

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E
HUMANAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOCiência**

Katia Cilene Ayako Inomata

**EFEITOS DA TERAPIA FOTODINAMICA COMO AGENTE
DESINFETANTE EM MATERIAIS HOSPITALARES**

SÃO BERNARDO DO CAMPO – SP
2019

Katia Cilene Ayako Inomata

**EFEITOS DA TERAPIA FOTODINAMICA COMO AGENTE
DESINFETANTE DE MATERIAIS HOSPITALARES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia a Universidade Federal do ABC para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Linha de pesquisa: Métodos aplicados em sistemas complexos.

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Aparecida da Ana.

Co-orientador: Prof. Dr. Arnaldo Rodrigues dos Santos Junior

SÃO BERNARDO DO CAMPO - SP

2019

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do ABC
Elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFABC
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Inomata, Katia Cilene Ayako

Efeito da Terapia Fotodinamica como agente desinfetante de
materiais hospitalares / Katia Cilene Ayako Inomata. — 2019.

146 fls. : il.

Orientadora: Patricia Aparecida da Ana

Coorientador: Amaldo Rodrigues dos Santos Junior

Tese (Doutorado) — Universidade Federal do ABC, Programa de
Pós-Graduação em Biotecnociência, São Bernardo do Campo, 2019.

1. Terapia Fotodinamica . 2. Biomateriais. 3. Citotoxicidade. 4.
Esterilização. 5. Fraturas. I. Ana, Patricia Aparecida da. II.
Junior, Amaldo Rodrigues dos Santos. III. Programa de
Pós-Graduação em Biotecnociência, 2019. IV. Título.

Este exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original, de acordo com as observações levantadas pela banca no dia da defesa, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

São Bernardo, 18 de outubro de 2019.

Assinatura do autor:

Assinatura do orientador:

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Salvador', written in a cursive style.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Fundação Universidade Federal do ABC
Avenida dos Estados, 5001 – Bairro Santa Terezinha – Santo André – SP
CEP 09210-580 · Fone: (11) 4996-0017

FOLHA DE ASSINATURAS

Assinaturas dos membros da Banca Examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata, KATIA CILENE AYAKO INOMATA realizada em 18 de Outubro 2019:

Prof.(a) Dr.(a) ANDREA CECILIA DORION RODAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC

Prof.(a) Dr.(a) FERNANDA DIAS DA SILVA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC

Prof.(a) Dr.(a) FREDERICO AUGUSTO PIRES FERNANDES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC

Prof.(a) Dr.(a) RENATO ARAUJO PRATES
UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO

Prof.(a) Dr.(a) CHRISTIANE BERTACHINI LOMBELLO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC

Prof.(a) Dr.(a) JEAN JACQUES BONVENT
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC

Prof.(a) Dr.(a) LUIZ FERNANDO GRESPAN SETZ
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC

Prof.(a) Dr.(a) SILVIA CRISTINA NUNEZ
UNIVERSIDADE BRASIL

Prof.(a) Dr.(a) PATRÍCIA APARECIDA DA ANA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC - Presidente

* Por ausência do membro titular, foi substituído pelo membro suplente descrito acima: nome completo, instituição e assinatura

Agradecimentos

À Universidade Federal do ABC.

A orientadora prof.^a Dr.^a Patrícia Aparecida da Ana, ao coorientador prof. Dr. Arnaldo Rodrigues dos Santos Junior, aos professores: Dra. Ilka Tiemy Kato Prates, Dr. Luiz Fernando Grespan Setz, Dr. Carlos Triveno, Dr. Nasser Ali Daghashtanli, aos professores do Curso de Pós-graduação em Biotecnociencia e aos professores que compuseram a banca.

Agradeço aos técnicos: Adrian, Tanil, Victor, Wilson, Marília, Rogério e Arnaldo, pelas orientações nos testes realizados em laboratório.

Aos colegas do curso de p-graduação: Paula Begliomini de Migueli, Daniela Figueredo, Matheus Del Valle, Ana Flavia Namba, Marcelo Lima.

À CAPES (projeto PROCAD-CAPES edital 071/2013, 88881.068505/2014-01) e CNPq (INCT # 465763/2014-6 – Photonics National Institute for Science and Technology – INFO) pelo auxílio financeiro.

À Central Multiusuário da UFABC pelo uso do Secador de ponto crítico e Microscópio eletrônico de varredura.

Ao curso de graduação em Engenharia Biomédica da UFABC pelo empréstimo de equipamentos.

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

Dedicatória

*Agradeço à Deus e aos espíritos de luz, que sempre me acompanharam.
Dedico este trabalho aos meus pais (Ko e Maria), ao meu esposo Alessandro, à
minha filha Karen, às minhas irmãs (Claudia e Lilian) e aos meus sobrinhos
(Larissa e Douglas). Agradeço-os por me apoiar incondicionalmente durante todo
o percurso.*

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”

José de Alencar

Resumo

Os procedimentos de lavagem, desinfecção e esterilização de materiais empregados em âmbito hospitalar visam a redução de infecções cruzadas, oferecendo assistência mais segura ao paciente. A Terapia Fotodinâmica (TFD) é eficiente para a eliminação de diferentes tipos de biofilme; contudo, ainda não foi testada quando ao potencial de descontaminação de materiais hospitalares. Considerando o atendimento de pacientes com fratura exposta, foi proposto o uso de uma bandeja para apoio ao membro fraturado para melhoria do procedimento de antisepsia. Para construção desta bandeja, o alumínio 1100 (AL), o aço AISI 304 (AÇO) e o polipropileno (PP) foram os materiais propostos. Entretanto, os mesmos não foram testados em relação às possíveis alterações microestruturais e na citotoxicidade quando submetidos à esterilização ou desinfecção sob diferentes repetições e diferentes técnicas, o que simula o uso clínico. Desta forma, este estudo objetivou avaliar o potencial da TFD com azul de metileno puro (AM) ou adicionado de ureia (AM+ureia) como fotossensibilizador, para desinfecção dos materiais que podem ser empregados para a construção da bandeja de apoio ao membro fraturado, assim como avaliar os efeitos da TFD e do calor úmido sob diferentes repetições na microdureza e citotoxicidade destes materiais. Para tal, este estudo foi dividido em três fases experimentais. Na primeira, um biofilme de *S. aureus* foi cultivado sobre amostras dos três materiais (AL, AÇO e PP) e, em seguida, foram tratados com calor úmido (autoclave, 121 °C, 30min), TFD com AM (AM 100 µM) ou TFD com AM+ureia (AM 30µM e ureia 2M) com os tempos de irradiação de 5 e 10 min. Para a TFD, foi empregado um laser ($\lambda=660$ nm, $P=100$ mW, $I= 111$ mW/cm²; doses de 33,33 J/cm² ou 66,66 J/cm², respectivamente). Após, a quantidade de biofilme foi avaliada. Na segunda fase, amostras dos mesmos materiais foram submetidas aos tratamentos com calor úmido e TFD com AM por diferentes repetições (1, 4, 28 e 120 repetições) e, em seguida, submetidas aos ensaios de microdureza Vickers (AL e AÇO) e dureza Shore D (PP). Na terceira fase, amostras dos três materiais foram tratadas com calor úmido, TFD com AM e TFD com AM+ureia por 1, 4, 28 e 120 repetições e, então, submetidas aos ensaios de citotoxicidade direta e indireta com fibroblastos Vero. A análise estatística foi realizada individualmente para cada variável resposta obtida, sendo o nível de significância estatístico adotado de 5%. A TFD com AM promoveu redução da quantidade de *S. aureus* em todos os materiais, sendo maior quando efetuada por 10 min de irradiação. A TFD com AM+ureia promoveu redução total dos microrganismos em todos os materiais após 10 min de irradiação. O calor úmido reduziu a microdureza Vickers do AL, após 28 e 120 repetições, e do AÇO após 120 repetições, assim como reduziu a dureza Shore D do PP após 120 repetições. A TFD não produziu alterações na microdureza de nenhum dos materiais testados em quaisquer repetições. A análise de citotoxicidade indireta evidenciou que o AL é citotóxico após tratamento com calor úmido por 120 repetições, assim como o PP apresenta citotoxicidade após tratamento com TFD com AM+ureia após uma única repetição. Foi possível concluir que a TFD com AM é uma técnica promissora para desinfecção de materiais empregados para uso hospitalar, sendo potencializada com a adição de uréia 2M ao fotossensibilizador, com melhores efeitos quando efetuada com tempo de irradiação de 10 minutos. Ainda, dos materiais avaliados, o aço AISI 304 parece ser o mais apropriado para confecção da bandeja de apoio aos membros a ser utilizada em âmbito hospitalar, independentemente do método de desinfecção ou esterilização adotado.

Palavras-chave: terapia fotodinâmica, calor úmido, biomateriais, citotoxicidade, microdureza, biofilme.

