cd<sup>2+</sup>-sensitive and a Cd<sup>2+</sup>-resistant strain of *Bacillus subtilis*. *Canadian journal of microbiology*, v. 32, n. 7, p. 539-542, 1986.
- [117] VERLAG, A. S. *Diagnosis and Therapy Springer - Gerlach Marine Pollution.*, p. 218, 1981.
- [118] RAHA, S.; MALLICK, R.; BASAK, S.; DUTTARROY, A. K. Is copper beneficial for COVID-19 patients?. *Medical hypotheses*, v. 142, p. 109814, 2020.
- [119] D'ARCY, Niall. Antimicrobials in plastics: a global review. *Plastics, Additives and Compounding*, v. 3, n. 12, p. 12-15, 2001.
- [120] JI, X.; LI, X.; DONG, Y.; SAMMONS, R.; TIAN, L.; YU, H.; ...; DONG, H. Synthesis and in-vitro antibacterial properties of a functionally graded Ag impregnated composite surface. *Materials Science and Engineering: C*, v. 99, p. 150-158, 2019.
- [121] LAZARY, A.; WEINBERG, I.; VATINE, J.J.; JEFIDOFF, A.; BARDENSTEIN, R.; BARHKOW, G.; OHANA, N. Reduction of healthcare-associated infections in a long-term care brain injury ward by replacing regular linens with biocidal copper oxide impregnated linens. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 24, p. 23-29, 2014.
- [122] DASARI, A.; QUIRÓS, J.; HERRERO, B.; BOLTES, K.; GARCÍA-CALVO, E.; ROSAL, R. (2012). Antifouling membranes prepared by electrospinning polylactic acid containing biocidal nanoparticles. *Journal of Membrane Science*, v. 405-406, p. 134-140, 2012.
- [123] FERRAZ, C.; ROCHA, C.; ROCHA, M. M. N. P.; MARTINS, M. D. G. A.; JACQUES, P. Contaminação de resinas compostas na prática odontológica. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada*, v. 10, n. 1, p. 73-78, 2010.

[124] LENNETTE, E.H.; HANSLER, J.R.; SHADORNY, J.H. Manual of clinical microbiology. American society for microbiology. Washington DC, 1985.

[125] SHARMA, V. K.; YNGARD, R. A.; LIN, Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. Chemistry Department, Florida Institute of Technology, 150 West University Boulevard, Melbourne, Florida 32901, USA, v. 154, P. 83 – 96, 2008.

[126] Methanogens and Nano-Silver. Disponível em: <https://methanenanosilver.weebly.com/> Acesso em 23/11/2022.

[127] ABNT, A. B. de N. T. ABNT NBR ISO 4287:2002 – ABNT Catálogo, 2002. Disponível em: <https://www.abntcatalogo.com.br/pnm.aspx?Q=UGNiYIByRDZmbWN5RzBUQW4zVmlEeGFZU2FaWjVWbGIDejdSUU9XellzWT0=>

[128] ABNT, A. B. de N. T. ABNT NBR ISO 4288:2008 – ABNT Catálogo, 2008. Disponível em: <https://www.abntcatalogo.com.br/pnm.aspx?Q=cHA2cmIXRGhpTHZLK0lvcTRnRm9oa1V5NIZxNDZkYkZMWk5vYVQ3OFFnTT0=>

[129] VOLPATO, N. Manufatura aditiva: tecnologias e aplicações da impressão 3D. Editora Blucher, 2017.

[130] ROCHA, V. S.; DINIZ, M. G.; BRANT, J.C.; PIMENTA, A. R. ; PINHEIRO, M. A. S. Fracture failure analysis of gearbox shaft. Ciência e tecnologia dos materiais, v. 24, p. 19-24, 2012.

[131] GOLDSTEIN, J.I.; NEWBURY, D. E.; ECHLIN, P.; JOY, D. C.; LYMAN, C. E.; LIFSHIN, E.; ...; MICHAEL, J. Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis; Springer, Boston, MA, 2003.

[132] DINIZ, M.G.; SOARES G.A.; M.J. COELHO. Surface topography modulates the osteogenesis in human bone marrow cell cultures grown on titanium samples prepared by a combination of mechanical and acid treatments. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, Springer, v. 13, n. 4, p. 421-432, 2002.

[133] Laboratório de microscopia eletrônica de varredura da Universidade Federal Fluminense. <https://nanomt.if.uff.br/doku.php?id=lamar>.