AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**EFEITO DA RADIAÇÃO IONIZANTE NOS REVESTIMENTOS DE CATETERES DE
POLIURETANO COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

SONIA HEILMAN

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Aplicações**

Orientador:

**Prof. Dr. LEONARDO GONDIM DE ANDRADE
E SILVA**

**São Paulo
2015**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**EFEITO DA RADIAÇÃO IONIZANTE NOS REVESTIMENTOS DE CATETERES DE
POLIURETANO COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

SONIA HEILMAN

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Aplicações**

Orientador:

**Prof. Dr. LEONARDO GONDIM DE ANDRADE
E SILVA**

Versão Corrigida
Versão Original disponível no IPEN

São Paulo
2015

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Leonardo Gondim de Andrade e Silva, pela orientação, amizade, pelo estímulo científico, pelo companheirismo, pela liberdade, confiança depositada, e oportunidade de continuar minha formação acadêmica.

Ao MSc. Salmo Cordeiro do Rosário pelo seu incentivo e motivação, bem como pela sua indicação de um orientador especial, Prof. Dr. Leonardo Gondim de Andrade e Silva.

Ao Eng. Ricardo C. Heilman que com muita sabedoria e conhecimento me encorajou a realizar este trabalho.

Ao MSc. Hiroshi Oikawa pela preciosa assessoria na correta interpretação de dados e conceitos relativos a Espectroscopia de Absorção no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).

Ao Prof. Dr. Jivaldo R. Matos do Laboratório de Análise Térmica Prof. Dr. Ivo Giolito (LATIG) pelo incentivo e contribuição durante o desenvolvimento deste trabalho, como também às alunas de Doutorado, Fabiana Andreia Schafer de Martini Soares da FCF-USP e Simone Garcia Dávila do IQUSP, pela colaboração, na execução dos ensaios de análise térmica.

Ao Grupo de Pesquisa em Química Verde e Ambiental (GPQVA) do Instituto de Química da USP, especialmente ao Dr. Renato S. Freire e Dr. Thiago L. R. Hower, pela participação fundamental neste trabalho.

A Dra. Márcia L. A. Temperini do Laboratório de Espectroscopia Molecular do Instituto de Química da USP, LEM, especialmente a Dra. Michele L. de Souza que contribuíram para o progresso da pesquisa apresentada.

Ao Prof. Dr. Reginaldo Muccillo pelas análises realizadas de Microscopia de Força Atômica (AFM).

Ao Prof. Dr. Pedro Kiyohara, do Laboratório de Microscopia Eletrônica IF-USP, pelos ensinamentos e pelas análises realizadas de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Aos Eng. Elizabeth Somessari e Carlos Gaia de Silveira, pela colaboração constante no processamento por irradiação das amostras.

Ao Dr. Nelson Minoru Omi pela contribuição eficiente na área da informática.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-SP), e ao Centro de Tecnologia das Radiações (CTR), pela oportunidade e apoio no desenvolvimento e realização deste trabalho.

A todas as demais pessoas, do CTR do IPEN/CNEN-SP, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

**“Tudo que é realmente grande e inspirador é criado pelo
indivíduo que pode trabalhar em liberdade.”**

EFEITO DA RADIAÇÃO IONIZANTE NOS REVESTIMENTOS DE CATETERES DE POLIURETANO COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA

SONIA HEILMAN

RESUMO

O presente trabalho teve a finalidade de estudar a utilização da radiação ionizante para revestimento de nanopartículas de prata em Cateteres Venosos Centrais de Poliuretano, proporcionando redução de infecções associadas à contaminação de cateteres introduzidos na corrente sanguínea. A espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) possibilitou a identificação de grupos funcionais na estrutura das macromoléculas, como o poli(eteruretano). Um estudo do comportamento térmico dos cateteres de poliuretano, antes e após a radiação ionizante, foi realizado com a finalidade de caracterização do material polimérico desses cateteres. A DSC e a TG, foram empregadas na observação das alterações das propriedades do material antes e depois da degradação. A curva DSC permitiu a caracterização das propriedades térmicas, como T_m e T_g dos copolímeros, assim como, evidenciar os principais eventos térmicos. As nanopartículas de prata possuem propriedades físicas, químicas e biológicas quando comparadas ao metal em escala macroscópica, e têm sido utilizadas na área médica, em razão de sua atividade antimicrobiana excelente. As nanopartículas de dióxido de titânio, obtidas pelo método sol-gel, foram utilizadas como revestimento dos cateteres para posterior impregnação de nanopartículas de prata por radiação ionizante na dose de 25 kGy. A espectrometria Raman foi utilizada na identificação do polimorfo de óxido de titânio, rutilo. Em ensaios com (ICP OES) foram avaliadas as quantidades de titânio e prata nos cateteres revestidos com óxido de titânio e de prata. A avaliação comparativa realizada entre os cateteres antes e após a irradiação, por FTIR, Raman e DSC, possibilitou a utilização da radiação ionizante como agente de esterilização e impregnação de nanopartículas de prata.

EFFECT OF IONIZING RADIATION IN POLYURETHANE CATHETERS COATINGS WITH SILVER NANOPARTICLES

SONIA HEILMAN

ABSTRACT

The present work aimed to study the use of ionizing radiation for coating of silver nanoparticles on Central Venous Polyurethane Catheters, providing reduction of infections associated with contamination of catheters introduced into the bloodstream. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) enabled the identification of functional groups in the structure of macromolecules, such as poly(etherurethane). A study of the thermal behavior of central venous catheters before and after irradiation, was performed in order to characterize the polymeric material of these catheters. The DSC and TG were employed to observe the changes material properties before and after degradation. The DSC curve at the constant heating and cooling rate allowed the characterization of thermal properties, such as T_m and T_g of copolymers, as well as highlighting the main thermal events. Silver nanoparticles have physical, chemical and biological properties only when compared to metal on a macroscopic scale, and they have been used in the medical field because of its remarkable antimicrobial activity. Titanium dioxide nanoparticles obtained by the sol-gel method were used as the coating catheters for subsequent impregnation of silver nanoparticles with ionizing radiation, at 25 kGy. Raman spectrometry was used to identify the polymorph of titanium oxide, rutile. In trials with (ICP OES) were evaluated amounts of titanium and silver coated catheters in titanium oxide and silver. The comparative assessment conducted between the catheters before and after irradiation by FTIR, Raman and DSC enabled the use of ionizing radiation as an agent of sterilization and impregnating of silver nanoparticles.

SUMÁRIO

Página

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	6
3 CONTRIBUIÇÃO DO TRABALHO	7
4 ORIGINALIDADE DO TRABALHO.....	8
5 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
5.1 Poli(N-vinil-2-pirrolidona)	17
5.2 Poliuretano	18
5.3 Nanopartículas de Prata.....	21
5.4 Revestimento com Óxido de Titânio.....	25
5.5 Radiação Ionizante.....	27
6 MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
6.1 Materiais.....	29
6.1.1. Cateter de Poliuretano.....	29
6.1.2 Poli(N-vinil-2-pirrolidina) (PVP).....	29
6.1.3 Nanopartículas de Prata.....	31
6.2 Métodos.....	32
6.2.1 Revestimento do Cateter Venoso Central (CVC) de Poliuretano com Óxido de Titânio.....	32
6.2.2 Irradiação das Amostras.....	33
6.3 Caracterização de Materiais	37
6.3.1 Espectroscopia de Absorção no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	36
6.3.2 Termogravimetria (TG).....	37
6.3.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	38
6.3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	39
6.3.5 Microscopia de Força Atômica (AFM).....	42
6.3.6 Espectrometria Óptica de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES).....	42
6.3.7 Espectroscopia Raman.....	44
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46

7.1. 1ª Parte do Trabalho.....	46
7.1.1 Espectroscopia de Absorção no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	47
7.1.2 Termogravimetria (TG) - Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) de Amostras Não Irradiadas e Irradiadas.....	48
7.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	52
7.1.4 Microscopia de Força Atômica (AFM).....	54
7.1.5 Teste em <i>IN VITRO</i>	56
7.2. 2ª Parte do Trabalho.....	59
7.2.1 Revestimento do Cateter Venoso Central (CVC) de Poliuretano com Óxido de Titânio.....	59
7.2.2 Irradiação do Cateter Venoso Central (CVC) revestidos com Óxido de Titânio com Nanopartículas de Prata.....	60
7.2.3 Espectrometria Ótica de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES).....	62
7.2.4 Espectrometria Raman.....	63
8 CONCLUSÕES.....	67
9 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Principais características do PVP (Plasdone K-90).....	30
TABELA 2	Nanopartículas de prata fornecidas pelo IPT.....	31
TABELA 3	Nanopartículas de prata fornecidas pela UFSCar.....	31
TABELA 4	Resultados de TG/DTG e DSC do cateter e PEU poli(eteruretano).....	51
TABELA 5	Teste de adesão das amostras de cateter revestido com nanopartículas de prata.....	57
TABELA 6	Determinações de Ti em amostras de cateteres revestidos com óxido de titânio por ICP OES.....	62
TABELA 7	Determinações de Ti e Ag em amostras de cateteres revestidos com óxido de titânio e prata por ICP OES.....	62

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Vias de abordagem do Cateter Venoso Central (CVC).....	3
FIGURA 2	Indicações para uso do Cateter Venoso Central (CVC).....	5
FIGURA 3	Complicações do Cateter Venoso Central (CVC).....	10
FIGURA 4	Inserção do Cateter Venoso Central (CVC).....	10
FIGURA 5	Formação de biofilme de Cateter Venoso Central (CVC).....	11
FIGURA 6	Ciclo de vida do biofilme em três passos.....	12
FIGURA 7	Fórmula estrutural do N-vinil-2-pirrolidona.....	17
FIGURA 8	Esquema de síntese de um poliuretano.....	19
FIGURA 9	Cateter Venoso Central (CVC) (JOHNSON & JOHNSON, 1992).....	19
FIGURA 10	Cateter Venoso Central (CVC) (BIOMEDICAL, 2010).....	20
FIGURA 11	Aplicação do Cateter Venoso Central (CVC) (FIGUEIREDO; LOBO, 2010).....	21
FIGURA 12	(a) e (b) Aplicação do Cateter Venoso Central (CVC) (INFECTION CONTROL AND HOSPITAL EPIDEMIOLOGY, 2008).....	21
FIGURA 13	Mecanismo antibacteriano da prata.....	24
FIGURA 14	Aparelhagem para revestimento de Cateter Venoso Central (CVC) de poliuretano com óxido de titânio.....	33
FIGURA 15	Acelerador de elétrons Dynamitron JOB-188.....	34
FIGURA 16	Amostras de Cateter Venoso Central (CVC) para incorporação de nanopartículas de prata, IPT e UFSCar-USP em PVP.....	35
FIGURA 17	Irradiador “Gammacell 220”.....	36
FIGURA 18	Espectrômetro marca Perkin Elmer, modelo Spectrun One, acoplado com dispositivo universal ATR (“Sampling Accessory”).....	37
FIGURA 19	Termobalança modelo TGA-51 (Shimadzu).....	38
FIGURA 20	Célula DSC modelo DSC-50 (Shimadzu).....	39
FIGURA 21	Microscópio eletrônico de varredura PHILIPS- EDAX, modelo LX 30....	40
FIGURA 22	Microscópio eletrônico de varredura JEOL modelo JSM-840A “Scanning Microscope”.....	41
FIGURA 23	Microscópio eletrônico de varredura FEG-SEM JEOL JSM-7401F com canhão de emissão de campo.....	41

FIGURA 24	Microscópio eletrônico de varredura por Sonda, JEOL modelo JSM 5200.....	42
FIGURA 25	Espectrômetro Óptico de Emissão Atômica com Plasma indutivamente acoplado da marca Spectro, modelo Arcos com visão radial.....	43
FIGURA 26	Objetiva do microscópio da microscopia Raman.....	44
FIGURA 27	Espectrômetro Micro-Raman Renishaw InVia Reflex, com detector do tipo CCD (<i>charge coupled device</i>).....	45
FIGURA 28	Esquema seguido na 1ª e 2ª parte do trabalho.....	46
FIGURA 29	Esquema seguido na 1ª parte do trabalho.....	47
FIGURA 30	Espectros IR do Cateter Venoso Central (CVC) não irradiado e irradiado.	48
FIGURA 31	Curvas TG/DTG e DSC obtidas a 10 °C min ⁻¹ , sob atmosfera dinâmica de ar, utilizando cerca de 15 mg (TG/DTG) e cerca de 2 mg (DSC) da amostra de Cateter Venoso Central (CVC) não irradiada.....	49
FIGURA 32	Curvas DSC obtidas a 10 °C min ⁻¹ , sob atmosfera dinâmica de N ₂ da amostra de Cateter Venoso Central (CVC) não irradiada no intervalo de temperatura de -100 °C a 120 °C.....	50
FIGURA 33	Curvas DSC obtidas a 10 °C min ⁻¹ , sob atmosfera dinâmica de N ₂ das amostras de Cateter Venoso Central (CVC) não irradiada e irradiada.....	51
FIGURA 34	Micrografia de Cateter Venoso Central (CVC) não irradiado e sem revestimento (a) internamente e (b) externamente.....	52
FIGURA 35	MEV/EDS de Cateter Venoso Central (CVC) sem revestimento.....	53
FIGURA 36	MEV/EDS de Cateter Venoso Central (CVC) com revestimento de nanopartículas de prata fornecidas pelo IPT, em presença de PVP.....	54
FIGURA 37	Micrografia de força atômica de (a) Cateter Venoso Central (CVC) não irradiado sem revestimento	55
FIGURA 38	Micrografia de força atômica de Cateter Venoso Central (CVC) não irradiado com revestimento de nanopartículas de prata em presença de PVP.....	55
FIGURA 39	Fragmentos esterilizados de Cateter Venoso Central (CVC) revestidos com nanopartículas de prata de diversas procedências.....	57
FIGURA 40	Teste de inibição do crescimento imediato dos fragmentos esterilizados de Cateter Venoso Central (CVC) revestidos com nanopartículas de prata.....	58
FIGURA 41	Esquema seguido na 2ª parte do trabalho.....	59

FIGURA 42	Micrografia de Cateter Venoso Central (CVC) com revestimento de TiO_2	60
FIGURA 43	Cateter Venoso Central (CVC) revestido de óxido de titânio e nanopartículas de prata, fornecidas pela TNS, Competence in Nanotechnonology.....	61
FIGURA 44	Cateter Venoso Central (CVC) revestido de óxido de titânio e nanopartículas de prata fornecidas pela SIGMA-ALDRICH CHEME GmBh.....	61
FIGURA 45	Espectro Raman do Cateter Venoso Central (CVC) sem revestimento.....	63
FIGURA 46	Espectro Raman do Cateter Venoso Central (CVC) com revestimento de TiO_2 , investigação geral.....	64
FIGURA 47	Espectro Raman do Cateter Venoso Central (CVC) revestido com TiO_2 ..	65
FIGURA 48	Espectro Raman de amostras do Cateter Venoso Central (CVC) com revestimento de TiO_2 e nanopartículas de prata Np_925, submetidas a doses de 25 kGy e 50 kGy.....	66

1 INTRODUÇÃO

Este trabalho fez parte do projeto, “Nanopartículas de prata aplicadas em cateteres intraluminais para prevenção de infecção da corrente sanguínea: desenvolvimento do produto, testes *in vitro* e estudos *in vivo* pré-clínicos”, que estava associado a várias instituições, citadas a continuação.