ABSTRACT

The procedures of washing, disinfecting and sterilizing materials used in hospitals aim to reduce cross-infections, offering safer patient care. Photodynamic Therapy (PDT) is efficient for the elimination of different types of biofilm; however, it has not yet been tested for the potential for decontamination of materials used in hospitals. Considering the care of patients with open fractures, it was proposed to use a tray to support the fractured limb to improve the antiseptic procedure. For the construction of this tray, 1100 aluminum (AL), AISI 304 steel (STEEL) and polypropylene (PP) were the proposed materials. However, they have not been tested for possible microstructural and cytotoxicity changes when subjected to sterilization or disinfection under different repetitions and different techniques, which simulates clinical use. Thus, this study aimed to evaluate the potential of PDT with pure methylene blue (AM) or added urea (AM+urea) as a photosensitizer, for disinfecting the materials that can be used to build the support tray for the fractured limb, as well as to evaluate the effects of PDT and moist heat under different repetitions in the microhardness and cytotoxicity of these materials. To this end, this study was divided into three experimental phases. In the first, a biofilm of *S. aureus* was grown on samples of the three materials (AL, STEEL and PP) and then they were treated with moist heat (autoclave, 121 °C, 30min), TFD with AM (AM 100 µM) or TFD with AM+urea (AM 30µM and urea 2M) with irradiation times of 5 and 10 min. For PDT, a laser was used ($\lambda = 660 \text{ nm}$, $P = 100 \text{ mW}$, $I = 111 \text{ mW/cm}^2$; doses of 33.33 J/cm^2 or 66.66 J/cm^2 , respectively). Afterwards, the amount of biofilm was evaluated. In the second phase, samples of the same materials were subjected to treatments with moist heat and TFD with AM for different repetitions (1, 4, 28 and 120 repetitions) and then subjected to Vickers microhardness (AL and STEEL) and Shore D hardness (PP). In the third phase, samples of the three materials were treated with moist heat, TFD with AM and TFD with AM+urea for 1, 4, 28 and 120 repetitions and then subjected to direct and indirect cytotoxicity tests with Vero fibroblasts. The statistical analysis was performed individually for each response variable obtained, considering 5% as the statistical significance level. TFD with AM reduced the amount of *S. aureus* in all materials, and the reduction was greater when performed for 10min of irradiation. PDT with AM+urea promoted the total reduction of microorganisms in all materials after 10min of irradiation. The moist heat reduced the microhardness of the AL, after 28 and 120 repetitions, and of the STEEL after 120 repetitions, as well as reduced the Shore D hardness of the PP after 120 repetitions. TFD did not produce changes in the microhardness of any of the materials tested. AL is cytotoxic after treatment with moist heat for 120 repetitions, just as PP presents cytotoxicity after treatment with PDT with AM+urea after a single repetition. It was possible to conclude that PDT with AM is a promising technique for disinfecting materials used in hospitals, and it is enhanced with the addition of 2M urea to the photosensitizer, with better effects when performed with a 10-minute irradiation time. Still, of the materials evaluated, AISI 304 steel seems to be the most appropriate for making the support tray for limb to be used in hospitals, regardless of the disinfection or sterilization method adopted.

Key words: photodynamic therapy, moist heat, biomaterials, cytotoxicity, microhardness, biofilm.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	- 16 -
2. OBJETIVOS	- 20 -
2.1 Objetivos específicos	- 20 -
3. REVISÃO DA LITERATURA	- 21 -
3.1 A bandeja utilizada durante o procedimento de antissepsia de membros com fratura exposta	- 21 -
3.2 Terapia Fotodinâmica	- 22 -
3.3 Processo de limpeza dos instrumentais cirúrgicos	- 26 -
3.4 Classificação de materiais/instrumentais cirúrgicos de acordo com o risco de infecção envolvida durante o uso	- 27 -
3.5 Desinfecção	- 28 -
3.6 Esterilização	- 31 -
3.6.1 Esterilização através do calor úmido da autoclave	- 33 -
3.6.2 Monitoramento da efetividade da esterilização em autoclave através dos indicadores químicos	- 35 -
3.6.3 Monitoramento biológico do ciclo de esterilização em autoclave	- 36 -
3.6.4 Ciclo de esterilização de uso imediato – <i>Flash</i>	- 37 -
3.7 <i>Staphylococcus Aureus</i>	- 37 -
3.8 Avaliação da citotoxicidade dos biomateriais	- 39 -
3.9 Materiais propostos para a bandeja de apoio para antissepsia de membros com a fratura exposta	- 42 -
3.9.1 Alumínio	- 42 -
3.9.2 Aço Inoxidável	- 46 -
3.9.3 Polipropileno	- 48 -
3.10 Ensaio de Dureza	- 53 -
3.10.1 Microdureza Vickers	- 53 -
3.10.2 Dureza Shore D	- 55 -
4. MATERIAL E MÉTODO	- 57 -
4.1 Delineamento experimental	- 57 -
4.2. Tratamentos	- 59 -
4.2.1 Tratamento com calor úmido	- 59 -
4.2.2. Tratamento com TFD	- 59 -
4.2.3 Fase experimental 1 – Teste microbiológico	- 62 -
4.2.3.1 Preparo do inóculo	- 62 -

4.2.3.2	Preparo das amostras para o ensaio microbiológico	- 62 -
4.2.3.3	Formação do Biofilme com <i>S. aureus</i>	- 63 -
4.2.3.4	Grupos experimentais	- 63 -
4.2.3.5	Preparo das amostras para a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC)	- 64 -
4.2.3.6	Preparo das amostras para análise morfológica	- 66 -
4.2.5	Fase experimental 2 - Ensaio de microdureza	- 67 -
4.2.5.1	Preparo das amostras	- 67 -
4.2.5.2	Tratamentos	- 67 -
4.2.5.3	Ensaio de microdureza Vickers	- 68 -
4.2.5.4	Ensaio da Dureza Shore D	- 68 -
4.2.4	Fase experimental 3 - Ensaio de citotoxicidade.....	- 68 -
4.2.4.1	Cultura celular	- 69 -
4.2.4.2	Toxicidade por contato indireto	- 70 -
4.2.4.3	Teste de contato direto	- 70 -
4.2.4.4	Análise morfológica e citoquímica	- 71 -
5.	Análise estatística	- 71 -
6	RESULTADOS	- 73 -
6.1	Testes do calor úmido	- 73 -
6.2	Fase experimental 1 – teste microbiológico.....	- 75 -
6.2.1	Adesão bacteriana após tratamento de superfície do alumínio 1100 e do aço AISI 304	- 75 -
6.2.2	Análise morfológica do biofilme com <i>S. aureus</i> cultivado sobre a superfície dos materiais	- 76 -
6.2.3	Efeitos da TFD com A.M. puro e com A.M. adicionado de ureia sobre o biofilme contendo <i>S. aureus</i> cultivado nos materiais.....	- 78 -
6.2.3	Efeito do calor úmido sobre o biofilme com <i>S. aureus</i> cultivado nos materiais	- 82 -
6.2.4	Análise morfológica dos materiais com biofilme após os tratamentos	- 83 -
-		
6.3	Fase experimental 2 – teste de microdureza.....	- 85 -
6.3.1	Microdureza Vickers	- 85 -
6.3.2	Dureza Shore D do polipropileno	- 86 -
6.4	Fase experimental 3 – teste de citotoxicidade	- 87 -
6.4.1	Testes de contato direto.....	- 87 -

6.4.2 Análise da morfologia celular após tratamentos	- 90 -
6.4.3 Análise citoquímica com azul de toluidina com pH 4,0	- 93 -
6.4.4 Análise citoquímica com Xylidine Ponceau com pH 2,5	- 96 -
6.4.5 Análise morfológica dos materiais após tratamento com TFD com A.M. adicionado de ureia	- 99 -
6.4.6 Análise citoquímica das amostras tratados com TFD com A.M. adicionado de ureia	- 100 -
6.4.7 Teste de contato indireto.....	- 102 -
7. DISCUSSÃO	- 109 -
8. CONCLUSÃO	- 116 -
8. REFERENCIAS	- 117 -
10. ANEXOS	- 138 -
10.1 Formulário do teste químico e biológico realizado na autoclave.	- 138 -

1. INTRODUÇÃO

A infecção hospitalar eleva os custos com a assistência, além do afastamento do paciente do seu serviço (SILVA, *et al.*,2017). É importante que os materiais ou instrumentais passem pelo processo de lavagem, desinfecção ou esterilização adequada, a fim de prevenir os riscos de infecções nosocomiais (BARBOSA, *et al.*,2017).

O avanço tecnológico trouxe o desenvolvimento de novas técnicas cirúrgicas e a fabricação de novos instrumentais e materiais sofisticados que, por sua vez, necessitam passar por limpeza, desinfecção ou esterilização para a reutilização (GRAZIANO; SILVA; PSALTIKIDS; 2014). Os materiais e instrumentais classificados como críticos e semicríticos (em contato direto com o paciente) devem passar por lavagem detalhada a fim de garantir a eficácia da esterilização e evitar a formação do biofilme (PSALTIKIDIS; RIBEIRO, 2011).

O aumento dos índices de acidentes por automóveis e motocicletas impacta de forma indireta no aumento de pacientes internados com fratura exposta, o que eleva o risco de infecção óssea (CARVALHO, 2016; CAMARGO, MAIA, 2017). A fratura exposta é ocasionada pelo alto impacto no momento do trauma, caracterizando-se por rompimento da pele, partes moles e exposição óssea, que podem entrar em contato com a área externa contaminada, facilitando o surgimento da infecção óssea (ZABEU *et.al* 2013).

Para assistência aos pacientes que tiveram fratura exposta, foi sugerido o uso de dispositivo (bandeja) para apoio ao membro fraturado durante o atendimento pela equipe de enfermagem. O apoio aos membros pode ser utilizado durante o procedimento de antisepsia, oferecendo base e destino apropriado aos líquidos drenados e, desta forma, contribuir para reduzir o risco de infecções ósseas (INOMATA, 2016). Este apoio é classificado como material semicrítico e, portanto, deve passar pelo processo de lavagem e esterilização após o uso. O processo de lavagem, desinfecção e esterilização é importante para evitar o risco de disseminação de infecções. Contudo, a bandeja ainda não se encontra em uso clínico pois trata-se de um dispositivo de grandes dimensões que apresenta dificuldades para esterilização nos equipamentos comercialmente disponíveis e, desta forma, há a necessidade de se buscar métodos alternativos para tal.

Os materiais propostos para a fabricação da bandeja para apoio ao membro fraturado foram o alumínio 1100, o aço AISI 304 e o polipropileno (PP) (INOMATA, 2016), tendo em vista que tais materiais apresentam características importantes para o manuseio, tais como possibilidade de limpeza, pouco peso, facilidade de transporte, resistência mecânica, dentre outras características (INOMATA, 2016). Contudo, dependendo do material empregado, os procedimentos empregados para lavagem, desinfecção e esterilização do dispositivo, por sua vez, podem resultar no desgaste com o decorrer do tempo, ocasionando um aumento de custos para sua reposição (LUCAS *et al*, 2018). Desta maneira, encontrar um material apropriado e uma forma de desinfecção adequada para o dispositivo de apoio ao membro fraturado se faz necessária para sua implementação na rotina hospitalar.

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é o nome de uma terapia empregada para eliminação de microrganismos; é realizada empregando-se três agentes principais: uma fonte de luz, um agente fotossensibilizador (FS) e oxigênio molecular (da atmosfera). Simplificadamente, o efeito fotodinâmico ocorre por meio da absorção de um fóton da luz pela molécula de um FS, elevando o nível de energia desta, passando de S_0 (estado fundamental) para S_1 (estado excitado). Neste estado, a molécula do FS poderá emitir fluorescência e retornar para o nível S_0 ou emitir calor, realizando a conversão interna entre sistemas e para o estado excitado tripleto. Em seguida, poderá ocorrer a reação do Tipo I, no qual o fotossensibilizador excitado transfere elétrons para um substrato oxidável (oxigênio molecular), formando radicais de cátions ou ânions citotóxicos, ou poderá ocorrer a reação do Tipo II, na qual há a formação do oxigênio singlete que reage com o substrato (tecido ou biofilme), levando também à morte celular (ABRAHAMSE; HAMBLIN; 2016).

A TFD foi uma técnica sugerida no século XX, na cidade de Munique, por Oscar Raab e seu professor Herman Von Tappiener, os quais observaram que a exposição da luz sobre corantes de acridina causava morte de protozoários (BAGNATO, INADA, FONTANA, 2008). Atualmente, a TFD tem sido empregada para o tratamento de câncer, de infecções localizadas e inativar microrganismos (MC COY, 2014; MAROTTI, 2013; LUCAS *et al*, 2018; ALMEIDA, SILVA, 2016).

O uso da terapia fotodinâmica (TFD) como agente desinfetante poderá contribuir para a redução das infecções em âmbito hospitalar, o que ainda não foi testado. O efeito da TFD sobre biofilme de *Staphylococcus aureus*, bactéria frequente na pele, por meio da utilização de um laser com comprimento de onda de 660 nm e com a potência de 10 J durante 285 s, promoveu redução significativa do número de bactérias (FREITAS *et al.*, 2017).

Um dos fotossensibilizadores que podem ser utilizados durante a TFD é o azul de metileno (A.M.), cuja molécula possui carga positiva e se liga à membrana da bactéria (TARDIVO *et al.*, 2005). O A.M. forma dímeros (duas moléculas juntas) e aumenta os agregados através do aumento da concentração da solução, que reduz a absorção do comprimento de onda de 664 nm para 610 nm. Em seguida, ocorre o aumento da força iônica, que reduz a formação do oxigênio singlete e da atividade antimicrobiana (NUNEZ, *et al.*, 2015). O uso da ureia com A.M. pode potencializar o efeito antimicrobiano, pois a ureia leva à desagregação do A.M., o qual age sobre a membrana celular e solubiliza o biofilme (NUNEZ, *et al.*, 2015; SANAWAR, *et al.*, 2018). A aplicação da TFD com o fotossensibilizador A.M., associado à ureia por 3 minutos, sobre o fungo *Candida albicans*, possibilitou a redução do mesmo em torno de 80% (NUNEZ *et al.*, 2015). O uso da TFD apresenta vantagens como ser eficiente, rápida, não gerar calor e não causar resistência bacteriana, tais como pode ocorrer com o uso de antibióticos.

Desta maneira, tendo em vista que os agentes de desinfecção e esterilização convencionalmente empregados em âmbito hospitalar podem causar desgaste aos materiais propostos para a construção da bandeja de apoio aos membros, a TFD pode ser uma terapia promissora para desinfecção da mesma, o que ainda não foi testado. Ainda, faz-se necessário encontrar uma forma de realizar a TFD de forma acessível e eficiente no interior do ambiente hospitalar, e que não gere desgaste ao material ou toxicidade aos tecidos expostos mesmo quando efetuada em múltiplas repetições, tendo em vista que a bandeja será reutilizada muitas vezes.

Considerando a escassez de trabalhos que verifiquem os efeitos microestruturais e citotóxicos da terapia fotodinâmica sobre os materiais sugeridos para a confecção do apoio ao membro, assim como a sua eficácia em biofilme

que possa estar sobre este apoio, o que viabilizaria seu uso em ambiente hospitalar, este estudo foi proposto.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é verificar o potencial da terapia fotodinâmica com azul de metileno como fotossensibilizador como meio para desinfetar os materiais que podem ser empregados para a construção do dispositivo (bandeja) de apoio ao membro fraturado a ser utilizado no procedimento de antissepsia em ambiente hospitalar.

2.1 Objetivos específicos

- Verificar os efeitos da TFD e do calor úmido sobre biofilme de *S. aureus* cultivado sobre alumínio 1100, aço AISI 304 ou polipropileno;
- Avaliar se a adição de ureia ao azul de metileno altera o efeito da TFD em biofilme de *S. aureus*;
- Verificar os efeitos na microdureza promovidos pela TFD e pela esterilização por calor úmido quando efetuados por múltiplas repetições;
- Verificar os efeitos da TFD e do calor úmido na citotoxicidade dos materiais quando efetuados por múltiplas repetições;
- Encontrar o melhor material para a construção do dispositivo de apoio ao membro (polipropileno, alumínio 1100 ou aço AISI 304) com base nos efeitos promovidos pelas diferentes técnicas propostas.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 A bandeja utilizada durante o procedimento de antissepsia de membros com fratura exposta

Com o aumento de acidentes automobilísticos e motociclísticos nos últimos anos, houve o aumento do número de pacientes com fraturas expostas, que elevou o risco de infecções em ambiente hospitalar (BRASIL, 2017). Um dos tratamentos iniciais das fraturas expostas é a lavagem das lesões com soro fisiológico e degermantes em sala cirúrgica (GIGLIO *et al.*, 2015).

Buscando-se facilitar tal procedimento pela equipe de enfermagem, foi proposta a construção de um dispositivo em forma de bandeja para apoio ao membro fraturado. A bandeja de apoio ao membro foi proposta para ser utilizado durante o procedimento de antissepsia em sala cirúrgica, oferecendo destino apropriado aos líquidos drenados, uma vez que evita que respingos de secreções caiam na mesa cirúrgica e no chão. Desta forma, são minimizados o risco de infecção e de queda pelos profissionais envolvidos. O uso da bandeja de apoio ao membro demonstrou efetividade após os testes de simulação realizados em sala cirúrgica (INOMATA, 2016). A Figura 1 mostra a bandeja de apoio ao membro utilizado durante o procedimento de antissepsia.

Figura 1 Bandeja de apoio ao membro utilizada durante o procedimento de antissepsia.



Fonte: INOMATA, 2016.

Os materiais escolhidos para confecção da bandeja foram o alumínio (al.) 1100, o aço AISI e o polipropileno (PP). Tais materiais foram propostos por promoverem praticidade durante o uso diário tais como leveza para manuseio pela equipe e transporte de um ambiente para outro, resistência mecânica para suportar o membro fraturado, assim como possibilitarem fácil higienização (INOMATA, 2016).