Instituição líder:

- Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Capital.

Instituições participantes:

- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN;
- Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo, IPT;
- Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, UFSCar;
- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, USP.

O projeto constava de três áreas temáticas:

1- Desenvolvimento do revestimento;

- Síntese de nanopartículas de prata;
- Revestimentos poliméricos;

2- Estudos *in vitro*;

3- Estudos *in vivo*.

Na área temática 1 - Desenvolvimento do revestimento, linha de pesquisa de preparação dos revestimentos poliméricos contendo nanopartículas de prata, houve as parcerias do IPT no Bionano-Núcleo de Bionanomanufatura LPP - Laboratório de Processos Químicos e Tecnologia de Partículas com o Centro de Tecnologia das Radiações do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN – CNEN/SP), para reticulação de polímeros e por conseguinte para o revestimento do cateter.

A proposta do projeto, citado anteriormente, foi o desenvolvimento de cateteres revestidos com nanopartículas de prata, com a finalidade de redução das atuais taxas de infecção destes cateteres na prática clínica, com a taxa de bacteremia associada a cateteres sem *cuffs* variando de 4 % a 14 %, e podendo atingir até 43 % com uso prolongado.

Desde sua descrição por Niederhuber, em 1982, os Cateteres Venosos Centrais (CVC) tornaram-se valiosos instrumentos terapêuticos para uma variedade de condições clínicas, tais como câncer, doença renal requerendo terapia substitutiva e desnutrição. Estes produtos asseguram acesso venoso central prolongado, contínuo ou intermitente, para a infusão e troca de líquidos, nutrição parenteral total ou administração de medicamentos. Os cateteres centrais de inserção periférica são particularmente úteis para ministrar antibióticos e outros agentes quimioterápicos em pacientes externos. Possuem vantagens de evitar punções venosas de repetição, auxiliando a preservar a integridade da rede venosa. O advento das múltiplas vias, a facilidade de sua manutenção e o aspecto discreto do curativo auxiliaram os profissionais, na exequibilidade e gerenciamento dos procedimentos, e a aumentar a aceitação e o cumprimento destas terapias pelos pacientes (NIEDERHUBER *et al.*, 1982).

O corpo do cateter é feito com material de qualidade e com suficiente rigidez, flexibilidade e consistências exatas para uma inserção correta, bem como resistência para prevenir dobras e fraturas assegurando vias livres para a introdução das terapias sob as condições normais de utilização, evitar irritação mecânica no sistema vascular, possuir termoestabilidade ampla, resistência química suficiente, e nível de aderência/fixação de células e tecidos pequeno e trombogenicidade. Estas características figuram entre as utilizadas para julgar qual é o tipo de cateter mais apropriado para cada situação. Ambos, cateteres de poliuretano e silicone possuem bioestabilidade grande e trombogenicidade pequena. Os Cateteres Venosos Centrais (CVC) de poliuretano, no entanto, têm paredes mais finas permitindo lúmen com maior diâmetro, são mais duros e mais resistentes, se dobram menos, suportam pressão maior e possuem resistência maior aos produtos químicos, mas apresentam restrição de uso com soluções antissépticas à base alcoólica, como a clorexidina, as quais elevam o risco de fratura/quebra do cateter (TRINDADE *et al.*, 2007).

Define-se como Cateter Venoso Central (CVC) de curta permanência, aqueles que atingem vasos centrais (subclávia, jugular, femoral) e são instalados por venopunção direta e não são tunelizados. Esses dispositivos não possuem nenhum mecanismo para prevenção de colonização extraluminal e são frequentemente empregados quando há necessidade de acesso central por períodos curtos (tipicamente entre 10 - 14 dias), de onde deriva sua denominação. Cateter Venoso Central (CVC) de longa permanência são aqueles que atingem vasos centrais (subclávia, jugular, femoral) e são instalados cirurgicamente e

apresentam algum mecanismo para evitar a colonização bacteriana pela via extraluminal. Eles são frequentemente empregados quando há necessidade de acesso central por períodos mais prolongados (acima de 14 dias), de onde deriva sua denominação e subdividem-se em semi-implantados (o acesso ao vaso dá-se por intermédio de um túnel construído cirurgicamente e a presença de um *cuff* de Dacron gerando uma reação tecidual que sela a entrada de bactérias da pele) e totalmente implantados (o acesso ao vaso central dá-se por intermédio da punção de um reservatório implantado cirurgicamente sob a pele e a entrada de bactérias é impedida pela própria pele supra-adjacente) (ANVISA, 2010), como mostrado na FIG. 1.

FIGURA 1 - Vias de abordagem do Cateter Venoso Central

Os poliuretanos têm sido bastante utilizados na medicina para o revestimento e acondicionamento implantável e outros dispositivos médicos. Os polieteruretanos, em particular, possuem propriedades mecânicas superiores e são biocompatíveis, em comum

com outros materiais médicos que são sensíveis à formação de filme microbiano. O poli(eteruretano) pode ser sintetizado com grupos funcionais de lactato de prata e sulfadiazina de prata para produzir um polímero resistente às bactérias, sem sacrificar as propriedades mecânicas úteis do poli(eteruretano). Os íons prata podem ser covalentemente incorporados no polímero durante a extensão da cadeia do pré-polímero. As propriedades mecânicas, hidrofobicidade, estabilidade *in vitro* e ação antibacteriana de polímeros foram investigadas e os resultados indicaram que ambos os sais de prata foram incorporados com êxito na estrutura do polímero, sem efeito significativo sobre as propriedades mecânicas, conferindo resistência bacteriana aceitável. Adicionalmente, as propriedades mecânicas originais dos polímeros modificados foram mantidas, e os materiais conservaram sua integridade em solução, por exposição *in vitro*. Apesar do teor de prata nas membranas ser pequeno, a atividade antibacteriana significativa foi observada. Porém, mais estudos são necessários para otimizar o carregamento e a liberação de prata, bem como a avaliação da biocompatibilidade dos materiais desenvolvidos para aplicações de dispositivos médicos (ROOHPOUR *et al.*, 2012).

Salienta-se portanto, que um dos maiores desafios do tratamento de pacientes gravemente enfermos é a contaminação de cateteres introduzidos na corrente sanguínea, e subsequente infecção, sepse grave e choque séptico, associados com morbimortalidade elevada, pois os Cateteres Venosos Centrais (CVC) são habitualmente empregados para administrar fluidos, hemoderivados e nutrição parental, como mostrado na FIG. 2, e seu uso está associado à maioria das infecções da corrente sanguínea (ICS), sendo a septicemia, a mais grave.

FIGURA 2 – Indicações para uso do Cateter Venoso Central (CVC)

2 OBJETIVOS

Objetivo Geral:

- ✓ Estudar a utilização da radiação ionizante em cateteres bactericidas com revestimento de nanopartículas de prata, proporcionando redução de sepse, sepse grave, choque séptico e outras infecções associadas à contaminação de cateteres introduzidos na corrente sanguínea.

Objetivos Específicos:

- ✓ Desenvolver metodologias de fabricação e caracterização de cateteres revestidos com materiais antimicrobianos e de ação preventiva à formação de biofilme.
- ✓ Avaliar estes cateteres quanto à modificação de características da superfície de revestimento em função da ação da radiação ionizante, explorando possíveis benefícios decorrentes do controle das propriedades de superfície.

3 CONTRIBUIÇÃO DO TRABALHO

- ✓ Contribuir para o entendimento e a compreensão dos processos de formação de filmes poliméricos contendo nanopartículas dispersas.
- ✓ Contribuir para o conhecimento dos fenômenos que regem a difusão e liberação controlada de íons de prata em meio aquoso, de filmes poliméricos com características físico-químicas diferentes.

4 ORIGINALIDADE DO TRABALHO

A originalidade do trabalho está baseada na inexistência de pesquisas ou publicações de estudos sistemáticos a respeito dos efeitos da radiação ionizante sobre revestimentos poliméricos, contendo nanopartículas de prata e o comportamento, em cateteres de poliuretano, revestidos com poli(N-vinil-2-pirrolidona), para atividade antimicrobiana.

Ressalta-se a avaliação do efeito da radiação, em relação à hidrofilicidade e à taxa de liberação de íons prata no sentido da verificação da interação da formação do biofilme com a ação bactericida.

Salientam-se os estudos a respeito da utilização da radiação ionizante para a impregnação de nanopartículas de prata em cateteres de poliuretano, revestidos com óxido de titânio e seu comportamento para atividade antimicrobiana.

5 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Uma revisão da literatura relacionada com a infecção associada ao Cateter Venoso Central (CVC), envolvendo 12 estudos divulgados desde 1998, culminou em 4 categorias temáticas: cateteres impregnados com antissépticos, inserção, manutenção e prevenção das complicações relacionadas com o CVC. Como resultado obtiveram-se dados importantes no controle da infecção relacionada com o CVC, como número de lúmens; CVC impregnados com antisséptico; local de inserção; barreiras de proteção e a implicação do uso de alimentação parentérica, bem como de técnicas dialíticas, entre outros (SILVA; OLIVEIRA; RAMOS, 2009).

O uso de Cateter Venoso Central (CVC) é apontado como um dos principais fatores para infecção da corrente sanguínea por estudos com bases de dados, Latinoamericana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS), “Medical Literature Analysis and Retrieval System on-line” (MEDLINE) e “Cumulative Index to Nursing and Allied Health Literature” (CINAHL), e em busca de evidências científicas sobre o controle de infecção relacionada ao Cateter Venoso Central (CVC) impregnado com antissépticos, utilizados em pacientes adultos hospitalizados. A partir da análise desses estudos, houve a redução da colonização microbiana em seis dos nove estudos com a utilização de Cateter Venoso Central (CVC) impregnado com antissépticos. Entretanto, pesquisas adicionais são necessárias para investigar a eficácia do emprego desses cateteres, em outras populações de pacientes, considerando que os estudos analisados da revisão integrativa, em sua maioria, não sinalizaram diferenças estatisticamente significantes em relação às taxas de Infecção Primária de Corrente Sanguínea Relacionada a Cateter (ICSRC), (FERREIRA, M; ANDRADE; FERREIRA, A, 2011).

A ICSRC é definida como isolamento de um microrganismo de mesma espécie, em uma cultura semiquantitativa ou quantitativa do segmento distal do cateter e do sangue, colhido em veia periférica preferencialmente, de um paciente que apresente sintomas clínicos de infecção (febre ou hipotermia, calafrios, confusão mental e choque) e nenhuma outra fonte aparente de infecção além do cateter. É considerada uma das principais causas de infecção hospitalar, variando de acordo com cada instituição, e o tipo de UTI (FERREIRA, M; ANDRADE; FERREIRA, A, 2011), como mostrado na FIG. 3.

FIGURA 3 – Complicações do Cateter Venoso Central (CVC)

A ICSRC pode estar associada a problemas na inserção do cateter e por antissepsia inadequada do sítio de inserção. Os microorganismos atingem o acesso vascular por colonização da pele no sítio de inserção, ascensão do extra lúmen para o intra lúmen, raramente por soluções contaminadas (surto de infecção hospitalar), como mostrado na FIG. 4.

FIGURA 4 – Inserção do Cateter Venoso Central (CVC)

Como os cateteres são uma importante fonte de infecções da corrente sanguínea em pacientes hospitalizados, a aderência microbiana é essencial para a formação de biofilme, no entanto, esta adesão é dependente da interação iônica entre o microorganismo e a superfície e tem sido demonstrado que uma carga negativa atrai bactérias, sugerindo que uma superfície carregada positivamente repelirá bactérias e, assim inibirá a adesão das mesmas (RICHARDS *et al.*, 2014).

A formação de biofilme é a razão da necessidade de retirar o Cateter Venoso Central (CVC), pois formando o biofilme, há um ambiente propenso para mutação genética dos agentes, levando ao aumento da disseminação da resistência bacteriana, persistência da infecção. Os agentes mais comuns, formadores de biofilme, são o *S. aureus* e *Cândida spp* (MÜLLER, 2008).

Uma definição de biofilme de acordo com CONSTERTON; STEWART; GREENGERG, (1999): “Uma associação de células bacterianas e/ou fungos, fixada à superfícies, bióticas ou abióticas, inclusas em uma complexa matriz extracelular de substâncias poliméricas, juntamente com nutrientes capturados para a formação da matriz” conforme é mostrado na FIG. 5.

FIGURA 5 - Formação de biofilme de Cateter Venoso Central (CVC)

Portanto, a formação de biofilme se dá por meio de bactérias que aderem às superfícies em ambientes aquosos e formam substâncias poliméricas extracelulares (EPS) que dão a estrutura do biofilme e atribuem resistência. Outras mudanças fisiológicas podem ocorrer na célula em resposta à formação de biofilme. O ciclo de vida do biofilme é ilustrado em três passos: eventos iniciais de fixação, o crescimento de biofilmes complexos, e eventos de descolamento por aglomerados de bactérias ou por um "pululando" fenômeno no interior de agregados bacterianos, resultando na assim chamada "seeding" dispersão, dispersão de sementeira, como é mostrado na FIG. 6 (MACWANA *et al.*, 2003).

FIGURA 6 - Ciclo de vida do biofilme em três passos

Vários métodos foram sugeridos para a prevenção ao acesso vascular, dentre outros, cateteres revestidos com nanopartículas de prata, com um desempenho superior, em razão dos avanços da nanociência e da nanobiotecnologia. Este método consiste em associar partículas de prata metálica a um material polimérico que reveste o cateter interna e externamente. As principais características potencialmente controladas são: a intensidade e o espectro da ação bactericida, a taxa de liberação do agente bactericida e a resistência à formação do biofilme. Esses cateteres desenvolvidos têm características diferenciadas nas suas aplicações e qualidades específicas (CONSTERTON; STEWART; GREENGERG, 1999).

Os nanocompósitos de poliuretano do tipo poliéster à base de água (PU), contendo várias concentrações baixas (15 e 75 ppm) de nanopartículas de prata (Ag nano, tamanho aproximadamente de 5 nm) foram preparados em estudos realizados por HSU; TSENG; LIN, (2010) e uma considerável dispersão das nanopartículas até 30 ppm de nano Ag, foi obtida. A degradação oxidativa de PU e Ag foi inibida em todas concentrações de nano Ag testadas, especialmente a 30 ppm, podendo estar relacionada com a livre capacidade de eliminação de radicais observada para os nanocompósitos. O implante subcutâneo em ratos confirmou a melhor biocompatibilidade dos nanocompósitos e a adesão de *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* resistentes sobre nanocompósitos de PU e Ag foi sendo significativamente menor em todas as concentrações de nano Ag testadas. Estes dados forneceram evidências para PU e nano Ag, como um biomaterial cardiovascular potencial.