A bandeja de apoio ao membro é classificada como material crítico, por entrar em contato com o tecido epitelial, a mucosa e o sistema vascular, e deverá passar pelo processo de esterilização para a reutilização. Até o presente momento, não foram efetuados testes sobre os efeitos de diferentes formas de esterilização sobre a durabilidade da bandeja construída com os diferentes materiais propostos.

3.2 Terapia Fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (TFD) é o nome dado à terapia que se utiliza do efeito causado pela interação da luz monocromática com um agente fotossensível, formando oxigênio singlete e radicais livres que interagem com uma célula alvo, levando à inviabilização celular (EDUARDO *et al.*, 2015). A TFD teve início no século XX, na cidade de Munique, por Oscar Raab, estudante de medicina e seu professor Herman Von Tappiener, os quais observaram que a exposição da luz sobre corantes de acridina causava morte de protozoários. Em 1900, os médicos Von Tappiener e Jesionek descobriram a necessidade do oxigênio molecular para ocorrer reação de fotossensibilização. Sete anos depois essa terapia ficou conhecida como TFD (PRATAVIEIRA *et al.*, 2015; PERUSI, 2007).

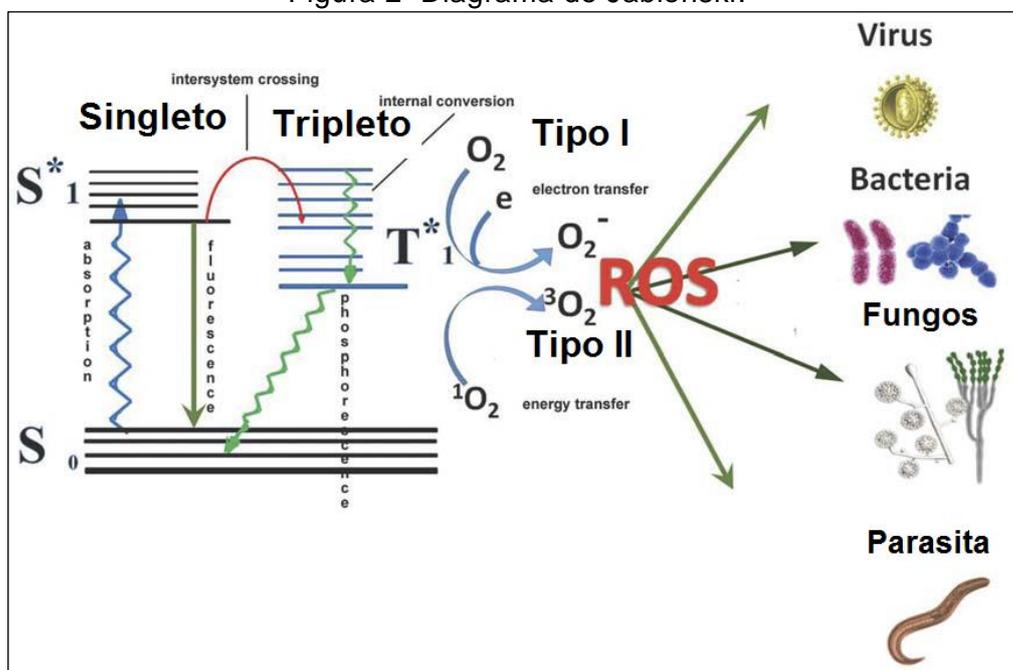
O fotossensibilizador é formado por compostos químicos que absorvem a luz induzindo a reações fotoquímicas, e sua descoberta ocorreu por volta de 1912, pelo alemão Frederich Meyer Betz, que obteve o primeiro caso de fotossensibilização humana. Em 1924, ocorreram os primeiros relatos de fluorescência de porfirina em tumores malignos, que foram utilizadas por Auler e Banza para tratar e diagnosticar doenças (MACHADO, 2000).

Swartz, em 1952, descobriu fatores que podem influenciar no efeito citotóxico tais como: a dose do composto fotossensível, o tempo de exposição à

luz e o intervalo entre a injeção da droga e o início do procedimento de iluminação. O desenvolvimento da técnica da TFD em humanos iniciou em 1953 e continua até os dias atuais (PRATAVIEIRA *et al.*, 2015). O início da utilização da TFD no Brasil ocorreu em 1998 em diversas áreas, tais como na oncologia, na odontologia e na medicina veterinária, tendo como alvos biológicos células cancerígenas, bactérias, vírus e fungos (BAGNATO; INADA; FONTANA; 2008).

A ação da TFD ocorre através da molécula do fotossensibilizador (FS, corante) que absorve a energia (fóton) da luz durante a irradiação. Esta molécula fica excitada e muda o nível de energia de S_0 (estado fundamental) para o primeiro estado excitado singlete S_1 , conforme representado através do diagrama de Jablonski (Figura 2). A molécula possui o tempo de vida reduzido neste estado, e pode retornar para o estado fundamental S_0 , emitindo fluorescência (perdendo energia) ou emitindo calor, realizando a conversão interna. Neste estado, a molécula poderá ir para o estado excitado tripleto (que tem maior tempo de vida, da ordem de microssegundos), através do cruzamento intersistemas, (ABRAHAMSE; HAMBLIN; 2016). No estado excitado tripleto, a molécula pode voltar para o estado fundamental S_0 emitindo fosforescência.

Figura 2 Diagrama de Jablonski.



Fonte: Hamblin; Yin, 2015.

No estado tripleto, podem ocorrer 2 tipos de reações: tipo I e II. Em ambas, ocorre a formação das espécies reativas de oxigênio (EROS). Na reação do tipo I ocorre o processo fotoquímico, no qual o fotossensibilizador excitado transfere elétrons para o substrato oxidável formando radicais de cátions ou ânions. O ânion reage com o oxigênio molecular produzindo superóxido (O_2^-) ou reduzindo o O_2^- originando peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual pode sofrer uma redução e produzir radicais hidroxílicos mais energéticos (OH^\cdot) (ABRAHAMSE; HAMBLIN; 2016).

Na reação do tipo II, ocorre a formação do oxigênio singleto através da transferência de energia do fotossensibilizador excitado para a molécula do oxigênio, formando o oxigênio singleto e; com isso, ocorre o processo fotoquímico (ABRAHAMSE; HAMBLIN; 2016). Os subprodutos das reações do tipo I e do tipo II agem nas biomoléculas de vírus, bactérias, fungos e parasitas, levando-as à oxidação e, conseqüente morte celular, conforme demonstra a Figura 2 (ABRAHAMSE; HAMBLIN; 2016)

O fotossensibilizador deve apresentar as seguintes propriedades: ser fácil para sintetizar, ser de baixo custo, ter um efeito citotóxico mínimo na ausência de luz, ter estabilidade e vida útil, ser solúvel em água, agir na célula alvo, apresentar baixo efeito colateral, ter um alto coeficiente de extinção (absortividade molar), ter uma penetração profunda na presença da luz e ter um pico de absorção na região do espectro vermelho e infravermelho próximo, entre 650 nm e 800 nm, (espectro das principais fontes de luz disponíveis comercialmente). O sucesso da terapia fotodinâmica depende da quantidade do fotossensibilizador, da iluminação, da fotoativação do fotossensibilizador e da eficiência quântica da formação do oxigênio singleto (ABRAHAMSE, HAMBLIN, 2016).

O fotossensibilizador azul de metileno (A.M.) tem sido amplamente utilizado para o tratamento antibacteriano, pois desempenha eficiência por ser catiônico (ABRAHAMSE, HAMBLIN, 2016). Além disso, trata-se de um corante bastante interessante por sua fácil disponibilidade, alta eficiência e baixo custo quando comparado a muitos outros FS utilizados. O azul de metileno pertence ao grupo da fenotiazina, e apresenta característica fotoquímica durante a iluminação, pois possui alto rendimento na produção do oxigênio e de EROS. Em 1876, o azul de

metileno foi utilizado na microbiologia pela primeira vez, pelos cientistas Robert Koch e Paul Ehrlich em estudos contra microrganismos (TARDIVO *et al.*, 2005).

A fotoativação leva a molécula do azul de metileno, que possui carga positiva, a ligar-se à membrana da mitocôndria, que é carregada negativamente. Esta ligação resulta no apoptose e morte celular. O azul de metileno como agente fotossensibilizador é empregado para inativação de fungos, vírus, bactérias e células do câncer, e esta inativação ocorre através das reações do tipo I e do tipo II (TARDIVO *et al.*, 2005; NUNEZ, 2007; PETRELLIS, 2014).

O corante A.M. forma agregados e dímeros que, durante a TFD, resultam na redução do coeficiente de extinção de 664 nm para 610 nm, com redução da formação do oxigênio singleto e, conseqüente redução da ação antimicrobiana. Os agregados e monômeros promovem comportamentos fotoquímicos diferentes. Os agregados estão relacionados com a reação de transferência de elétron e os monômeros atuam na transferência de energia ao substrato que ocorre na reação tipo II (NUNEZ, *et al.* 2015).

Desta maneira, buscando-se aumentar a efetividade da TFD com A.M., foi proposta a adição de ureia. A ureia associada ao corante azul de metileno enfraquece a ligação hidrofóbica, aumentando a tensão superficial da água e reduzindo a polaridade, além de promover a desagregação do azul de metileno (NUNEZ, *et al.* 2015). A ureia auxilia na remoção do biofilme, tornando-o solúvel. Age prejudicando a membrana celular e inibe os agregados de proteína, através do desdobramento delas pela interrupção da cadeia de hidrogênio, do amido e os grupos de carbono (SANAWAR, *et al.* 2018; RAMUSSEN, *et al.* 2015).

Nos últimos anos, a resistência bacteriana a antibióticos tem se tornado um problema para a saúde. Parasca e Calin (2009) relatam que o tratamento antimicrobiano com a TFD tem demonstrado eficiência, além de ser um método rápido e não invasivo. Em relação à bactéria *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*), muito frequente nas infecções de pele em âmbito hospitalar, alguns estudos mostram resultados positivos. Miyabe *et al.*, (2011) utilizaram o comprimento de onda de 660 nm, com 10 J de energia por 285 segundos e o fotossensibilizador azul de metileno na concentração de 3 mM, sendo observada redução do número de bactérias de 6,29 log₁₀ CFU/mL quando comparado ao grupo controle. Biel *et*

al., 2011 utilizaram o comprimento de onda de 664 nm durante 400 segundos, sendo testadas 2 concentrações de azul de metileno, além de diferentes parâmetros de irradiação: 300 µg/mL de A.M. com irradiância de 100 mW/cm² e 500 µg/mL a 6 mW/cm² com densidade de energia de 60J/cm² e 55 J/cm², respectivamente. Os autores observaram redução significativa da quantidade de bactérias de 6,67 log₁₀ e 7,39 log₁₀, respectivamente para ambos os grupos experimentais. Freitas *et al.* (2017) utilizaram o comprimento de onda de 660 nm sob irradiância de 25 mW/cm², potência 70 W e densidade de energia de 10 J/cm² em 3 concentrações de azul de metileno (0,1%, 0,3% e 0,5%). Os autores observaram redução de 54,9%, 39% e 37,4%, respectivamente. Rosa *et al.* (2015) utilizaram o comprimento de onda de 660 nm, potência de 40 mW, durante 3 minutos sobre azul de metileno e observaram redução de 4,46 log₁₀ comparado com o grupo controle.

A terapia fotodinâmica age sobre a matriz do biofilme, podendo ultrapassar a substância polimérica extracelular, atingindo a célula bacteriana (HU *et al.*, 2018). De acordo com o tipo do fotossensibilizador utilizado no processo fotodinâmico, ele pode ligar-se à superfície da bactéria ou atravessar a membrana, resultando na degradação da matriz do biofilme e na desintegração das células (HU *et al.*, 2018). A TFD tem sido utilizada não só para o tratamento antibacteriano, mas para a realização de desinfecção de superfície de materiais e para a desinfecção do sangue (DEMIDOVA; HAMBLIN; 2006). Considerando estes estudos, motiva-se a investigação sobre os efeitos da TFD quando empregada para desinfecção da bandeja para apoio de membros, objetivo principal do presente estudo.

3.3 Processo de limpeza dos instrumentais cirúrgicos

A limpeza realizada em instrumentais cirúrgicos reduz a carga dos microrganismos em 99,99%, sendo indicada para todos os materiais. Para tal, utiliza-se a água deionizada com pH ajustado para não ocorrer a deterioração e o aparecimento de corrosão no instrumental. O detergente enzimático utilizado reduz a tensão superficial da água (gotas esféricas sobre o material) ao mesmo tempo que auxilia na remoção das proteínas (presentes no sangue, no tecido e

no muco). Os detergentes se caracterizam por serem atóxicos, com ação imediata, além de serem solúveis, terem alta penetração e não serem corrosivos. Ainda, possuem compatibilidade com os materiais cirúrgicos, têm estabilidade, possuem baixo custo e são biodegradáveis. O tempo de submersão do detergente deve seguir as instruções do fabricante (POSSARI, 2011; BRASIL, 2012; SOBECC, 2017).

Para limpeza, os materiais contaminados deverão ser separados em pesados, cortantes e leves. A lavagem pode ser feita de forma manual ou por lavadoras ultrassônicas, devendo ser rigorosa, através de jatos de água sobre o material, utilizando uma escova, para facilitar a remoção da sujidade (POSSARI, 2011; CDC, 2017; SOBECC, 2017; LABNEWS, 2018). A limpeza automatizada pode ser efetuada através de 2 modelos de equipamentos: à base de jato de água sob pressão que acompanha a termo-desinfecção no final do ciclo de limpeza, e a lavadora ultrassônica (SOBECC, 2017; CDC, 2017).

A lavagem de materiais constitui uma etapa primordial para a eficácia do processo de desinfecção e esterilização. O biofilme pode formar em instrumentais mal lavados, e este pode disseminar infecção ao paciente (BRASIL, 2009; SOBECC, 2017). O início da formação do biofilme ocorre através da adesão da célula bacteriana à superfície. Depois, inicia-se o processo de colonização, seguido da formação de microcolônias, diferenciando em macrocolônias envoltas por uma matriz de polissacarídeos. Então, inicia-se o processo de maturação, onde as camadas externas do biofilme liberam células em estado livre, que podem dispersar-se rapidamente e multiplicar, colonizando novas superfícies (LOPES, 2016).

3.4 Classificação de materiais/instrumentais cirúrgicos de acordo com o risco de infecção envolvida durante o uso

Os materiais ou instrumentais cirúrgicos foram classificados, de acordo com o risco de infecção envolvida durante o uso, em materiais críticos, semicríticos e não críticos, por Earle H. Spaulding, com a finalidade de reduzir a infecção hospitalar (CDC 2009; PADOVEZE; GRAZIANO, 2011). Os críticos são constituídos por material ou instrumental que entram em contato com a mucosa,

tecido subepitelial e sistema vascular, e têm alto potencial de risco de infecção, devendo passar pelo processo de esterilização com a finalidade de evitar a transmissão de infecção durante o uso (PADOVEZE; GRAZIANO, 2011).

Os materiais semicríticos são aqueles que entram em contato com o tecido estéril ou sistema vascular e têm um risco potencial intermediário de infecção, devendo passar pelo processo de esterilização (CDC, 2017; PADOVEZE; QUELHAS; NAKAMURA, 2011). Em contrapartida, os materiais não críticos são constituídos por aqueles que entram em contato com a pele íntegra ou não entram em contato direto com o paciente, e apresentam um baixo risco de transmissão de infecção. Se houver a contaminação com a matéria orgânica, deverá ser realizada uma desinfecção de baixo nível, na qual ocorre a eliminação de bactérias, vírus e fungos, mas não se eliminam micobacterias ou esporos bacterianos. Quando não ocorre o contato com o paciente, uma limpeza é suficiente (PADOVEZE; GRAZIANO, 2011).

3.5 Desinfecção

A desinfecção é o processo que elimina todos os microrganismos dos materiais, instrumentais e superfícies (equipamentos e mobílias utilizados na assistência à saúde). A escolha do desinfetante é de acordo com o tipo de material, seja ele crítico, semicrítico ou não crítico (SOBECC, 2017; PSALTIKIDS, 2011; BRASIL, 2010).

Os desinfetantes devem reduzir a carga de microrganismos em $3 \log_{10}$ pelo tempo de 30 segundos, e de $5 \log_{10}$ a $6 \log_{10}$ pelo tempo de 5 a 10 minutos, quando utilizado em materiais semicríticos. O desinfetante deve ter ação sobre os esporos bacterianos, pois estes materiais devem estar isentos de infecção devido ao contato com os tecidos não íntegros. O processo de desinfecção realizado de forma inadequada pode apresentar risco de transmissão de infecção durante o uso (MAZZOLA, *et al.*, 2009).

Os métodos de desinfecção de produtos para a saúde podem ser realizados através do processo térmico (calor) ou por agentes químicos (PSALTIKIDS, 2011). Os esporos são utilizados para testar a eficácia de desinfecção por apresentarem resistência ao calor (de 3 °C a 95 °C), à radiação e aos tratamentos químicos (SONI, *et al.*, 2016).

Os desinfetantes são classificados em baixo nível, nível intermediário e alto nível, de acordo com o contato com os tecidos durante os usos descritos a seguir (CDC, 2011; RUTALA; WEBER, 2019; SOBECC, 2017; PSALTIKIDS, 2011):

- Desinfetante de baixo nível: penetra apenas através das membranas de bactérias vegetativas e destroem vírus lipídicos e alguns não lipídicos. São indicados para os materiais não críticos;

- Desinfetante de nível intermediário: penetra na membrana celular das micobactérias com alto teor de material lipídico, bactérias vegetativas, fungos, vírus lipídicos e não lipídicos, é indicado para materiais não críticos;

- Desinfetante de alto nível: atravessa a parede dos esporos bacterianos, micobactérias e bactérias vegetativas, e são utilizados para materiais semicríticos.