As partículas nanométricas de prata exibem propriedades físico-químicas e atividades biológicas incomuns. Consequentemente, as suas aplicações, especialmente no setor de saúde, foram e estão sendo exploradas intensamente. Uma extensa categoria de produtos, na área médica, já está disponível no mercado, como instrumentos cirúrgicos, próteses ósseas revestidas ou mergulhadas em nanopartículas de prata.

As primeiras nanopartículas de prata foram preparadas há mais de um século e hoje em dia, utilizam-se métodos químicos, eletroquímicos, fotoquímicos, radiação, ablação a laser entre outros, para sua preparação. No entanto a prata deve estar na forma solúvel, descarregada ou metálica, para fornecer os efeitos biológicos. A prata nanocristalina é inativada mais lentamente pelos fluídos biológicos que sua forma iônica e portanto, pode fornecer uma ação antimicrobiana prolongada em aplicações médicas (DUNN *et al.*, 2004).

Apesar das partículas nanométricas de prata exibirem importantes propriedades físico-químicas e atividades biológicas antimicrobianas elas ainda são pouco exploradas no Brasil. Portanto um estudo interdisciplinar nacional que envolva centros que possam sintetizar e incorporar a nanopartículas de prata em dispositivos invasivos e testar a sua ação *in vitro* contra bactérias e fungos se faz necessário.

As nanopartículas de prata têm atraído o interesse de vários pesquisadores nestes últimos anos, tanto do ponto de vista científico como tecnológico e possuem propriedades físicas, químicas e biológicas únicas quando comparadas ao metal em escala macroscópica, e têm sido utilizadas em aplicações tais como catálise, em dispositivos optoeletrônicos e na

área médica. A utilização de materiais nanoestruturados está cada vez mais difundida na indústria brasileira. Percebe-se um grande interesse na utilização de nanopartículas de prata em razão de suas propriedades notáveis como condutividade adequada, efeito catalítico elevado, área superficial alta e atividade antimicrobiana excelente. Com relação aos ensaios microbiológicos, os antibiogramas revelaram que apenas a solução coloidal de 1000 ppm de nanopartículas de prata apresentou atividade antimicrobiana em relação às duas bactérias testadas (*Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*). As nanopartículas de prata da solução coloidal de 18 ppm, por outro lado, não apresentaram atividade antimicrobiana, e esta concentração da solução coloidal pode ter contribuído muito para esse resultado (ANTUNES *et al.*, 2013).

A prata é um antibiótico forte, que está cada vez mais incorporada em produtos de consumo como sal ou nanopartícula de prata, portanto, potencialmente causadora de efeitos secundários relacionados com a exposição humana. No entanto, o destino e o comportamento de nanopartículas de prata no corpo humano, atualmente, não é bem compreendido. A fim de agregar as informações experimentais existentes, um modelo de farmacocinética com base fisiológica (PBPK) foi desenvolvido para a prata iônica e a nanopartícula de prata. A estrutura do modelo foi estabelecida com base em dados de estudos de toxicocinética intravenosos. O número de parâmetros calibrados foi minimizado de modo a aumentar a capacidade de previsão do modelo. O modelo de estrutura para ambas as formas de prata foi validado, reproduzindo as condições de exposição (dérmica, oral e inalação) de experimentos *in vivo* e comparando às concentrações de órgãos simulados e experimentalmente aferidas. Em todos os casos examinados, o modelo poderia prever com sucesso a biodistribuição de prata iônica de 15-150 nm de nanopartículas de prata, que não foram revestidas com substâncias destinadas a prolongar o tempo circulatório. Além disso, os resultados desse modelo indicaram que o tamanho das partículas e revestimento teve uma influência menor na biodistribuição e *in vivo*, o mais provável é que as nanopartículas de prata são diretamente armazenadas como partículas de sal insolúveis que se transformam em Ag^+ (BACHLER; GOETZ; HUNGERBÜHLER, 2013).

Para o desenvolvimento de cateteres com revestimentos poliméricos contendo nanopartículas de prata, é importante, além da resistência mecânica e flexibilidade para aplicação, a superfície biocompatível, com características antimicrobiana e antiadesivas aos microorganismos (POURREZAEI *et al.*, 1994).

Atendendo a essas especificações, um material interno é designado para a função estrutural e um de revestimento para as funções médicas.

A matriz polimérica escolhida deve ter características de barreira, controle da taxa de liberação dos íons com ação bacteriana, e de hidrofiliicidade, além de garantia da resistência à formação de biofilmes (CONSTERTON; STEWART; GREENGERG, 1999).

Os polímeros hidrofóbicos apresentam maior interação com a superfície da célula bacteriana (POURREZAEI *et al.*, 1994).

As superfícies hidrofílicas com surfatantes plurônicos e a base de hidroxietil metacrilato (HEMA) e de poli(óxido de etileno) reduzem com eficiência a adesão de microorganismos (SPENCER, 1999); (DESAI; HUBBELL, 1992).

As membranas de blenda de poli(álcool vinílico) (PVA) com quitosana, desenvolvidas por CHANDY; SHARMA, (1992) reduzem a adesão de plaquetas (DESAI; HUBBELL, 1992).

As características de barreira e estabilidade das matrizes poliméricas, nas condições de aplicação, são controladas pelo grau de reticulação da camada do revestimento que geram estruturas insolúveis e infusíveis. Esse controle garante a liberação do agente ativo do recobrimento, evitando uma difusão rápida do ativo para a superfície de contato.

Para a liberação de íons prata da matriz polimérica, é importante a absorção de água pelo polímero, seja pela capacidade de solubilização do agente ativo, seja pela influência da umidade nas propriedades de barreira de diversos polímeros (DAMM; MÜNSTEDT; RÖSCH, 2008).

Estudos desenvolvidos com nanopartículas de prata, dióxido de carbono e silicone, tiveram como objetivo avaliar o polímero impregnado para a atividade microbiana, cujos testes em condições diversas, mostraram resultados mistos, explicados pelas taxas e modos de liberação de íons prata (FURNO *et al.*, 2004).

A prevenção de infecção em cateteres de permanência longa, mesmo que sejam utilizados antibióticos, ou mesmo com modificações na superfície com hidrogel, torna-se de pouco valor nessa contaminação. A utilização de nanopartículas de prata em vários polímeros, como poliuretano e silicone, resultou em uma atividade antimicrobiana

excelente contra um espectro de organismos *in vitro* amplo. O tipo de material do cateter está relacionado à aderência e maior facilidade de formação de biofilme. Estudos *in vitro* mostraram que os cateteres de poli(cloreto de vinila), são mais susceptíveis à aderência microbiana do que aqueles de silicone ou poliuretano (SAMUEL; GUGGENBICHLER, 2004).

Um método de revestimento com uma fina camada de nanopartículas de prata bioativas, na superfície de cateteres de poliamida, possibilitou a produção de nanopartículas de prata (~ 100 nm) com concentração de prata de 0,1 a 30 mg/cm². A liberação controlada de prata foi demonstrada ao longo de um período de 10 dias. Os cateteres revestidos mostraram, *in vitro*, atividade antimicrobiana significativa, impedindo a formação de biofilme com *Escherichia coli*, *Enterococcus*, *Staphylococcus aureus*, *Estafilococos coagulase-negativos*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. Em razão das propriedades antimicrobianas demonstradas, há a possibilidade de sua utilização na redução do risco de complicações infecciosas em pacientes com cateteres (ROE *et al.*, 2008).

As nanopartículas de prata foram preparadas, à temperatura ambiente na forma triangular, triangular truncada, quadrangulares, hexagonais, e outras, a partir de nitrato de prata e de sementes de prata na presença de poli(etileno-glicol) (PEG), poli(N-vinil-2-pirrolidona) (PVP), e Tween 80, polisorbato 80 (C₆₄H₁₂₄O₂₆) um surfatante não-iônico utilizado para emulsificar óleo em água, (FENG *et al.*, 2006). Verificou-se que as sementes de prata e modificadores orgânicos sinergicamente afetaram a evolução da morfologia das nanopartículas de prata. As sementes de prata e PVP favoreceram a formação de formas poligonais. A evolução da morfologia das nanopartículas de prata resultantes foi correlacionada com a cristalinidade das sementes de prata e a capacidade de adsorção dos modificadores orgânicos nas superfícies cristalinas (WANG *et al.*, 2008).

O uso de radiação, para reticulação de polímeros, dispensa um agente reticulante, potencialmente tóxico, que pode introduzir grupos funcionais adicionais indesejáveis na estrutura reticulada (STRINGE; PEPPAS, 1996).

O mecanismo de cisão de cadeia (degradação) é importante apenas em doses de radiação elevada, em competição com os mecanismos de reticulação, variável que deverá ser utilizada para controlar o mecanismo desejado (MERRIL; DENNISON; SUNG, 1993).

5.1 Poli(N-vinil-2-pirrolidona)

O poli(N-vinil-2-pirrolidona), também conhecido por polivinilpirrolidona, povidone ou PVP, é um homopolímero sintético, solúvel em água e outros solventes polares. Em água ele tem a propriedade da viscosidade Newtoniana, por ser um polímero capaz de interações intermoleculares, mesmo em soluções aquosas diluídas a diferentes temperaturas, em razão das interações intramoleculares das próprias cadeias de PVP serem mais fortes que as interações PVP-água por meio de ligações de hidrogênio. Também forma ligações de hidrogênio com as moléculas de água. O PVP liga-se a moléculas polares, em razão de sua própria polaridade.

O PVP quando seco é um pó levemente flocoento, o qual absorve até 18 % de seu peso em umidade do ar. Em solução, ele apresenta propriedades de umidificação excelentes e facilmente forma filmes (películas). Isto o faz bom para uso como revestimento ou aditivo a revestimentos. Pode ser obtido por meio da polimerização em cadeia, geralmente, via radicais livres, em solução aquosa, com iniciação química, utilizando 0,1-2,5 % de peróxido de hidrogênio como iniciador e amônia, amina ou seus sais como ativadores; como também por irradiação do monômero N-vinil-2-pirrolidona, com fórmula estrutural mostrada na FIG. 7 (MIRANDA, 1999).

FIGURA 7 - Fórmula Estrutural do N-vinil-2-pirrolidona

Hidrogéis de poli(N-vinil-2-pirrolidona), PVP, são muito utilizados como biomateriais por não apresentarem toxicidade nem causarem irritação dérmica quando em contato com a pele, além disso, apresentam a propriedade de inchamento elevado. Quanto à radiação ionizante, é utilizada para promover a reticulação do hidrogel e promover a esterilização do material (ROGERO *et al.*, 2002).

5.2 Poliuretano

Os poliuretanos são polímeros classificados como resinas plásticas de aplicação geral, do grupo dos termoplásticos, podendo também serem encontrados no grupo dos termorrígidos. São os mais versáteis da família dos polímeros e os mais usados na fabricação de espumas rígidas de poliuretano (PUR), mas não se resumem apenas a essa aplicação. Em 1937, o professor Otto Bayer e sua equipe desenvolveram um processo que, a partir da reação de dois compostos, resultava um produto de estrutura macromolecular. Eles são normalmente produzidos pela reação de poliadição de um poliisocianato (no mínimo bifuncional) e um poliol ou outros reagentes, contendo dois ou mais grupos de hidrogênio reativo. Os compostos contendo hidroxilas podem variar quanto à massa molar, natureza química e funcionalidade. Os isocianatos podem ser aromáticos, alifáticos, cicloalifáticos ou policíclicos. Esta flexibilidade de escolha de reagentes permite obter uma variedade infinita de compostos com diferentes propriedades físicas e químicas, conferindo aos poliuretanos uma posição importante no mercado mundial de polímeros sintéticos de desempenho adequado. Seu desenvolvimento comercial começou na Alemanha no final da década de 30 em espumas rígidas e adesivos. Os elastômeros na década de 40 e 50 ocasionaram o grande desenvolvimento comercial em espumas flexíveis, tintas e vernizes (WIEBECK; HARADA, 2005).

O poliuretano é um polímero que compreende uma cadeia de unidades orgânicas unidas por ligações uretânicas, cujas estruturas principais são mostradas na FIG. 8.

FIGURA 8 - Esquema de síntese de um poliuretano

O poliuretano, PU, utilizado neste trabalho está presente em Cateteres Venosos Centrais (CVC), conforme mostrado na FIG. 9 (JOHNSON & JOHNSON, 1992).

FIGURA 9 - Cateter Venoso Central (CVC) (JOHNSON & JOHNSON, 1992)

Via de regra, esses cateteres são esterilizados com óxido de etileno, cuja atuação se verifica por meio de alquilação das cadeias proteicas microbianas. O óxido de etileno é um

gás inflamável, explosivo e carcinogênico, sendo muitas vezes misturado com gases inertes, para diminuir o risco de combustão, como diclorofluorometano (freon) e dióxido de carbono (CO_2). No processo de esterilização, o tempo de exposição é de 3 a 4 horas com temperatura de 50 a 60 °C e concentração do gás de 450 mg/L. Ao final do processo, os materiais devem ser aerados, para a remoção do óxido de etileno, por aeração mecânica ou forçada, dentro de câmara de esterilização, por 5 horas, ou por aeração ambiental, em área fechada, com sistema de ventilação e exaustão, exigida pela Portaria Interministerial nº4, por 12 horas a 25 °C (TRINDADE *et al.*, 2007).

Um dos seus fabricantes é a Biomedical Equipamentos e Produtos Médico-Cirúrgicos Ltda, como mostrado na FIG. 10, todavia pela utilização da radiação ionizante, a obtenção desses cateteres esterilizados seria uma possibilidade viável.

FIGURA 10 - Cateter Venoso Central (CVC) (BIOMEDICAL, 2010)

A cateterização intravascular tem como finalidade monitorização hemodinâmica, manutenção de vias de infusão de soluções ou medicações, nutrição parenteral prolongada, quimioterapia, hemodiálise e coleta de amostras sanguíneas, como mostrado nas FIG. 11 e FIG. 12 (a) e (b).