A ação da desinfecção pelo método químico pode ser ineficaz (SOBECC, 2017; PSALTIKIDS, 2011), considerando que os materiais com superfície porosa apresentam dificuldade de remoção de sujidades. Ainda, a quantidade da matéria orgânica (sangue, muco, fezes, sais) no material pode ser tal que reduz a ação do desinfetante. Ressalta-se que o tempo e a temperatura de exposição irão depender do tipo do desinfetante.

Os desinfetantes químicos compreendem o ácido peracético, aldeídos, soluções cloradas e o álcool. O glutaraldeído é um dialdeído com amplo espectro de ação, e tem pH ácido, não sendo esporicida. Porém, com o acréscimo de um agente alcalinizante, com pH entre 7,5 e 8,5, passa a ter ação esporicida. A ação ocorre através da alquilação de radicais sulfidril, hidroxil, carboxil e do grupo amino de microrganismo, com alteração no DNA, RNA e na síntese proteica. O tempo de ativação tem variação de 2 a 10 minutos (SOBECC, 2017). Este agente apresenta as seguintes desvantagens: se fixa à matéria orgânica residual e pode obstruir o lúmen de materiais hospitalares e é tóxico para o profissional e ao paciente, podendo causar irritação do trato respiratório (SOBECC, 2017; PSALTIKIDS, 2014).

O uso do ácido peracético para desinfecção é efetivo por apresentar ação em bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos, utilizando o tempo de 5 minutos. Atua através da desnaturação das proteínas, o que leva à ruptura da parede celular, oxidando as proteínas, as enzimas e outros metabólitos. Apresenta a vantagem de possuir baixa toxicidade para a manipulação e, como

desvantagem, produz a corrosão em materiais metálicos (SOBECC, 2017; PSALTIKDS, 2014).

O peróxido de hidrogênio produz os radicais livres que agem na membrana lipídica e no DNA. Apresenta ação esporicida em 6 horas, micobactericida em 20 minutos, fungicida e virucida em 5 minutos e bactericida em 3 minutos. É contraindicado para o uso em aparelhos endoscópicos por alterar a coloração da parte metálica (SOBECC, 2017; PSALTIKDS, 2014).

A solução clorada, conhecida como hipoclorito, leva à oxidação de enzimas e aminoácidos, perda dos componentes celulares e quebra do DNA. Na solução com concentração de 100 ppm, a ação microbicida leva 10 minutos. A ação virucida ocorre com a solução a 200 ppm em 10 minutos e a ação esporicida na concentração de 5000 ppm em 10 minutos. Necessita de enxágue abundante (SOBECC, 2017).

O uso do álcool etílico como agente desinfetante apresenta eficácia na concentração entre 60% a 70%. Este agente possui ação bactericida em 10 segundos e virucida em 30 segundos. O álcool isopropílico tem uma ação menor sobre vírus não lipídicos. O uso do álcool em materiais de borracha pode levar ao endurecimento, dilatação e danificar instrumentos óticos (SOBECC, 2017).

A solução de quaternário de amônio age por meio da inativação das enzimas, desnaturação das proteínas celulares, causando a ruptura da membrana celular. Tem ação microbicida, virucida contra vírus lipídicos e fungicida. Apresenta vantagem de possuir baixa toxicidade e alta compatibilidade (SOBECC, 2017).

A ação dos fenóis ocorre através da inativação de enzimas essenciais e perda de metabólitos da parede celular. Apresentam ação fungicida, bactericida e virucida. O contato com a pele causa despigmentação, devendo-se utilizar luvas ao manusear estes produtos (SOBECC, 2017).

A desinfecção química pode ser realizada através do sistema automatizado ou de forma manual. A termodesinfetadora é indicada para materiais resistentes à temperatura do aparelho. Funciona através de jatos de água sob pressão (turbilhonamento) e detergente, com ciclos alternados de água fria e água quente, à temperatura de 93 °C, durante 10 a 60 minutos. Para garantir a eficácia deste procedimento, é necessário o monitoramento do processo através da fita com

indicadores (BRITTO, 2019). A eficiência aumenta com a disposição adequada dos materiais no aparelho.

A lavadora de descarga é utilizada para a desinfetar utensílios como papagaio, comadre, cubas e bacias. Os dejetos são desprezados diretamente na rede de esgoto e este tipo de desinfecção pode ser realizado no setor de expurgo hospitalar (SOBECC, 2017).

São feitas as seguintes recomendações para a desinfecção eficaz (SOBECC, 2017; PSALTIKDS, 2014):

- O processo de desinfecção deve ser realizado em sala apropriada, na Central de Material e Esterilização, para garantir o funcionamento adequado como ventilação, água apropriada, processo de secagem com ar comprimido e embalagem apropriada;
- Todos os materiais devem passar pelo processo de limpeza antes de realizar a desinfecção e esterilização para garantir a eficiência do processo.
- O desinfetante químico deve ser registrado na Anvisa e a diluição deve seguir a instrução do rótulo do produto.
- Utilizar equipamentos de proteção individual para o manuseio.

3.6 Esterilização

A esterilização já era utilizada desde tempos antigos, por volta de 1450 a.C. As doenças eram combatidas através do vapor do cozimento dos alimentos, processo iniciado por Nicholas Appert no século XVIII (NAGAROTO, PENNA, 2006; SCHAWAAB, *et.al.*, 2016; SKELLIE, 2017).

A partir do século XX, o desenvolvimento e aprimoramento das técnicas cirúrgicas levaram ao desenvolvimento hospitalar, dos serviços de diagnósticos, com a fabricação de materiais e equipamentos complexos os quais exigiam limpeza e esterilização específicas. A aquisição de materiais complexos novos elevaram os custos, resultando na necessidade de reutilizá-los. O processo de desinfecção e esterilização deve ser realizado no próprio hospital, onde são usados mais frequentemente. Isso originou a Central de Material e Esterilização, que viabiliza a distribuição, o controle e a guarda do material ou instrumental utilizado em procedimento cirúrgico (GRAZIANO; SILVA; PSALTIKIDS, 2014).

A esterilização é o processo de destruição das formas de vida microbiana, que podem ser vírus, fungos e bactérias na forma vegetativa ou esporulada, através da termocoagulação e a desnaturação de enzimas e proteínas estruturais da célula microbiana, a um nível considerado seguro (GRAZIANO; SILVA; PSALTIKIDIS, 2014; LUQUETA; SANTOS; PESSOA, 2016).

Após passar pelo processo de esterilização, o número de microrganismos considerado seguro que podem estar presentes no material é representado pela sigla SAL (*Sterilization Assurance Level*) e são expressos por 10^n , que é o nível de microrganismos viáveis após passar pelo processo de esterilização. O valor de 10^{-6} corresponde a 1 microrganismo viável em 1.000.000. Para materiais hospitalares, são utilizados os valores de 10^{-3} e 10^{-6} , os quais foram definidos de acordo com a área do corpo que o material ou instrumental entrará em contato. O índice de SAL de 10^{-6} é utilizado para equipamentos médicos e instrumentais que entram em contato com os tecidos, sistema vascular, além de implantes cirúrgicos. Para materiais que entram em contato com o tecido íntegro, pode ser utilizado o SAL de 10^{-3} , que equivale a 1 microrganismo viável para 1000 (ISO11137-1,2006).

A escolha do método de esterilização é feita de acordo com o tipo de material, e pode ser realizada através de métodos físicos (calor úmido, calor seco), radiação ionizante (radiação gama e cobalto), métodos químicos (glutaraldeído, ácido peracético e formaldeído) e físico-químicos (óxido de etileno, plasma de peróxido de hidrogênio, vapor em baixa temperatura) (GRAZIANO; SILVA; PSALTIKIDIS, 2014; LUQUETA; SANTOS; PESSOA, 2016). Os materiais classificados como termossensíveis são aqueles que sofrem danos quando expostos à temperatura do calor úmido, isto é, em torno de 121 °C a 132 °C. Desta forma, os mesmos podem ser esterilizados pelo método físico-químico, isto é, pelo óxido de etileno, gás plasma de peróxido de hidrogênio e formaldeído (MORIYA, 2011).

A esterilização pelo óxido de etileno é utilizada desde 1950 e caracteriza-se pelo alto poder de penetração em uma temperatura baixa. Não causa corrosão e não danifica os materiais. A ação ocorre através da alquilação de proteínas microbianas e apresenta eficácia no processo de esterilização para materiais

termossensíveis, sendo muito utilizada para esterilizar produtos médico-hospitalares (COUTO, 2011). Contudo, este tipo de esterilização é realizado por empresas terceirizadas, pois necessita de cuidados especiais durante a manipulação, considerando que o óxido de etileno é tóxico, carcinogênico e teratogênico, além da probabilidade de induzir alterações genéticas, doenças neurológicas e respiratórias (SOBECC, 2017; SILVA *et al*, 2005; MORIYA *et al.*, 2011). Para esterilização, a concentração do óxido de etileno deverá estar entre 450 mg/L a 1200 mg/L, a temperatura deverá estar entre 37 °C a 63 °C, a umidade relativa entre 40% a 80% e o tempo de exposição poderá ser de 1 a 6 horas (BARBOSA; SARTORI, 2017; SOBECC, 2017).