FIGURA 11 - Aplicação do Cateter Venoso Central (CVC) (FIGUEIREDO; LOBO, 2010)

(a)

(b)

FIGURA 12 - (a) e (b) Aplicação do Cateter Venoso Central (CVC) (INFECTION CONTROL AND HOSPITAL EPIDEMIOLOGY, 2008)

5.3 Nanopartículas de prata

As propriedades medicinais da prata são conhecidas há séculos. Já em civilizações egípcias antiga e grega, moedas de prata foram lançadas em fontes e taças de prata foram

usadas para beber água, para mantê-la potável. A prata foi um agente antimicrobiano popular no século XX. Um de seus usos mais comuns era o nitrato de prata em gotas, colocado nos olhos dos recém-nascidos, para evitar infecções causadas comumente pela cegueira. Com a descoberta de antibióticos no meio do ano de 1900, a prata não foi mais utilizada como um remédio para a infecção, embora tenha continuado a ser um tratamento primário para queimaduras graves. Hoje em face de patógenos resistentes a antibióticos, a prata está ressurgindo como um importante agente antimicrobiano, porque tem uma capacidade única para atacar e matar microorganismos que causam infecção. Dependendo dos requisitos de aplicação e duração, estudos mostraram que o depósito a partir de $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ a $32 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de prata, (para a prata iônica ser antimicrobianamente ativa em fluidos do corpo ou culturas, deve ter uma concentração eficaz de pelo menos 0,001 ppm e esta medição de prata por unidade de área da superfície quadrada assegura a quantidade correta de prata disponível na superfície do dispositivo e com atividade antimicrobiana, independentemente da massa do dispositivo) em superfícies de dispositivos médicos pode prevenir a formação de biofilme a um espectro vasto de agentes patogênicos, citando alguns como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus sp* e *Candida albicans*. Pesquisadores sabiam que a forma iônica de prata (Ag^+) é altamente antimicrobiana com a capacidade de matar um espectro amplo de bactérias clinicamente relevantes (gram⁺ e gram⁻), bem como fungos (bolores e leveduras). A prata iônica é também oligodinâmica, o que significa que ela é antimicrobiana em quantidades muito baixas, tão baixas quanto 0,001 ppm. Apesar da prata ser um metal pesado, nessas quantidades muito pequenas não é tóxica às células humanas e, portanto, muito segura (ACRYMED, 2008).

A resistência crescente de muitas cepas de bactérias aos antibióticos e antisépticos está se tornando um sério problema em medicina. A nanopartícula de prata é um dos produtos de mais destaque na medicina porque exhibe propriedades físico-químicas incomuns e uma atividade biológica grande. Uma tecnologia inovadora de deposição de prata foi aplicada a cateteres de poliuretano temporários para hemodiálise. Foram reproduzidas as condições de trabalho dos cateteres por meio de equipamentos de laboratório que garantiram o fluxo de água deionizada e o fluido corporal simulado dentro dos lúmens, à temperatura corporal. O crescimento e a adesão de *Staphylococcus aureus* na superfície do dispositivo foram estudados, como também a quantidade de prata liberada a partir do substrato e a estabilidade do revestimento durante toda a vida útil do dispositivo.

Os resultados confirmaram que a nanopartícula de prata poderia representar um instrumento para conter o risco de infecções em pacientes de diálise. Muitas vantagens foram relacionadas em termos de adesão do revestimento à superfície e eficácia antibacteriana, e também não foram observadas implicações perigosas para a saúde humana em relação à liberação de prata no sangue (PALADINI *et al.*, 2012).

Muitas estratégias diferentes foram desenvolvidas para diminuir a incidência de infecção relacionada ao dispositivo médico. Uma maneira de evitar a infecção é por modificação da superfície dos dispositivos de tal maneira que nenhuma aderência de bactérias possa ocorrer. Isto requer a modificação completa da superfície, na sua maioria, com revestimentos superficiais poliméricos hidrofílicos. Estes materiais são preparados para serem não incrustantes, o que significa que a adsorção de proteínas e subsequente adesão microbiana são minimizadas (KNETSCH; KOOLE, 2011).

A aplicação das nanopartículas de prata sobre a superfície dos dispositivos médicos tem sido usada para impedir a adesão bacteriana e subsequente formação de biofilme. As nanopartículas de prata são depositadas diretamente sobre a superfície do dispositivo, ou aplicadas na superfície de um revestimento polimérico. A prata é liberada lentamente a partir da superfície, eliminando, assim, as bactérias presentes próximas da superfície. A inclusão de nanopartículas de prata, prata metálica, sais de prata, ou sulfadiazina de prata nos revestimentos de cateteres visam liberar íons de prata perto da superfície, que podem reduzir ou mesmo prevenir a colonização e subsequente formação de biofilmes (KNETSCH; KOOLE, 2011).

O principal problema é que, no entanto, o mecanismo exato de prata antimicrobiana permanece obscuro. Adicionalmente, há uma variação grande na eficácia antimicrobiana da prata em dispositivos médicos. A maneira exata em que as nanopartículas de prata exercem atividade antimicrobiana ainda é especulativa, porém o uso apropriado e a aplicação desta forma de prata pode reduzir a infecção microbiana. A forte atividade bactericida pode ser dependente do tamanho e forma das partículas. As nanopartículas de prata de tamanho (<10 nm) tem maior atividade antibiótica que as partículas maiores e as partículas de forma triangular têm maior atividade do que as hastes e partículas esféricas. As nanopartículas oxidadas obtiveram as propriedades antibióticas, enquanto as reduzidas eram ineficazes para matar ou inibir o crescimento bacteriano. Os íons de prata estão ligados muito fortemente na camada de oxidação e, portanto, o íon Ag^+ , liberado das

nanopartículas, não pode ser o único responsável pela ação antibiótica. O fato de que as nanopartículas pequenas e irregulares, mostraram a maior atividade antibiótica indica que a área de superfície das partículas é importante. A taxa de liberação de Ag^+ é dependente da área da superfície, e portanto, ser o fator determinante para a atividade antibiótica. Além disso, as nanopartículas de prata ligam-se e migram para dentro das células, danificando proteínas, material genético e as membranas, que conduzem à morte celular. Nunca se pode excluir o fato de que as nanopartículas de prata são interagentes e componentes bioativos. A liberação de íons de prata, naturalmente, permanece após a absorção das nanopartículas de prata (KNETSCH; KOOLE, 2011).

Uma possível explicação para a atividade bactericida de partículas de prata compreende a transferência direta de íons de prata, a partir de nanopartículas oxidadas, a alvos biológicos como proteínas ou à membrana celular, como é mostrado na FIG. 13 (KNETSCH; KOOLE, 2011).

FIGURA 13 - Mecanismo antibacteriano da prata

Um revestimento de superfície, contendo nanopartículas de prata vai lentamente libertando os íons de prata para a camada de revestimento e, subsequentemente, à solução. Além disso, as nanopartículas de prata intracelulares causam danos às proteínas e ácidos nucleicos no interior das bactérias. O efeito mais evidente de nanopartículas de prata e íons de prata é de ligação direta com a membrana celular. Acumulação de prata em partes com carga negativa da membrana celular leva a perfuração da membrana, vazamento dos compostos celulares e morte celular. A concentração de íons de prata necessários para um efeito antibiótico ideal varia entre 10 nM e 10 mM. No entanto, a liberação de íons de prata solúveis de nanopartículas por si só é susceptível de conduzir a concentrações

suficientemente altas, *in vivo*. Isto significa que pode ocorrer a transferência de prata diretamente a partir das partículas no revestimento, para os micróbios (KNETSCH; KOOLE, 2011).

Uma revisão dos efeitos antibacterianos de nanomateriais de prata apresentada com mecanismos antibacterianos propostos e possível toxicidade para organismos superiores, incluem nanomateriais de prata, nanopartículas de prata estabilizadas, sais de prata, dendrímero de prata, polímero e óxido de metal compósitos, zeólito impregnado de prata e materiais de carvão ativado. Embora exista alguma evidência que as nanopartículas de prata possam danificar diretamente as membranas celulares de bactérias, os nanomateriais de prata aparentemente exercem atividade bactericida predominantemente por meio da liberação de íons de prata (individualmente ou em combinação) por um aumento da permeabilidade da membrana. A maior parte dos estudos antimicrobianos foram realizados em meio aquoso simples ou meios de cultura celular. A estabilidade de nanopartículas de prata é regulada pelo tamanho e forma da partícula, e agentes de proteção, como pH da solução, força iônica, íons ligantes e macromoléculas orgânicas, os quais influenciam na estabilidade das nanopartículas de prata e na biodisponibilidade. Apesar de nenhum dos estudos revisados tenham provado quaisquer impactos para a saúde humana ou para o ambiente por um nanomaterial de prata, a avaliação íntegra da ciência sugere alguma cautela e mais pesquisas seriam justificadas, porém já é crescente o uso de nanomateriais de prata (MARAMBIO; HOEK, 2010).

As nanopartículas de prata com tamanhos diferentes (7, 29 e 89 nm de valores médios) foram sintetizadas utilizando ácido gálico em um método de redução química aquosa e verificou-se que sua atividade antibacteriana aumenta quando o seu tamanho diminui e observou-se que estas nanopartículas de prata têm forma esférica (7 e 29 nm) e forma pseudoesférica (89 nm) com um tamanho de distribuição restrito (MARTÍNEZ-CASTAÑÓN *et al.*, 2008).

5 4 Revestimento com Óxido de Titânio

Os nanomateriais, definidos como partículas variando de 1 a 100 nm de diâmetro, tornaram-se bastante utilizados em razão de suas propriedades físico-químicas únicas. Entre estas nanopartículas, dióxido de titânio (TiO₂) é frequentemente usado na produção de tintas, papel, plásticos, material da haste de soldadura de revestimento, cosméticos,

entre outros. O TiO_2 é o mais utilizado como fotocatalisador semiconductor. Entre os diferentes nanomateriais, é o mais estudado e ativado por irradiação UV-A e em razão de suas propriedades catalíticas, tem sido utilizado em várias aplicações. A riqueza de informações sobre TiO_2 fotocatalítico na ativação de bactérias foi adquirida ao longo dos últimos 20 anos. Muitos métodos de síntese de TiO_2 são descritos na literatura, principalmente, o método de tipo sol-gel, entre outros. Pode-se citar aplicações de TiO_2 nas áreas médicas, ambientais, de sensores, fotocatalíticas, e também o seu impacto na saúde a longo prazo (MACWAN; PRAGNESH; CHATURVEDI, 2011).

Dentre os diversos polimorfos de TiO_2 , os principais são a anatase (ou anátasio) e a rutila (ou rutilo) (SOUZA, 2013).

Em outro trabalho, ao ser mencionada a síntese de nanopartículas de TiO_2 e TiO_2/Ag para aplicação em fotocatalise, para teste de atividade fotocatalítica, também foi utilizado o método sol-gel, com diferentes porcentagens de prata, empregando fotoirradiação (RAMOS, 2012).

Com o objetivo de desenvolver uma superfície de implante com titânio antibacteriano e testar seu desempenho biológico, e tendo conhecimento que placas de titânio com nanopartículas de prata depositada, adquirem atividade antibacteriana para *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, superfícies de biomaterial devem ser modificadas para conseguir uma compatibilidade celular excelente. Os dados indicam que o titânio com superfície modificada com nanopartículas de prata (Ti-NAg) é um material com ambas propriedades amplas, antibacteriana e citocompatibilidade descomprometida, podendo ser usado como um biomaterial implantável (LIAO *et al.*, 2010 a).

Em estudo posterior, foram determinadas atividades antibacterianas e antiadesivas de uma superfície de titânio e prata modificada com nanopartículas, preparada utilizando o método de silanização. Esses dados indicam que a superfície do Ti-NAg tem atividades antibacterianas e antiadesivas notáveis para duas espécies de bactérias, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Análises de EDS na superfície, revelaram que, somente, 4,26 % de prata estava presente na superfície modificada. Estes dados confirmam que Ti-NAg é um material promissor com propriedades antibacterianas, podendo ser usado como um biomaterial para implantes (LIAO *et al.*, 2010 b).

Em outro estudo, a prata foi introduzida por um método de implantação de íons em revestimentos em TiO_2 produzidos por oxidação *microarc* (MAO), a qual na superfície dos implantes de titânio pode fornecer um revestimento de TiO_2 biofuncional poroso com adequada adesão ao substrato. A incorporação de Ag era esperada para melhorar a capacidade antibacteriana dos revestimentos com TiO_2 . A atividade antibacteriana foi avaliada por meio da exposição de espécimes para *Staphylococcus aureus* e comparando a reação dos agentes patogênicos para Ti-MAO-Ag com controle Ti-MAO. O Ti-MAO-Ag inibiu mais a colonização bacteriana do que a amostra de controle. A capacidade antibacteriana do revestimento foi melhorada pelo aumento da quantidade de implantação de íons de prata e essa capacidade antibacteriana melhor pode ser um resultado da interação entre a prata nanocristalina e a membrana bacteriana. Além disso, a citocompatibilidade foi avaliada por meio da cultura de colônias de células nas amostras. Portanto, a modificação da superfície por meio deste processo, combinando a MAO e implantação de íons de prata é útil para proporcionar atividade antibacteriana e citocompatibilidade em exposições com implantes de titânio (ZHANG, P.; ZHANG, Z.; LI, 2013).

Estudos realizados com cateteres de silicone revestidos com Ag/dióxido de titânio (TiO_2), com deposição de nanopartículas de prata, tanto sobre a parede interior como a parede exterior, por TiO_2 e fotocatalise, produziram resultados excelentes (YAO *et al.*, 2008).

Uma aplicação dos cateteres de silicone revestidos com TiO_2 , com uma propriedade autoesterilizante e de autolimpeza foi proveniente da combinação com a radiação de luz UV (OHKO *et al.*, 2001).

5.5 Radiação Ionizante

A radiação ionizante pode causar mudanças nas propriedades físicas e químicas dos materiais plásticos como:

- a) cisão e reticulação simultaneamente das cadeias poliméricas e o seu efeito na rede cristalina, os quais vão determinar as mudanças nas propriedades do polímero;
- b) formação de gases e produtos da radiólise, com aumento ou diminuição da massa molar, e

c) formação de uma rede tridimensional (STRINGER; PEPPAS, 1996); (INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, 1992).

A natureza e a extensão das mudanças químicas e físicas nos polímeros, induzidas pela radiação ionizante, são influenciadas pelos seguintes fatores: oxigênio atmosférico durante a irradiação, agentes antioxidantes, estabilizantes e deslizantes, que são adicionados ao polímero para melhorar o seu desempenho e outros aditivos. O oxigênio presente durante a irradiação pode provocar a cisão oxidativa da cadeia polimérica e oxidação do polímero, levando a formação de peróxidos, alcoóis, frações carbonílicas, monóxidos e dióxidos de carbono e vários compostos contendo oxigênio de massa molar baixa. Geralmente, o valor da quantidade de gases produzida é majorado com o aumento da dose de radiação (KILLORAN, 1972); (RIGHANAKOS *et al.*, 1999).

Os processos de irradiação economicamente viáveis para aplicação industrial, baseiam-se na radiação gama obtida pela desintegração do radionuclídeo ^{60}Co (fontes gama de ^{60}Co) e radiação proveniente de elétrons de alta energia (elétrons acelerados), denominados feixe de elétrons (“electron beam”) gerados em dispositivos aceleradores de partículas (aceleradores de elétrons) (AZUMA *et al.*, 1984); (INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, 1992).

A radiação ionizante, utilizada neste trabalho, foi proveniente de um irradiador de ^{60}Co , raios γ para impregnação de nanopartículas de prata no cateter de poliuretano revestido com óxido de titânio, e também foi utilizado o acelerador de elétrons, para esterilização dos cateteres com revestimentos de óxido de titânio, contendo nanopartículas de prata, para posterior avaliação da atividade antimicrobiana.

A grande vantagem do uso do processo de irradiação está na não utilização de aditivos, ou seja, é um processo limpo; além do mais o produto obtido já sai esterilizado. Habitualmente, esses cateteres são esterilizados com óxido de etileno, reagente cancerígeno, assim sendo a utilização da radiação ionizante, leva a obtenção desses cateteres esterilizados, por um processo limpo e rápido, sendo uma possibilidade viável.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Materiais

Os materiais utilizados neste trabalho foram o Cateter Venoso Central (CVC) de poliuretano; solução aquosa de poli(N-vinil-2-pirrolidona) (PVP), como revestimento polimérico; soluções aquosas de nanopartículas de prata de diversas procedências e óxido de titânio puro, como revestimento, sintetizado pelo método sol-gel.

6.1.1 Cateter de Poliuretano

O poliuretano, PU, utilizado neste trabalho está presente em Cateteres Venosos Centrais (CVC), da JOHNSON & JOHNSON, (1992), e contém metades halogenadas suficientes na estrutura do polímero para tornar os poliuretanos radiopacos. Esses poliuretanos podem ser preparados pelo emprego de dióis halogenados e/ou reagentes de diisocianato halogenado. Em alguns casos, os cateteres são opticamente transparentes, além de serem radiopacos. Adicionalmente, os cateteres contêm virtualmente resistência à dobra, em cerca de pelo menos 85 % de recuperação de volume de fluxo após a dobra. A empresa fornecedora dos cateteres foi a Biomedical Equipamentos e Produtos Médico-Cirúrgicos Ltda (BIOMEDICAL, 2010).

6.1.2 Poli(N-vinil-2-pirrolidona) (PVP)

O sistema polimérico avaliado para utilização nos revestimentos de cateteres com nanopartículas de prata, para atividade antimicrobiana, foi o poli(N-vinil-2-pirrolidona).

O polivinilpirrolidona, PVP, que foi utilizado neste trabalho é o da GAF CHEMICALS CORPORATION (nome comercial: PLASDONE K-90 Povidone). Apresenta-se na forma de um pó branco, livre de resíduos e com grau de pureza elevado (grau médico). O Plasdona K-90 é inócuo e sóluvel em água. Sua toxicidade é muito pequena e não tem mostrado efeitos adversos, pode ser estocado sob as condições usuais, entretanto na estocagem por um período de tempo longo, há uma diminuição pequena na massa molar. O PVP é muito higroscópico e por esse motivo, é necessário cuidados adequados para prevenir o excesso de absorção de umidade durante a sua estocagem ou manuseio (MIRANDA, 1999).

Na TAB. 1 são apresentadas as principais características do Plasdone K-90, da GAF CHEMICALS CORPORATION.

TABELA 1 - Principais características do PVP (Plasdone K-90)

PROPRIEDADE	UNIDADE	VALOR
Aparência		Pó branco
pH (5% sol aquosa)		3,0 - 7,0
Teor de nitrogênio	%	11,5 - 12,8
Valor de K*		85 - 95
Massa molar média ponderal ($\overline{M}_w$)	g/mol	$1,2 \times 10^6$
Massa molar média numérica ($\overline{M}_n$)	g/mol	$3,6 \times 10^5$
Temp. máxima de estabilidade (T_{max})	° C	210
Temp. de transição vítrea (T_g)	° C	174
Parâmetro de solubilidade (δ)	$(J/cm^3)^{1/2}$	12,6
Tamanho médio das partículas	μm	120
Polidispersividade (M_w/M_n)		3,3
Densidade aparente	g/cm ³	0,4 - 0,6

* Valor K: a GAF utiliza a técnica do valor K, com a utilização da viscosidade relativa na equação de Fikentscher:

$$K = \{ [300C \log z + (C + 1,5C \log z)^2]^{0,5} + 1,5z - C \} / (0,5C + 0,0003C^2)$$

Em que: z = viscosidade relativa da solução da amostra comparada a do solvente;

C = concentração da solução em gramas de PVP por 100 mL.

6.1.3 Nanopartículas de Prata

Neste trabalho foram utilizadas nanopartículas de prata de diferentes procedências:

- Nanopartículas de prata sintetizadas pelo Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT) e apresentadas na TAB. 2.

TABELA 2 - Nanopartículas de prata sintetizadas pelo IPT

LOTES	DESCRIÇÃO
PRIMEIRO LOTE- Amostra 1	1 mmol/L Ag e 1 mmol/L citrato de sódio
PRIMEIRO LOTE - Amostra 3	1 mmol/L Ag, 1 mmol/L citrato de sódio a 25 % (v/v) isopropanol
SEGUNDO LOTE - Amostra 1R	1 mmol/L Ag e 1 mmol/L citrato de sódio e pH 9 a 85 °C
SEGUNDO LOTE - Amostra 2R	1 mmol/L Ag e 1 mmol/L citrato de sódio e pH 9 a 95 °C
SEGUNDO LOTE - Amostra 3R	1 mmol/L Ag e 1 mmol/L citrato de sódio e pH 9 a 80 °C
SEGUNDO LOTE - Amostra 4R	1 mmol/L Ag e 1 mmol/L citrato de sódio e pH 7 a 95 °C
SEGUNDO LOTE - Amostra 5R	1 mmol/L Ag e 1 mmol/L citrato de sódio e pH 7 a 90 °C
SEGUNDO LOTE - Amostra 6R	1 mmol/L Ag e 1 mmol/L citrato de sódio e pH 7 a 85 °C

- Nanopartículas de prata sintetizadas pela Universidade Federal de São Carlos (UFSCar-USP) e apresentadas na TAB. 3.

TABELA 3 - Nanopartículas de prata sintetizadas pela UFSCar

ÚNICO LOTE	DESCRIÇÃO
Amostra I- I'-III- III'-IV-IV'	Ensaio tipo "GREEN" com redutor sacarose e tensoativo gelatina

- Nanopartículas de prata fornecidas pela TNS, *Competence in Nanotechnonology*, NpAg_925, produto antimicrobiano monocomponente; como emulsão aquosa; atóxica; conteúdo sólido de aproximadamente 1000 ppm; cor marrom amarelada; pH aproximadamente 4,0; densidade a 25 °C, 1,0 g/cm³; tamanho médio de 10 nm; comprimento de onda máximo de 400 a 410 nm.

- Nanopartículas de prata fornecidas pela SIGMA-ALDRICH CHEME GmbH, tamanho de 10 nm (TEM); em solução aquosa tamponada, contendo citrato de sódio como estabilizante; concentração de 0,02 mg/mL $\pm$ 5 % (massa); densidade a 25 °C, 0,997 g/L.

6.2 Métodos

6.2.1 Revestimento do Cateter Venoso Central (CVC) de Poliuretano com Óxido de Titânio

A obtenção de TiO₂ puro pelo método sol-gel foi realizada em um balão reacional de 250 mL, com a adição de 100 mL de H₂O e 1,5 mL de HNO₃ (65 % v/v) e mantido o sistema a 50 °C, com posterior agitação rigorosa e com adição lenta de 16,5 mL de tetraisopropóxido de titânio IV. Em seguida, esse sistema foi mantido em agitação vigorosa por 12 horas e seco em estufa a 80 °C (HEWER, 2010).

A aparelhagem que foi utilizada para revestir os cateteres de poliuretano com TiO₂ mediante tetraisopropóxido de titânio em meio ácido, mantidos à temperatura de 60 °C e submersos por três minutos e secagem posterior por uma hora à 60 °C em estufa, é mostrada na FIG. 14.

FIGURA 14 – Aparelhagem para revestimento do Cateter Venoso Central (CVC) de poliuretano com óxido de titânio

6.2.2 Irradiação das Amostras

A irradiação foi realizada com feixe de elétrons utilizando um acelerador de elétrons Dynamitron JOB 188 de energia de 0,5 a 1,5 MeV e corrente de 0,3 a 25 mA, do Centro de Tecnologia das Radiações do IPEN - CNEN/SP, mostrado na FIG. 15.

FIGURA 15 - Acelerador de elétrons Dynamitron JOB 188

A aplicação de revestimento de PVP, nas amostras de Cateter Venoso Central (CVC), foi realizada por imersão dos cateteres em solução aquosa de PVP 350 mg/L, 10 % v/v, contendo nanopartículas de prata, fornecidas pelo Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT) (TAB. 2) e pela Universidade Federal de São Carlos (UFSCar-USP) (TAB.3), como mostrado na FIG. 16. Essas amostras foram irradiadas com doses de 25 kGy, no acelerador de elétrons Dynamitron JOB 188, para incorporação das nanopartículas de prata nas amostras de Cateter Venoso Central (CVC), em presença de solução aquosa de PVP.

FIGURA 16 – Amostras de Cateter Venoso Central (CVC) para incorporação de nanopartículas de prata, IPT e UFSCar-USP em PVP

As amostras de cateteres revestidas com óxido de titânio foram impregnadas com nanopartículas de prata, N CHEME GmBhpAg_925, fornecidas pela TNS, *Competence in Nanotechnonology*, e pela SIGMA-ALDRICH, por meio do processo de irradiação com doses de 25 kGy e 50 kGy, com taxa de dose de 1,03 kGy/h, no irradiador “Gammacell 220”.

Todas as amostras de cateteres sem revestimento e revestidos com nanopartículas de prata, foram submetidas posteriormente à dose de 25 kGy, utilizada para esterilização de materiais, com taxa de dose de 28 kGy/s, no acelerador de elétrons.

A radiação gama proveniente de um irradiador “Gammacell 220”, (FIG. 17) do Centro de Tecnologia das Radiações do IPEN - CNEN/SP foi também utilizada, cuja grande diferença em relação ao acelerador de elétrons é a sua taxa de dose baixa.

FIGURA 17 – Irradiador “Gammacell 220”

6.3 Caracterização de Materiais

6.3.1 Espectroscopia de Absorção no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) é uma ferramenta utilizada na identificação de grupos funcionais e nos estudos de conformação e estrutura de macromoléculas. A espectroscopia vibracional estuda a transição das vibrações normais moleculares que podem ser do tipo estiramento de ligação, deformação angular e torção. A obtenção do espectro no infravermelho é o modo mais utilizado, pois é a configuração básica de maior parte dos espectrômetros IR do mercado, constituindo-se assim num modo universal, na medida em que pode ser aplicado em amostras sólidas, líquidas, gasosas e polímeros (KAWANO, 2004).

Os ensaios de espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foram realizados no espectrômetro marca Perkin Elmer, modelo Spectrun One, acoplado com dispositivo Universal ATR (“Sampling Acessory”), com utilização direta de todas as amostras. O equipamento possui um programa de comparação que permite correlacionar as diferenças espectrais ocorridas entre as amostras analisadas, no intervalo de 400 a 10000 cm^{-1} com resolução de 2 cm^{-1} , no Laboratório do Centro de Tecnologia das Radiações (CTR) do IPEN-CNEN/SP, como mostrado na FIG. 18.

FIGURA 18 - Espectrômetro marca Perkin Elmer, modelo Spectrun One, acoplado com dispositivo Universal ATR (“Sampling Acessory”)

6.3.2 Termogravimetria (TG)

As amostras de cateteres irradiadas e não irradiadas foram caracterizadas por Termogravimetria (TG) e Termogravimetria Derivada (DTG), por meio de uma termobalança modelo TGA-51 (Shimadzu), como mostrado na FIG. 19, na faixa de temperatura de 25 a 900 $^{\circ}\text{C}$, sob uma atmosfera de ar (50 mL/min), razão de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, e cadinho de platina contendo aproximadamente 5 mg de amostra. Antes dos ensaios, foi obtida curva em branco para avaliar a linha base do sistema. A calibração do equipamento TGA-51 foi realizada conforme a norma ASTM (1582-04). A verificação das

condições de medidas foi realizada utilizando-se um padrão de oxalato de cálcio monohidratado com pureza 99,99 %, de procedência Merk.

FIGURA 19 - Termobalança modelo TGA-51 (Shimadzu)

6.3.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As amostras de cateteres irradiadas e não irradiadas foram caracterizadas por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), por meio da célula DSC modelo DSC-50 (Shimadzu), como mostrado na FIG. 20, sob uma atmosfera dinâmica de N_2 (100 mL/min), na faixa de temperatura de $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $600\text{ }^{\circ}\text{C}$, razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, em cadinho de alumínio parcialmente fechado contendo cerca de 2 mg de amostra. Antes dos ensaios foram obtidas curvas em branco para se avaliar a linha base do sistema, nas mesmas condições das medidas, sem utilização de cápsulas de referência e de amostra. A célula DCS foi calibrada antes dos experimentos, empregando-se as substâncias padrão índio ($T_{\text{fusão}} = 156,6\text{ }^{\circ}\text{C}$; $\Delta H_{\text{fusão}} = 28,7\text{ J/g}$) e zinco ($T_{\text{fusão}} = 419,5\text{ }^{\circ}\text{C}$) metálicos com pureza de 99,99 %.

FIGURA 20 - Célula DSC modelo DSC-50 (Shimadzu)

6.3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura tem como principal aplicação a avaliação da forma da superfície da amostra. Além de informações estruturais de topografia, também podem ser obtidas informações sobre a composição química da superfície da amostra.

O princípio de funcionamento do microscópio eletrônico de varredura consiste na emissão de feixes de elétrons por um filamento capilar de tungstênio (eletrodo negativo), mediante a aplicação de uma diferença de potencial que pode variar de 0,5 a 30 KV. Essa variação de voltagem permite a variação da aceleração dos elétrons, e também provoca o aquecimento do filamento. A parte positiva em relação ao filamento do microscópio (eletrodo positivo) atrai os elétrons gerados, resultando numa aceleração em direção ao eletrodo positivo. A correção do percurso dos feixes é realizada pelas lentes condensadoras que alinham os feixes em direção à abertura da objetiva. A objetiva ajusta o foco dos feixes de elétrons antes dos elétrons atingirem a amostra a ser analisada.

Os testes foram realizados em um microscópio eletrônico de varredura da marca PHILIPS- EDAX, modelo LX 30, do Centro de Ciência e Tecnologia de Materiais (CCTM) do IPEN-CNEN/SP, como mostrado na FIG. 21. A preparação das amostras foi

realizada com cobertura ultrafina de ouro, material eletricamente condutivo, depositado por evaporação de baixo vácuo, *sputtering*, no porta-amostra, *stub*.