A esterilização por formaldeído é indicada para materiais termossensíveis. Caracteriza-se por conter substâncias carcinogênicas e explosivas e, por isso, deve ser utilizada fora do ambiente hospitalar de acordo com as normas da vigilância sanitária (BORINI, 2016). O formaldeído é um gás incolor tóxico e carcinogênico, proveniente da formalina a 37% ou de pastilhas de paraformaldeído, e pode ser utilizado como agente desinfetante ou esterilizante.

O processo de esterilização por gás plasma de peróxido de hidrogênio é indicado para materiais críticos termossensíveis como cateteres, instrumentos ortopédicos, endoscópios, laparoscópicos, instrumentos cirúrgicos, endócrinos, dentre outros. É incompatível com celulose e líquidos. Apresenta vantagem por ser um método eficiente, rápido e com baixa toxicidade (BARBOSA; SARTORI, 2017; MORIYA *et al.*, 2011).

3.6.1 Esterilização através do calor úmido da autoclave

A forma mais utilizada para esterilizar os materiais críticos e semicríticos termorresistentes, no ambiente hospitalar, é o calor úmido, pois apresenta grande eficiência. A ação do calor leva à coagulação das proteínas, à destruição das membranas e enzimas celulares devido à eliminação das ligações de hidrogênio. A esterilização por calor úmido ocorre em tempo e temperatura inferiores às do calor seco (estufa) (BRITO, 2002; NAGAROTO PENNA, 2008; PADOVEZE; QUELHAS; NAKAMURA, 2011; SOBECC, 2017).

O ciclo de esterilização por calor úmido em autoclave compreende as seguintes fases: drenagem do ar interno, admissão, exaustão do vapor e secagem dos materiais no interior da câmara (PADOVEZE; QUELHAS; NAKAMURA, 2011). A presença do ar dificulta a penetração do vapor nos materiais de forma adequada. Para garantir o funcionamento apropriado da autoclave é necessário o uso do indicador biológico, o qual demonstra a presença de falhas no fornecimento do calor da autoclave (CDC, 2009; SOBECC, 2017).

A esterilização pelo calor úmido apresenta características favoráveis como segurança, eficiência e rapidez, sendo a penetração do calor no material de forma satisfatória. É econômica, além de apresentar facilidade de controle e monitoramento. A temperatura utilizada para a esterilização é de 121 °C a 132 °C, com variação do tempo. As desvantagens são devidas à produção da corrosão em instrumental metálico devido ao alto teor de oxigênio, e não poder esterilizar artigos termossensíveis, óleos e pós (GRAZIANO, SILVA, PSATIKIDIS, 2014; TIPPLE *et al.*, 2011; BARBOSA, SARTORI; 2017; LUQUETA *et al.*, 2016; SOBECC, 2017).

A autoclave é classificada de acordo com o tipo de remoção do ar (SOBECC, 2017) em:

- Remoção gravitacional, em que o ar é removido através da gravidade. Ao iniciar a formação do vapor, o ar frio sai por um dispositivo localizado na parte inferior da câmara;

- Remoção dinâmica do ar, a qual pode ser feita por 2 modelos de autoclave:

- Autoclave de alto vácuo: o vácuo é formado no início do ciclo removendo o ar e o vapor penetra instantaneamente. Este processo é mais rápido e eficiente;
- Autoclave com pulsos de pressurização: trabalha em torno de 132 °C a 135 °C, em que o funcionamento ocorre através de pulsos de vácuo removendo o ar da câmara e pulsos de vapor levando ao aquecimento rápido do material a ser esterilizado. A temperatura poderá ser programada no valor de 121 °C, 123 °C a 132 °C ou 135

°C; o tempo depende do tipo de artigo e do tipo de remoção do ar da autoclave, conforme demonstra a Tabela 1 (SOBECC, 2017).

Tabela 1- Tempo de esterilização de acordo com o tipo do material e o tipo de remoção do ar da autoclave.

Tipo de artigo/ remoção do ar	Tempo de exposição a 121°C	Tempo de exposição a 132°C	Tempo de exposição a 135°C
Instrumentos e utensílios embalados:			
Gravitacional	30	15	10
Dinâmica	-	-	-
Pacotes de tecidos:			
Gravitacional	30	25	10
Dinâmica	-	4	3
Itens não porosos desembalados:			
Gravitacional	-	3	3
Dinâmica	-	3	3
Itens porosos e não porosos misturados e uma mesma carga:			
Gravitacional	-	10	10
Dinâmica	-	4	3

Fonte: Padoveze, Quelhas, Nakamura, 2011.

A água utilizada para a esterilização em autoclave deve ser destilada, pois a água comum pode estar contaminada com resíduos orgânicos e pode ocasionar a corrosão dos materiais, além de contaminar o material (SOBECC, 2017). Durante o processo de esterilização são realizados monitoramentos através de testes com indicadores químicos.

3.6.2 Monitoramento da efetividade da esterilização em autoclave através dos indicadores químicos

Os indicadores químicos e biológicos indicam falhas no processo de esterilização e garantem a qualidade da esterilização. Os mesmos são classificados em:

- Classe I - é caracterizado pelo uso da fita zebrada na parte externa do pacote a ser esterilizado. É preconizado o uso em todos os pacotes e caixas de instrumental cirúrgico, para diferenciar os materiais esterilizados dos não esterilizados. A fita muda de cor após passar pelo processo de esterilização (TIPPLE, *et al*, 2011; SILVEIRA, 2014; SOBECC, 2017);

- Classe II (Bowie-Dick) - indicado para medir a eficácia do sistema de vácuo da autoclave. É utilizado para verificar a presença de gases não condensáveis, os quais ocorrem quando existe falha na remoção do ar, o que caracteriza falha no sistema de vácuo fracionado. Se a tinta da fita do indicador químico não escurecer de forma uniforme, indica que houve a formação de bolsões de ar ou gases não condensáveis e, então, a autoclave não deve ser utilizada.

- Classe III – indicador que reage com a temperatura.

- Classe IV – indicadores multiparamétricos, designados para reagir com dois ou mais parâmetros críticos do ciclo de esterilização: a temperatura e tempo de exposição.

- Classe V – indicador interno que monitora a temperatura, o tempo mínimo de exposição e a qualidade do vapor, que deve ter 95% de umidade.

- Classe VI – reage como todos os parâmetros críticos de um ciclo específico de esterilização.

3.6.3 Monitoramento biológico do ciclo de esterilização em autoclave

Os indicadores biológicos são preparados com esporos bacterianos, em torno de 10^6 UFC por unidade de papel-filtro. Os mesmos são utilizados para o controle do ciclo de esterilização e são divididos em 3 gerações:

- primeira geração: é colocado no interior da autoclave durante o ciclo de esterilização e avaliado no laboratório de microbiologia através da leitura realizada após 168 horas (SOBECC, 2017; SANTOS *et al.*, 2018);

- segunda geração: é autocontido, caracterizado por um suporte contendo os esporos localizados no fundo do frasco com um indicador e uma fita externa colorimétricos (que muda a cor de amarelo para roxo após passar pelo processo

de esterilização). O frasco é avaliado após o período de incubação de 48 horas, à temperatura de 37 °C ou 56 °C (SOBECC, 2017; SANTOS *et al.*, 2018).

- terceira geração: é autocontido, difere do indicador da segunda geração pela metodologia, pois tem a interação da enzima D-glicosidase que está associada à germinação do esporo bacteriano sobrevivente, com um substrato fluorescente presente no meio de cultura. Após passar pelo processo de esterilização, deve ser colocado na incubadora por período de 1 a 3 horas na temperatura de 37 °C a 56 °C; a leitura do resultado é feita por meio da incidência de luz ultravioleta (SOBECC, 2017; SANTOS *et al.*, 2018).

3.6.4 Ciclo de esterilização de uso imediato – *Flash*

Este tipo de esterilização é utilizado para uso imediato e possui a finalidade de atender imprevistos como queda acidental do material. Não se pode utilizar este tipo de esterilização no material que obteve contato com secreções e tecidos do paciente, assim como em materiais implantáveis. No ciclo de esterilização *flash*, podem-se ajustar valores de tempo e temperatura de acordo com a especificidade da autoclave, sendo o período mais empregado de 3 minutos a 134 °C. Após o uso, deve ser anotado na folha de registro, com data, hora e o material esterilizado de acordo com a RDC n.15/2012 (SOBECC, 2017; ESTHER; PILAR, 2017).