FIGURA 21 - Microscópio eletrônico de varredura PHILIPS-EDAX, modelo LX 30

Utilizou-se também um microscópio eletrônico de varredura da marca JEOL modelo JSM-840A “Scanning Microscope”, do Instituto de Física da Universidade de São Paulo, como mostrado na FIG. 22; e um da marca FESEM JEOL modelo JSM-7401F, do Centro Analítico de Instrumentação da Universidade de São Paulo, Central Analítica do Instituto de Química como mostrado na FIG. 23. As amostras foram preparadas utilizando diretamente o adesivo, fita de carbono, no *stub* e fixação posterior da amostra no mesmo.

FIGURA 22 – Microscópio eletrônico de varredura JEOL
modelo JSM-840A “Scanning Microscope”

FIGURA 23 - Microscópio eletrônico de varredura FEG-SEM JEOL JSM-
7401F canhão de emissão de campo

6.3.5 Microscopia de Força Atômica (AFM)

A microscopia de força atômica compõe-se de um *cantilever* de silício ou nitreto de silício (escala micrométrica) com uma ponta aguda (escala nanométrica) que é usado para varrer a superfície da amostra. Quando a ponta se aproxima da superfície da amostra, forças de repulsão/atração levam a deflexão do *cantilever* que obedecem as leis de Hooke. A deflexão é medida por fotodiodos que captam a reflexão de um feixe de raio laser a partir do topo do *cantilever*. As amostras foram coladas numa fita dupla face em um disco de metal (ferro) de 20 mm de diâmetro de 1 mm de espessura e com tamanho da varredura xy, máximo 100 microns e mínimo 0,5 microns. O teste foi executado em um microscópio de varredura por Sonda, da marca Jeol, modelo JSPM 5200, do Centro de Ciência e Tecnologia de Materiais (CCTM) do IPEN-CNEN/SP, como mostrado na FIG. 24.

FIGURA 24 - Microscópio eletrônico de varredura por Sonda, JEOL modelo JSM 5200

6.3.6 Espectrometria Óptica de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES)

A espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) oferece como características: sensibilidade elevada, análise multielementar simultânea, rapidez, faixa dinâmica linear ampla, precisão e exatidão elevadas e limites de detecção favoráveis.

A espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) é uma ferramenta indispensável para a análise química elementar, livre de interferências, e um método analítico para uma gama de aplicações ampla. O plasma é fonte de temperatura alta que minimiza efeitos de matriz e produz sensibilidade adequada à maioria dos metais e alguns não metais, em diversas ordens de grandeza de concentração e é muito utilizado em análises de matrizes complexas.

A preparação das amostras foi realizada primeiramente com um processo de digestão ácida, (ou abertura) por meio de ácido nítrico e ácido fluorídrico a 100 °C, a fim de remover a parte orgânica presente e tomando o cuidado para que as amostras estivessem homogêneas.

A análise foi executada em um espectrômetro óptico de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES, Radial) da marca Spectro, modelo Arcos, na linha de emissão de Ti: 334,941 nm, no Centro Analítico de Instrumentação da Universidade de São Paulo, Central Analítica do Instituto de Química, como mostrado na FIG. 25.

FIGURA 25 - Espectrômetro Óptico de Emissão Atômica com Plasma indutivamente acoplado da marca Spectro, modelo Arcos com visão radial

6.3.7 Espectroscopia Raman

A espectroscopia de absorção no infravermelho (IR) e de espalhamento Raman tem um papel importante no estudo e caracterização dos catalisadores e dos subprodutos de degradação, pois trazem informações sobre as ligações químicas presentes na molécula, interações moleculares, cristalinidade, entre outras. Ambas são técnicas vibracionais e são complementares, porém os fenômenos físicos que as suportam são distintos (SOUZA, 2013).

A espectroscopia Raman é uma técnica que usa uma fonte monocromática de luz a qual, ao atingir um objeto, é espalhada por ele, gerando luz de mesma energia ou de energia diferente da incidente. No primeiro caso, o espalhamento é chamado de elástico e não é de interesse, mas no segundo, espalhamento inelástico é possível obter muitas informações importantes sobre a composição química do objeto a partir dessa diferença de energia.

Na prática, um feixe de radiação laser (monocromática) portanto, de potência baixa é usado para iluminar pequenas áreas do objeto de interesse e ao incidir sobre a área definida, é espalhado em todas as direções, sendo que uma pequena parcela dessa radiação é espalhada inelasticamente, isto é, com frequência (ou comprimento de onda) diferente da incidente ($E = h\nu$ ou $E = h.c.\lambda^{-1}$). Esse fenômeno foi observado experimentalmente em 1928 por Chandrasekhara Venkata Raman, na Índia e, por esse motivo, foi chamado de efeito Raman. É utilizado um microscópio óptico convencional no qual a objetiva, tanto serve para focalizar o feixe incidente na amostra, quanto para coletar a radiação que é espalhada por ela, e permite o estudo de áreas de até $1\text{ }\mu\text{m}$ (10^{-6} m) de diâmetro, como é mostrada na FIG. 26.

FIGURA 26 - Objetiva do microscópio da microscopia Raman

Como a diferença de energia entre a radiação incidente e a espalhada corresponde à energia com que os átomos presentes na área estudada estão vibrando e essa frequência de vibração permite descobrir como os átomos estão ligados e ter informação sobre a geometria molecular, sobre como as espécies químicas presentes interagem entre si e com o ambiente, entre outras coisas. É por esse motivo que essa ferramenta é tão poderosa, permitindo inclusive a diferenciação de polimorfos, isto é, substâncias que têm diferentes estruturas e, portanto, propriedades diferentes, apesar de terem a mesma fórmula química. Como não há somente um tipo de vibração, uma vez que geralmente as espécies químicas presentes são complexas, a radiação espalhada é inelasticamente constituída por um número muito grande de diferentes frequências (ou componentes espectrais) as quais precisam ser separadas e ter sua intensidade medida (FARIA; SANTOS; GONÇALVES, 1997).

A análise foi executada em um Espectrômetro Micro-Raman Renishaw InVia Reflex, com detector do tipo CCD (*charge coupled device*), com utilização direta de todas as amostras, resolução de 4 cm^{-1} , acoplado a um microscópio Leica DM2500, equipado com radiação laser He-Ne de estado sólido em 785 nm, do Laboratório de Espectroscopia Molecular, IQUSP, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, como é mostrado na FIG. 27.

FIGURA 27 - Espectrômetro Micro-Raman Renishaw InVia Reflex, com detector do tipo CCD (*charge coupled device*)

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O trabalho foi realizado em duas etapas, as quais estão mostradas na FIG. 28 e os resultados foram obtidos, com diversos procedimentos, relacionando diferentes revestimentos do Cateter Venoso Central (CVC).

FIGURA 28 - Esquema seguido na 1ª e 2ª parte do trabalho

7.1 1ª PARTE DO TRABALHO

Na primeira etapa do trabalho, foram utilizados Cateteres Venosos Centrais, CVC, sem revestimento e revestidos com PVP e posteriormente impregnados com nanopartículas de prata, fornecidas pelo IPT, em vários lotes, por meio da radiação ionizante, descritos anteriormente na TAB. 2, como também sintetizadas pela UFSCar USP, apresentadas na TAB. 3.

A irradiação para a impregnação das nanopartículas de prata nas amostras de Cateter Venoso Central (CVC), foi realizada, com doses de 25 kGy, no acelerador de elétrons Dynamitron JOB 188, em presença de solução aquosa de PVP. como mostrado anteriormente na FIG. 16.

Os resultados da primeira parte do trabalho foram obtidos utilizando diversos métodos como mostrado na FIG. 29.

FIGURA 29 – Esquema seguido na 1ª parte do trabalho

7.1.1 Espectroscopia de Absorção no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Por espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) houve a possibilidade da identificação de grupos funcionais na estrutura das macromoléculas, como poli(ésteruretano) e poli(eteruretano) em cateteres de várias procedências. O cateter de procedência da Biomedical Equipamentos e Produtos Médico-Cirúrgicos Ltda., foi escolhido para ser irradiado, como também, para as posteriores caracterizações. Portanto, os ensaios FTIR possibilitaram a identificação de grupos funcionais característicos do poli(eteruretano), em comparação ao espectro do poli(eteruretano), levando-se em consideração as bandas principais em 1090 cm^{-1} , (C–O–C) grupo éter; 3400 cm^{-1} , estiramento, (NH) uretano; 1700 cm^{-1} ao estiramento, (C=O) do grupo uretano, como é mostrado na FIG. 30 para o cateter não irradiado que está de acordo com os estudos realizados por KAWANO, (2004) e JIANGZ *et al.*, (2006). E paralelamente, no espectro de absorção de infravermelho (FTIR) do cateter de poliuretano irradiado mostrado na FIG. 30, com evidências das principais bandas em 1091 cm^{-1} , (C–O–C) grupo éter; 3318 cm^{-1} , estiramento, v (NH) uretano; 1693 cm^{-1} estiramento, v (C = O) grupo uretano, alterações significativas não foram observadas no poli(eteruretano).

Comparando ambos os espectros (FIG.30), foi possível constatar que não ocorreu modificação estrutural no material após a irradiação.

FIGURA 30 - Espectro IR do Cateter Venoso Central (CVC) não irradiado e irradiado

7.1.2 Termogravimetria (TG) – Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) de amostras não irradiadas e irradiadas.

Na FIG. 31 são mostradas as curvas TG/DTG e DSC da amostra de cateter não irradiado. As curvas TG/DTG evidenciaram perda de massa de 0,8 % entre 25 e 150 °C em razão da eliminação de água de umidade. O material é termicamente estável até cerca de 310 °C e se decompõe entre 310 e 500 °C com perda de massa de 79 % e com $T_{\text{pico DTG}}$ em 375 e 455 °C, indicando que o processo ocorre em duas etapas. A curva DSC, também evidenciou dois eventos térmicos, endo e exotérmico, na mesma faixa de temperatura

($T_{\text{pico DSC}}$ em 327 e 449 °C), relacionados com a decomposição térmica, porque estão na mesma faixa em que a TG/DTG mostrou perda de massa. As curvas TG/DTG ainda evidenciaram outra perda de massa entre 550 e 700 °C de 1,3 % que possivelmente esteja associada à decomposição térmica de algum material inorgânico empregado como carga na matriz polimérica, ou queima de material carbonáceo formado nas etapas anteriores. Na temperatura de 900 °C observou-se um resíduo que representa 20 % da massa inicial. Esse resíduo corresponde ao sulfato de bário empregado como carga inorgânica para a obtenção do cateter, comprovado por medidas de EDS, e espectroscopia Raman, em testes evidenciados posteriormente.

FIGURA 31 - Curvas TG/DTG e DSC obtidas a 10 °Cmin⁻¹, sob atmosfera dinâmica de ar, utilizando cerca de 15 mg (TG/DTG) e cerca de 2 mg (DSC) da amostra de Cateter Venoso Central (CVC) não irradiada

Para ampliar a caracterização da amostra de cateter realizou-se ensaios de DSC na faixa de temperatura de -100 °C a 120 °C, utilizando N₂ líquido, para a determinação da temperatura de transição vítrea (T_g) da matriz polimérica. Na FIG. 32 são mostradas as curvas DSC obtidas para a amostra submetida a dois ciclos de resfriamento/aquecimento. As temperaturas de transição vítrea obtidas no primeiro e segundo ciclo estão apresentadas

na TAB. 4, e o valor de T_g de uma amostra de PEU de acordo com a literatura (HUNG *et al.*, 2010). Os valores são concordantes, não deixando dúvidas que se trata de um poli(eteruretano).

FIGURA 32 - Curvas DSC obtidas a $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$, sob atmosfera dinâmica de N_2 da amostra de Cateter Venoso Central (CVC) não irradiada no intervalo de temperatura de -100°C a 120°C

Na TAB. 4 é apresentada a comparação das temperaturas obtidas na curva DTG (FIG. 31) da amostra de poli(uretano) empregada como cateter, com as temperaturas para amostra de material similar, relatadas na literatura (HUNG *et al.*, 2010) para amostra de material similar.

TABELA 4 - Resultados de TG/DTG e DSC do cateter e PEU poli(eteruretano)

MATERIAIS	DTG	DSC	
	T _{pico} (°C)	T _g (°C) 1º ciclo	T _g (°C) 2º ciclo
Cateter	375	-71,6	-70,9
	456		
PEU*	402,6	-72,3	

* (HUNG; *et al*, 2010)

Para avaliar a influência da radiação ionizante sobre o cateter, uma amostra do cateter foi irradiada com a dose de 25 kGy no acelerador de elétrons Dynamitron JOB 188, e em seguida foi caracterizada por DSC, nas mesmas condições da amostra do cateter não irradiada. O resultado obtido, conforme apresentado na FIG. 33, possibilitou concluir que a dose de radiação empregada não causou alterações significativas no cateter.

FIGURA 33 - Curvas DSC obtidas a 10 °C min⁻¹, sob atmosfera dinâmica de N₂ das amostras de Cateter Venoso Central (CVC) não irradiada e irradiada

7.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

- Ensaios com MEV foram realizados em cateteres sem revestimento, não irradiados, com cortes longitudinais cujas micrografias estão mostrados na FIG. 34 (a) internamente e (b) externamente da superfície do cateter.

FIGURA 34 – Micrografia de cateteres não irradiados e sem revestimentos (a) internamente e (b) externamente

De acordo com a FIG. 34, existem bastonetes internamente (a) e concavidades externamente (b), que permitem alojar as bactérias para a formação de biofilme.

- Ensaios com MEV/EDS foram realizados em cateteres sem revestimento e o elemento bário foi identificado na amostra do cateter não irradiado, como mostrado na FIG. 35.

FIGURA 35 – MEV/EDS de Cateter Venoso Central (CVC) sem revestimento

Na FIG. 35, a identificação da presença do elemento bário é o que caracteriza o Cateter Venoso Central (CVC) ser radiopaco e opticamente transparente.

- Ensaios com MEV/EDS foram realizados em cateteres com revestimento de nanopartículas de prata, fornecidas pelo IPT, em presença de PVP, como mostrado na FIG. 36.

FIGURA 36 – MEV/EDS de cateter com revestimento de nanopartículas de prata fornecidas pelo IPT, em presença de PVP

De acordo com a FIG. 36, foi verificado que as amostras de cateteres com revestimento de nanopartículas de prata, fornecidas pelo IPT, em presença de PVP apresentaram revestimento de nanopartículas de prata não homogêneo e disperso.

7.1.4 Microscopia de Força Atômica (AFM)

Os ensaios com AFM foram realizados em cateteres sem revestimento e cateteres com revestimento de nanopartículas de prata em presença de PVP, como mostrados nas FIG. 37 e 38, respectivamente.

FIGURA 37 – Micrografia de força atômica de Cateter Venoso Central (CVC) sem revestimento

FIGURA 38 – Micrografia de força atômica de Cateter Venoso Central (CVC) com revestimento de nanopartículas de prata fornecidas pelo IPT, em presença de PVP

Na FIG . 37 observou-se a ausência de prata e na FIG. 38 foi possível confirmar a existência de prata no Cateter Venoso Central (CVC) com revestimento de nanopartículas de prata em presença de PVP.

7.1.5 Teste em *IN VITRO*

Uma verificação da ação *in vitro* de amostras de Cateter Venoso Central (CVC) impregnado com nanopartículas de prata fornecidas pelo Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT) e pela Universidade Federal de São Carlos (UFSCar-USP), foi realizada, comparando o Cateter Venoso Central (CVC) revestido de nanopartículas de prata com o cateter sem revestimento e revestido com agente antimicrobiano e antisséptico.

A avaliação da colonização, a aderência e formação de biofilme frente a bactérias gram-negativas, gram-positivas e *Candida* spp., como também a inibição do crescimento microbiano foram realizadas, comparando cateteres revestidos e não revestidos frente à nanopartículas de prata e utilizando modelo de agar sólido simulando o sitio de inserção do Cateter Venoso Central (CVC) em diferentes momentos 7, 14 e 21 dias após implantação do CVC. Na FIG. 39 são mostrados alguns dos fragmentos de CVC impregnados com nanopartículas de prata e esterilizados para a realização dos referidos testes.

FIGURA 39 - Fragmentos esterilizados de Cateter Venoso Central (CVC) revestidos com nanopartículas de prata de diversas procedências.

O método empregado, teste de adesão, é aplicado nas amostras de cateter revestidos com nanopartículas de prata para avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), forneceu os resultados apresentados na TAB. 5, no teste de adesão (HANNA *et al.*, 2006).

TABELA 5 - Teste de adesão de cateter revestido com nanopartículas de prata

AMOSTRAS DE CATETER	<i>S. aureus</i> 29213	<i>P. aeruginosa</i> 27853
AMOSTRA 1	* 5.10^5	2.10^7
AMOSTRA 3	4.10^7	3.10^7
AMOSTRA CONTROLE	1.10^7	6.10^7

De acordo com HANNA *et al.*, (2006). o resultado de 5.10^5 obtido no teste de adesão apresentado na TAB.5, estabeleceu um critério relativamente aceitável.

O ensaio da inibição do crescimento imediato, Difusão em Mueller Hinton Agar (MHA) e Microdiluição em Mueller Hinton (MHSg), com as cepas: *P. aeruginosa* ATCC 27853; *P. aeruginosa* INCQS 230; *S. aureus* ATCC 29213 e *S. aureus* INCQS 039, é mostrado na FIG. 40.

FIGURA 40 - Teste de inibição do crescimento imediato dos fragmentos esterilizados de Cateter Venoso Central (CVC) revestidos com nanopartículas de prata

Mediante o ensaio da inibição do crescimento imediato, foi observado a ausência de inibição em todos os testes, com desenvolvimento bacteriano e posteriormente formação do biofilme.

7.2 2ª PARTE DO TRABALHO

Na segunda etapa do trabalho, Cateteres Venosos Centrais (CVC) foram revestidos com óxido de titânio, TiO_2 e posteriormente impregnados por meio da radiação ionizante, com nanopartículas de prata fornecidas pela TNS, Competence in Nanotechnology, NpAg_925, como também pela SIGMA-ALDRICH CHEME GmbH. Os resultados foram obtidos por diversos métodos como mostrado na FIG. 41.

FIGURA 41 – Esquema seguido na 2ª parte do trabalho

7.2.1 Revestimento do Cateter Venoso Central (CVC) de Poliuretano com Óxido de Titânio

A avaliação do procedimento de revestimento de óxido de titânio no Cateter Venoso Central (CVC), com a identificação da interface entre as superfícies de óxido de titânio e a de Cateter Venoso Central (CVC), sendo a mais clara do Cateter Venoso Central (CVC), é mostrada na micrografia na (FIG. 42).

FIGURA 42 – Micrografia de Cateter Venoso Central (CVC) com revestimento de TiO_2

Segundo a avaliação mostrada na FIG. 42, a mudança na superfície do Cateter Venoso Central (CVC) com o revestimento de óxido de titânio proporcionou a impregnação das nanopartículas de prata.

7.2.2 Irradiação do Cateter Venoso Central (CVC) revestido com Óxido de Titânio e com Nanopartículas de Prata

- As amostras de cateter revestido de óxido de titânio em solução aquosa de nanopartículas de prata, NpAg_925, fornecidas pela TNS, Competence in Nanotechnonology, foram irradiadas a 25 kGy e 50 kGy, no irradiador “Gammacell 220”, como é mostrado na FIG. 43.

FIGURA 43 – Cateter Venoso Central (CVC) revestido de óxido de titânio e nanopartículas de prata, fornecidas pela TNS, Competence in Nanotechnonology

Na FIG. 43, as amostras de Cateter Venoso Central (CVC) revestido de óxido de titânio e nanopartículas de prata, fornecidas pela TNS apresentaram uniformidade na mudança de coloração do cateter após a irradiação, em ambas as doses, 25 e 50 kGy, identificando a presença de prata, com coloração levemente marrom.

- As amostras de CVC revestido de óxido de titânio, em solução aquosa de nanopartículas de prata, fornecidas pela SIGMA-ALDRICH CHEME GmbH foram irradiadas a 25 kGy e 50 kGy, no irradiador “Gammacell 220”, como é mostrado na FIG. 44.

FIGURA 44 – Cateter Venoso Central (CVC) revestido de óxido de titânio e nanopartículas de prata fornecidas pela SIGMA-ALDRICH CHEME GmbH

Na FIG. 44, as amostras de Cateter Venoso Central (CVC) revestidas de óxido de titânio e nanopartículas de prata, fornecidas pela SIGMA-ALDRICH CHEME GmbH apresentaram impregnação não uniforme da prata após a irradiação, em ambas as doses, 25 e 50 kGy, com diversos depósitos de prata metálica.

7.2.3 Espectrometria óptica de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES)

Os ensaios com (ICP OES) foram realizados em cateteres com revestimento de óxido de titânio, cujos resultados são apresentados na TAB. 6, e em cateteres com revestimento de óxido de titânio impregnados com nanopartículas de prata, e irradiados com doses de 25 kGy e 50 kGy, no irradiador “Gammacell 220”, cujos resultados são mostrados na TAB. 7.

TABELA 6 - Determinações de Ti em amostras de cateteres revestidos com óxido de titânio por ICP OES

ELEMENTO	AMOSTRA 1	AMOSTRA 2
TITÂNIO	1,10 %	1,14 %

TABELA 7 - Determinações de Ti e Ag em amostras de cateteres revestidos com óxido de titânio e prata por ICP OES

ELEMENTO	25 kGy	50 kGy
TITÂNIO	0,96 %	0,96 %
PRATA	1,15 %	< 0,01 ppm

De acordo com as TAB. 6 e 7, os valores obtidos para os teores de titânio nos cateteres revestidos com óxido de titânio, como também nos cateteres revestidos com óxido de titânio e nanopartículas de prata, foram equivalentes tanto na dose de 25 kGy como na dose de 50 kGy.

Em relação aos valores obtidos para os teores de prata nos cateteres revestidos com óxido de titânio e nanopartículas de prata, nas doses de 25 kGy e 50 kGy, (TAB.7), observou-se que somente na dose de 25 kGy, a porcentagem de prata impregnada de 1,15 % é compatível com a estimada na literatura por espectroscopia de absorção atômica (AAS) em cerca de 2 a 4 % (SHAH *et al.*, 2008).

7.2.4 Espectroscopia Raman

Na FIG. 45 são mostrados os espectros Raman do Cateter Venoso Central (CVC) onde quatro pontos da amostra foram analisados (A-D).

FIGURA 45 - Espectro Raman do Cateter Venoso Central (CVC)

Os espectros Raman do Cateter Venoso Central (CVC) na FIG. 45, apresentaram uniformidade da amostra, uma vez que diferem somente em relação às intensidades relativas das bandas, mantendo-se constante os valores de frequência.

O espectro mostrado na FIG. 46 é identificado como “investigação geral”, corresponde a um espectro com maior região de números de onda investigados. Duas bandas em 2872 e 2929 cm^{-1} foram observadas e correspondem aos estiramentos C-H simétrico e assimétrico, respectivamente. Por outro lado, o estiramento simétrico deste grupo em 1442 cm^{-1} está presente no espectro Raman e IR, pois, as intensidades de espalhamento Raman de isocianato são estiramento assimétrico em 2275 cm^{-1} e estiramento simétrico em 1445 cm^{-1} (PARNELL; MIN; CAKMAK, 2003).

FIGURA 46 - Espectro Raman do Cateter Venoso Central (CVC) com revestimento de TiO_2 , investigação geral

De acordo com a FIG. 46, quanto à análise em região de maior frequência Raman, eram esperadas bandas relacionadas ao PU e as bandas referentes ao grupo aromático não foram evidenciadas (1612 e 1530 cm^{-1}). Foi observado que não há a presença da banda em 1732 cm^{-1} reportada como estiramento assimétrico $\text{N}=\text{C}=\text{O}$, embora essa banda seja observada no espectro IR.

O espectro mostrado na FIG. 47 é referente às vibrações do TiO_2 , sendo que as bandas em 450 e 614 cm^{-1} correspondem ao polimorfo rutilo. (SOUZA, 2013), como também a banda intensa em 987 cm^{-1} referente ao estiramento simétrico do grupo sulfato (WHITE, 2008).

FIGURA 47 - Espectro Raman do Cateter Venoso Central (CVC) revestido com TiO_2

Segundo a FIG. 47, a presença do polimorfo anatásio seria verificado pela existência de bandas em 395, 514 e 637 cm^{-1} , as quais não foram observadas em nenhum dos pontos (A,B,C e D) da amostra. Em relação à região de frequência Raman mais baixa correspondente ao polimorfo rutilo que se formou em maior quantidade. Observou-se também uma banda intensa em 987 cm^{-1} referente ao estiramento simétrico do grupo sulfato, proveniente do sulfato de bário, carga empregada em polímeros, que está presente em todos os pontos analisados com algumas diferenças em intensidade relativa.

Os polímeros devem ser capazes de serem radiopacos, e normalmente é realizado por meio da composição de cargas radiopacas, como sulfato de bário, para aumentar a sua visibilidade sob raios X (HELMUS; GIBBONS; CEBON, 2008).

Os espectros Raman das amostras de cateter revestido de óxido de titânio em solução aquosa de nanopartículas de prata, NpAg_925, fornecidas pela TNS, Competence in Nanotechnology, e irradiadas a 25kGy e 50kGy, no irradiador “Gammacell 220”, são mostradas na FIG. 48.

FIGURA 48 - Espectro Raman de amostras do Cateter Venoso Central (CVC) com revestimento de TiO_2 e nanopartículas de prata NpAg_925, submetidas a doses de 25 kGy e 50 kGy

Segundo a FIG. 48, os espectros Raman das amostras de cateter revestido de óxido de titânio em solução aquosa de nanopartículas de prata, NpAg_925, no irradiador “Gammacell 220”, evidenciam as mesmas bandas referidas anteriormente, tanto a 25 como a 50 kGy, demonstrando a equivalência em relação às duas doses referidas.

8 CONCLUSÕES

✓ Na primeira etapa do trabalho:

- Por espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) houve a possibilidade da identificação de grupos funcionais do Cateter Venoso Central (CVC), como poli(eteruretano) e após o processo de irradiação ionizante, nenhuma alteração expressiva foi observada.
- A avaliação do comportamento térmico do material polimérico a partir das perdas de massa obtidas nas curvas TG/DTG e da determinação da temperatura de transição vítrea (T_g) por DSC possibilitaram a utilização do polieteruretano na área da saúde. Os polieteruretanos possuem propriedades mecânicas excelentes e são biocompatíveis, com outros materiais médicos que são sensíveis à formação de filme microbiano.
- Os resultados termoanalíticos de materiais não irradiados e irradiados ressaltaram a utilização da esterilização com radiação ionizante com a vantagem de ser um processo limpo e rápido, isto é, não há aplicação de aditivos, e normalmente, esses cateteres são esterilizados com óxido de etileno, reagente cancerígeno, assim sendo, a radiação ionizante foi uma possibilidade viável.
- Ensaio com MEV em cateteres sem revestimento e não irradiados, em cortes longitudinais internamente e externamente à superfície do cateter, apresentaram em ambos, regiões de acomodações de bactérias, para a formação do biofilme.
- Ensaio com MEV/EDS realizados em cateteres não irradiados e sem revestimento, evidenciaram a presença do elemento bário, proveniente do sulfato de bário, o qual é uma carga utilizada em polímeros.
- Ensaio com MEV/EDS e com AFM realizados em cateteres com revestimento de nanopartículas de prata, em presença de PVP, evidenciaram a presença de prata, não homogênea e dispersa.
- Ação *in vitro* de amostras de Cateter Venoso Central (CVC) impregnado com nanopartículas de prata, em relação à colonização, aderência e formação de biofilme, apresentou resultado relativamente concebível, de acordo com a literatura.

- ✓ Na segunda etapa do trabalho:
 - O revestimento com TiO_2 evidenciou a modificação da superfície do Cateter Venoso Central (CVC), proporcionando uma melhor aderência das nanopartículas de prata.
 - As análises de espectroscopia Raman possibilitaram a identificação das seguintes regiões:
 - Região de maior frequência Raman, bandas PU;
 - Bandas de grupo aromático não evidenciadas (1612 e 1530 cm^{-1});
 - Bandas 455 e 614 cm^{-1} , polimorfo rutilo;
 - Banda 987 cm^{-1} , grupo sulfato (sulfato de bário), carga em polímeros, presente em todos os pontos analisados.
- ✓ As doses de radiação utilizadas neste trabalho foram pequenas, no sentido de não afetar a estrutura do poliuretano do Cateter Venoso Central (CVC), como também suas características principais como rigidez, flexibilidade e consistência para uma inserção correta.

9 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Determinação da concentração ideal de nanopartículas de prata para a atividade antimicrobiana e para a aderência ao óxido de titânio, por meio da radiação ionizante.
- Avaliação da atividade antimicrobiana em CVC revestidos com óxido de titânio e nanopartículas de prata com as cepas *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACRYMED, Inc., 9560 SW Nimbus Avenue, Beaverton, OR 97008, USA; Oregon Health & Science University, 707 SW Gaines Road, Portland, OR 97221, USA, 2008.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. *Standard Practice for Calibration of Temperature Scale for Thermogravimetry*. ASTM, 2004.(ASTM 1582-04).

ANTUNES, F. S.; DAL'ACQUA, N.; BERGMAN, C. P.; GIOVANELA, M. Síntese, caracterização e aplicação de nanopartículas de prata como agentes antimicrobiano. Espectroscopia vibracional de absorção no infravermelho. *Estudos Tecnológicos em Engenharia*, v. 9, n.1, p. 20-26, 2013.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Infecção de Corrente Sanguínea *Orientações para Prevenção de Infecção Primária de Corrente Sanguínea Unidade de Investigação e Prevenção das Infecções e dos Efeitos Adversos –UIPEA Gerência Geral de Tecnologia em Serviços de Saúde – GGTES*, 2010.

AZUMA, K.; TANAKA, Y.; TSUNODA, H.; HIRATA, T.; ISHITANI, T. Effects of Film Variety on the Amounts of Carboxylic Acids from Electron Beam Irradiated Polyethylene film. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 48, n. 4, p. 2003-2008, 1984.

BACHLER, G.; GOETZ, N. V.; HUNGERBÜHLER, K. A physiologically based pharmacokinetic model for ionic silver and silver nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, v.8, p. 3365–3382, 2013.

BIOMEDICAL Equipamentos e Produtos Médico-Cirúrgicos Ltda. (Catálogo comercial). Disponível em: <<http://www.biomedical.ind.br>> Acesso em: 18 jul. 2010.

CHANDY, T. ; SHARMA, C. P. Prostaglandin E1-immobilized poly(vinyl alcohol)-blended chitosan membranes: blood compatibility and permeability properties. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 44, p. 2145-2156, 1992.

CONSTERTON, W.; STEWART, P.; GREENGERG, E. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, v. 284, p. 1318-1322, 1999.

DAMM, C.; MÜNSTEDT, H.; RÖSCH, A. The antimicrobial efficacy of polyamide 6/silver-nano- and microcomposites. *Materials Chemistry and Physics*, v. 108, p. 61-66, 2008.

DESAI, N. P.; HUBBELL, J. A. Surface physical interpenetrating networks of poly (ethylene-terephthalate) and poly (ethylene oxide) with biomedical applications. *Macromolecules*, v. 25, p. 226-232, 1992.

DUNN, M. J.; JIMENEZ, J. L.; BAUMGARDNER, D.; CASTRO, T.; MCMURRY, P. H.; SMITH, J. N. Measurements of Mexico City nanoparticle size distributions: observations of new particle formation and growth. *Geophysical Research Letters*, v. 31, n. 10, p. 1-4, 2004.

FARIA, D. L. A.; SANTOS, L. G. C.; GONÇALVES, N. S. Uma demonstração sobre o espalhamento inelástico de luz: Repetindo o experimento de Raman. *Química Nova*, v. 20, p. 319, 1997.

FENG, J.; ZENG, Y.; MA, C.; CAI, X.; ZHANG, Q.; TONG, M.; YU, B.; XU, P. The surfactant Tween 80 enhances biodesulfurization. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 72, p. 7390-7393, 2006.

FERREIRA, M. V. F.; ANDRADE, D.; FERREIRA, A. M.; Controle de infecção relacionada a Cateter Venoso central impregnado com antissépticos: revisão integrativa. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*, v. 45, n. 4, p.1002-1006, 2011.

FIGUEIREDO, C. S.; LOBO, D. R. Diferenciações entre infecções associadas e relacionadas ao uso de cateteres vasculares. *Intravenous Publicação Especializada em Terapia Intravenosa* ano VI • nº 16 • janeiro – maio de 2006. Disponível em: <http://www.bd.com/brasil/periodicos/intravenous/Intravenous_Ed16_VF.pdf> Acesso em: 18 dez. 2010.

FURNO, F.; MORLEY, K. S.; WONG, B.; SHARP, B. L.; ARNOLD, P. L.; HOWDLE, S. M.; BAYSTON, R.; BROWN, P. D.; WINSHIP, P. D.; REID, H. J. Silver nanoparticles and polymeric medical devices: a new approach to prevention of infection? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 54, n. 6, p. 1019-1024, 2004.

HANNA, H.; BAHNA, P.; REITZEL, R.; DVORAK, T.; CHAIBAN, G.; HACHEM, R.; RAAD, I. Comparative *In Vitro* efficacies and antimicrobial durabilities of novel antimicrobial central venous catheters. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 50, n.10, p. 3283-3288, 2006.

HELMUS, N. M.; GIBBONS, F. D.; CEBON, D. Biocompatibility: Meeting a Key Functional Requirement of Next-Generation Medical Devices. *Toxicologic Pathology*, v. 36, p. 70-80, 2008.

HEWER, T. L. R. *Preparação , modificação, caracterização e aplicação de catalisadores visando a degradação de compostos orgânicos poluentes por processos oxidativos avançados*. 2010. Tese (Doutorado) – Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo.

HSU, S-H.; TSENG, H-J.; LIN, Y-C. The biocompatibility and antibacterial properties of waterborne polyurethane- silver nanoparticles. *Biomaterials*, v. 31, p. 6796-6808, 2010.

HUNG, L. L.; SHENGHONG, A. D.; KENG, Y. F.; SHAN, H. S. Antibacterial properties of silver nanoparticles in three different sizes and their nanocomposites with a new waterborne polyurethane. *International Journal of Nanomedicine*, v.5, p. 1017–1028, 2010.

INFECTION CONTROL AND HOSPITAL EPIDEMIOLOGY v.29; n.51, 2008. (Disponível em: < <http://www.jstor.org/stable/full/10.1086/591060#h1>> Acesso em 10 de março 2012.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Radiation safety of gamma and electron irradiation facilities*. Vienna, 1992. (IAEA Safety Series, 107).

JANSEN, B.; SCHAREINA, S.; STEINHAUSER, H.; PETERS, G.; SCHUMACHER-PERDREAU, F.; PULVERER, G. Development of polymers with antiinfectious properties. *Polymeric Materials: Science and Engineering*, v. 57, p. 43-45, 1987.

JIANG, Z.; YUAN, K.J. ; LI, S. F.; CHOW , W. K. Study of FTIR spectra and thermal analysis of polyurethane. *Guang pu xue yu guang pu fen xi = Guang pu*, v.26, p. 624-628, 2006.

JOHNSON & JOHNSON. Kenneth, B. W.; Ronald, E. C.; Hentschel P.; Brodowski, W. *Cateter, tubo de poliuretano, poliuretano radiopaco*. USA Pat. PI9202569-2, 10 jul.1992.

KAWANO, Y. Espectroscopia vibracional de absorção no infravermelho. In: CANEVAROLO JUNIOR, S. V. (Ed.). *Técnicas de Caracterização de Polímeros*. São Paulo, S.P.: Artliber Editora, p. 17-38, 2004.

KNETSCH, M. L. W.; KOOLE, L. H. New strategies in the development of antimicrobial coatings: the example of increasing usage of silver and silver nanoparticles. *Polymers*, v.3, p. 340-366, 2011.

KILLORAN, J. J. Chemical and physical changes in food packaging materials exposed to ionizing radiation. *Radiation Research Reviews*, v. 3, p. 369-383, 1972.

LIAO, J.; ANCHUN, M.; ZHU, Z.; QUAN, Y. Antibacterial titanium plate deposited by silver nanoparticles exhibits cell compatibility. *International Journal of Nanomedicine*, v. 5, p. 337–342, 2010 a.

LIAO, J.; ZHIMIN, Z.; ANCHUN, M.; LEI, L.; JINGCHAO, Z. Deposition of silver nanoparticles on titanium surface for antibacterial effect. *International Journal of Nanomedicine*, v. 5, p. 261–267, 2010 b.

MACWAN, D. P.; PRAGNESH N. D.; CHATURVEDI, S., A review on nano-TiO₂ sol-gel type syntheses and its applications. *Journal of Materials Science*, v. 46, p.3669–3686, 2011.

MACWANA, S.; GANN, J.; SANDBERG, E.; GIBBINS, B. The antimicrobial efficacy of silver nanoparticles in the prevention of biofilm formation associated with medical device infections. ACRYMED, Inc. Beaverton, OR USA.

MARAMBIO, J. C.; HOEK, E. M. V. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *Journal of Nanoparticle Research*, v. 12, p.1531–1551, 2010.

MARTÍNEZ-CASTAÑÓN, G. A.; NIÑO-MARTÍNEZ, N.; MARTÍNEZ-GUTIERREZ, F.; MARTÍNEZ-MENDOZA, J. R. ; RUIZ, F. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. *Journal of Nanoparticle Research*, v. 10, p.1343–1348, 2008.

MERRIL, E. W.; DENNISON, K. A.; SUNG, C. Partitioning and diffusion of solutes in hydrogels of poly (ethylene oxide). *Biomaterials*, v. 14, p. 1117-1126, 1993.

MIRANDA, L. F. *Estudo de parâmetros de processo para a síntese de membranas hidrofílicas a base de poli(N-vinil-2-pirrolidona)*. 1999. Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP, São Paulo.

MÜLLER, J. *Manual de normas e rotinas*. Serviço de Controle de Infecção Hospitalar HOSPITAL UNIVERSITÁRIO: SCIH/HUJM , 2008.

NIEDERHUBER, J. E.; ENSMINGER, W.; GYVES, J. W.; LIEPMAN, M.; DOAN, K.; COZZI, E. Totally implanted venous and arterial access system to replace external catheters in cancer treatment. *Surgery*, v. 92, p. 706–712, 1982.

OHKO Y.; UTSUMI Y.; NIWA C.; TATSUMA T.; KOBAYAKAWA K.; SATOH Y.; KUBOTA Y.; FJISHIMA, A. Self-sterilizing and selfcleaning of silicone catheters coated with TiO₂ photocatalyst thin films: a preclinical work. *Journal of Biomedical Materials Research: Applied Biomaterials*, v. 58, p. 97–10, 2001.

PALADINI, F.; POLLINI, M.; TALA, A.; ALIFANO, P. A.; SANNINO, A. Efficacy of silver treated catheters for haemodialysis in preventing bacterial adhesion. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 23, p. 1983–1990, 2012.

PARNELL, S.; MIN, K.; CAKMAK, M. Kinetic studies of polyurethane polymerization with Raman spectroscopy. *Polymer*, v. 44, p. 5137–5144, 2003.

POURREZAEI, K.; SHVETS, I.; DELAURENTIS, M.; BOXMAN, R. L.; BEARD, R. B.; COOITORIU, N.; MUKHTAT, M.; LOGAN, D. A.; RASTOGI, R. Development of antimicrobial and antithrombogenic coatings for inside and outside of medical catheters. *Surface and Coatings Technology*, v. 68/69, p. 669-674, 1994.

RAMOS, D. D. *Estudo da degradação fotocatalítica do Metilviologênio em nanopartículas de TiO₂ e TiO₂/Ag*. 2012. Tese (Mestrado) – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul.

RICHARDS, G. A.; BRINK, A. J.; MCLINTOSH, R.; STEEL, H. C.; COCKERAN, R. Investigation of biofilm formation on a charged intravenous catheter relative to that on a similar but uncharged catheter. *Medical Devices: Evidence and Research*, v. 7, p. 219-224, 2014.

RIGHANAKOS, K. A.; KOLLER, W. D.; EHLERMANN, D. A. E.; BAUER, B.; KONTOMINAS, M. G. Effects of ionizing radiation on properties of monolayer and multilayer flexible food packaging materials. *Radiation Physics Chemistry*, v. 54, p. 527-540, 1999.

ROE, D.; KARANDIKAR, B.; BONN-SAVAGE, N.; GIBBINS, B.; ROULLET, J. B. Antimicrobial surface functionalization of plastic catheters by silver nanoparticles. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 61, p. 869–876, 2008.

ROGERO, S. O.; LORENZETTI, S. G.; CHIN, G. ; LUGÃO, A. B. Hidrogel de poli(1-vinil-2pirrolidona) (PVP) como matriz polimérica para sistema de liberação de fármaco. *Revista Brasileira de Pesquisa e Desenvolvimento*, v. 4, n. 3, p. 1447-1449, 2002.

ROOHPOUR, N.; MOSHAVERINIA, A.; MWASIKIEWICZ, J.; PAUL, D.; WILKS, M.; MILLAR, M.; VADGAMA, P. Development of bacterially resistant polyurethane for coating medical devices. *Biomedical Materials*, v.7, p. 1-10, 2012.

SAMUEL, U.; GUGGENBICHLER, J. P. Prevention of catheter-related infections : the potencial of a new nano-silver impregnated catheter. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 23S1, p. S75-S78, 2004.

SHAH, S. A. S.; NAG, M.; KALAGARA, T.; SINGH, S.; MANORAMA, V. S. Silver on PEG-PU-TiO₂ polimer nanocomposite films: an excellent system for antibacterial applications. *Chemistry Materials*, v. 20, n. 7, p. 2455-2460, 2008.

SILVA, A. J. R.; OLIVEIRA, F. M. D.; RAMOS, M. E. P. Infection associated with intravenous catheters – literature review. *Revista Referência*. II Série, n. 11, p. 125-134, 2009.

SOUZA, M. L. *Nanocompósitos metálicos para aplicações em processos fotoquímicos intensificados: efeitos de plasmon em fotocatalise*. 2013. Tese (Doutorado) – Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo.

SPENCER, R. C. Novel methods for the prevention of infection of intravascular devices. *Journal of Hospital Infection*, 43 (Supplement), S 127-S I 35, 1999.

STRINGER, J. L.; PEPPAS, N. A. Diffusion of small molecular weight drugs in radiation-crosslinked poly (ethylene oxide) hydrogels. *Journal of Controlled Release*, v. 42, p. 195-202, 1996.

TRINDADE, E.; HOFMEISTER, M. G.; FORNAZIER, C.; CRUZ, C. F.; ALMEIDA, K.; TORELLY, E. M.; OTUBO, E. L.; NOGUEIRA, J. O.; RAMOS, M.; MATTOS, M. C.; SILVA, R. G.; CARVALHO, W. L. Hospitais Sentinela da ANVISA Notificações de Tecnovigilância envolvendo Cateteres Venosos Centrais. NOTIVISA – 2007. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a52d3000474581028d3ddd3fbc4c6735/analiseCateteresVenosos.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 10 de março 2012.

WANG, A.; YIN, H.; REN, M.; LIU, Y.; JIANG, T. Synergistic effect of silver seeds and organic modifiers on the morphology evolution mechanism of silver nanoparticles. *Applied Surface Science*, v. 254, p. 6527–6536, 2008.

WHITE, S. N. Laser Raman spectroscopy as a technique for identification of seafloor hydrothermal and cold seep minerals. *Chemical Geology*, v. 259, n. 3-4, p. 240-252, 2009.

WIEBECK, H.; HARADA, J. *Plásticos de Engenharia. Tecnologia e Aplicações*. São Paulo, S.P.: Artliber Editora, p. 274-280, 2005.

YAO, Y.; OHKO, Y.; SEKIGUCHI, Y.; FUJISHIMA, Y. A.; KUBOTA, Y. Self-sterilization using silicone catheters coated with Ag and TiO₂ nanocomposite thin film. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v. 85B, p. 453–460, 2008.

ZHANG, P.; ZHANG, Z.; LI, W. Antibacterial TiO₂ coating incorporating silver nanoparticles by microarc oxidation and ion implantation. *Journal of Nanomaterials*, v. 2013, p.1-8, 2012.