3.7 *Staphylococcus Aureus*

O *S. aureus* é uma bactéria gram positiva, classificada como célula procariótica (VERMELHO; BASTOS; SÁ, 2007). As células procarióticas não apresentam núcleo, possuem membrana plasmática, DNA, RNA, ribossomos localizados no citoplasma, flagelo, fimbria ou pili e cromossomo circular. A membrana plasmática é composta por uma estrutura fina, com lipídios e alto teor de proteínas, com várias funções e atividades bioquímicas. A membrana tem a função de selecionar e compartimentalizar a célula, separando-a juntamente com as outras estruturas celulares do meio extracelular (VERMELHO; BASTOS; SÁ, 2007). A parede celular, que envolve a membrana, é composta por um peptidoglicano com ácidos teicoicos e lipoteicoico. Nas bactérias gram positivas,

a parede celular é uma estrutura espessa. O *S. aureus* é composto por proteína A, que interage com várias moléculas do hospedeiro como imunoglobulinas, cininogênio e α -macroglobulina durante a infecção (VERMELHO; BASTOS; SÁ, 2007). Os ácidos teicóicos são componentes principais da parede celular, (compreendem 30 a 50%), e no *S. aureus* está presente o ácido N-Acetilglicosamina (MURRAY; ROSENTHAL, PFALLER, 2006).

É uma bactéria anaeróbia, não esporulada, pertencente à família Micrococcacea, que possui 33 espécies (DOMINCIANO, 2015). Estas bactérias apresentam tamanho aproximado de 0,5 a 1,5 μ m de diâmetro e são imóveis. Podem apresentar-se em diversas formas, aos pares, em cadeias, agrupadas de forma irregular, com aspecto semelhante a um cacho de uva. O homem pode ser o reservatório, com colonização das vias nasais, garganta, pele e cabelos, em cerca de 20-30% dos indivíduos saudáveis.

As cepas de *S. aureus* crescem em meios comuns, caldo ou ágar, com pH entre 6,0 e 7,0, à temperatura de 37 °C. As colônias formadas nas placas com ágar apresentam formato arredondado, lisas e brilhantes, de cor acinzentada até o amarelo-ouro (CORDEIRO, 2011). Produzem enzimas extracelulares com fator de virulência como a coagulase, termonuclease e a lipase (DOMINCIANO, 2015).

O *S. Aureus* foi descrito pela primeira vez na secreção do abscesso cirúrgico, pelo cirurgião Alexandre Ogston, em 1880 (ALMEIDA, *et al.*, 2016). As doenças causadas pelo *S. aureus* são devidas à produção de toxinas ou multiplicação nos tecidos (DOMINCIANO, 2015). A bactéria *S. aureus* foi escolhida para o cultivo do biofilme deste trabalho por estar presente em inúmeras infecções em ambiente hospitalar. Está presente em 2/3 das infecções em implante ortopédico, que levam à infecção óssea (osteomielite). Causa a infecção no cateter central, que chega à corrente sanguínea, causando bacteremia e podendo ocasionar Endocardite, Pneumonia, infecções em feridas, no trato urinário, além de estar presente em dispositivos médicos, podendo tornar-se resistente e complexa como o *S. aureus* MRSA (resistente à Meticilina) (RIBEIRO; MONTEIRO; FERRAZ, 2012; AYDINURAZ; 2009; CARRETERO, 2017). Quando a bactéria apresenta resistência aos antibióticos Penicilina, Oxacilina e Meticilina, o tratamento apresenta poucas opções terapêuticas (BRASIL, 2019).

3.8 Avaliação da citotoxicidade dos biomateriais

Os biomateriais caracterizam-se por entrar em contato com o sistema biológico para avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, organismo ou função do corpo (WILLIANS, 1999). Com o envelhecimento da população, o avanço tecnológico e as inovações de produtos levaram ao aumento da demanda de biomateriais nos últimos anos, principalmente aqueles relacionados com o tratamento de lesões relacionadas com a idade (HENCH, *et.al.*, 2012).

O biomaterial pode provocar um processo inflamatório quando em contato com os tecidos. Dependendo da natureza e da característica do material, podem ser definidos o tipo, a intensidade e a duração da resposta inflamatória (VASCONCELOS, 2012). No processo inflamatório ocasionado pelo biomaterial, há a participação dos leucócitos (neutrófilos, macrófagos e linfócitos). Os leucócitos migram para a área do implante, tentando fagocitar o corpo estranho. Na tentativa de fagocitar tornam-se ineficientes, levando à ativação dos macrófagos que circulam ao redor do biomaterial, e produzem o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Este agente ocasiona lesão dos tecidos e complicações como a degradação do biomaterial ou sua expulsão (HENCH, *et al.*, 2012). O biomaterial pode levar a uma resposta inflamatória aguda, que se caracteriza pela produção de citocinas através da trombina e histamina, com o aumento dos neutrófilos na corrente sanguínea, e pode evoluir para a cronicidade (HENCH, *et al.*, 2012).

Durante o uso diário da bandeja para o procedimento de antissepsia da fratura exposta, este item poderá entrar em contato com as células do tecido ósseo e do tecido conjuntivo (osteoblastos e fibroblastos) através do ferimento exposto. Os osteoblastos revestem a superfície do osso em crescimento ativo em grande número. Eles medem de 15 μ m a 20 μ m de diâmetro e estão ligados entre si por seus prolongamentos citoplasmáticos. São provenientes das células osteogênicas, que se localizam na camada profunda do periósteo e do endósteo. Estas células têm núcleo com cromatina descompactada, nucléolos evidentes e uma elevada quantidade de retículo endoplasmático rugoso no citoplasma. São responsáveis pela síntese e secreção dos componentes orgânicos da matriz óssea (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Os fibroblastos são células de origem mesenquimal e têm a função de sintetizar os componentes fibrilares (colágeno e elastina) e não fibrilares (glicoproteínas e proteoglicanos) da matriz extracelular do tecido conjuntivo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). No estágio imaturo, esta célula se diferencia, remodela a matriz extracelular e atua diretamente na morfogênese dos organismos pluricelulares. Dependendo da localização, os fibroblastos organizam-se de diferentes formas. No processo de remodelação tecidual, são responsáveis por ordenar a orientação dos elementos da matriz extracelular e composição da matriz, estando presentes em todos os tecidos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

O material atóxico resulta na interação adequada com os tecidos conjuntivos de sustentação de interface. Desta maneira, a resposta inflamatória poderá ser mínima de forma defensiva, com rápida reabsorção por apoptose das células inflamatórias, o que pode resultar no aumento das fibras colágenas e o aumento da força tensil no local. Com isso, leva à regeneração dos capilares sanguíneos e à reconstituição da vascularização, favorecendo um implante (SILVA, 2010).

Os biomateriais formados por metal apresentam boa condutividade elétrica e térmica, e são resistentes à tração. Têm sido utilizados para fabricar implantes ortopédicos, dentários e cardíacos, de adaptação de vasos venosos (*stent*) e instrumentos cirúrgicos (SUN; WATASHA; HANKS, 1997; NINOMI, NARUSHIMA, NAKAI, 2015; PIRES; BIERHALS, MORAES; 2015). Os metais compostos por alumínio, cobre, cromo, níquel, titânio e vanádio, quando em contato com os osteoblastos, podem liberar íons metálicos provenientes da dissolução. O desgaste pode ocorrer devido à variação da temperatura, à presença de biofilme bacteriano e à exposição a cargas mecânicas que produzem o atrito. Os íons metálicos liberados produzem a corrosão do metal, dificulta a proliferação celular, produz inflamações, reações alérgicas, vasculites e osteolites, resultando na citotoxicidade (MORAIS, GUIMARAES, ELIAS, 2007; PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015).

O aço inoxidável é utilizado para fabricar fixadores utilizados em cirurgias ortopédicas; apresenta em sua composição o níquel, que estabiliza a estrutura

austenítica do ferro, e o molibdênio, que torna a camada mais resistente a meios corrosivos (PIRES; BIERHALZ; MORAES; 2015).

WANG *et al.*, 2004, descreveram sobre as propriedades dos polímeros (polietileno, cloreto de vinila – PVC), os quais podem influenciar no crescimento celular e levar à citotoxicidade. O contato do polímero com o sangue e fluídos resulta em uma nova interface, a qual gera uma força termodinâmica dirigida que age na redução da energia livre de contato do material com o fluido corpóreo. Este material é constituído por oxigênio, proteínas e vários íons (cloretos e hidróxidos). Os autores ressaltam que o valor da energia livre deve ser mínimo para que ocorra a biocompatibilidade do polímero, que deve ser próximo do valor da água (WANG *et al.*, 2004).

As propriedades físicas da superfície do polímero podem influenciar na biocompatibilidade: deve-se ter um balanço entre a hidroflicidade (interação fluídica biológica) e a hidrofobicidade (a superfície do material que repele a água). As características do biomaterial devem estar próximas às do tecido implantado, tais como a disposição da carga elétrica, a dureza, a elasticidade e a resistência. Materiais hidrofílicos apresentam melhor adesão celular (SANTOS JR., WADA, 2007, p.310). O implante do PP (tela) utilizado em cirurgia da região pélvica pode levar ao processo inflamatório devido ao processo de oxidação, que produz alteração da superfície do biomaterial (TALLEY, *et al.*, 2017). A tela de PP utilizada na correção cirúrgica do assoalho pélvico tem resultado em complicações como resposta inflamatória de grau I a III, aumento das citocinas pró inflamatórias, como a interleucina 1 (Il-1) e o fator de necrose tumoral (TNF), e as citocinas anti-inflamatórias (TGF e Il-6), sendo que essas respostas foram observadas após 30 dias de implante de tela de PP realizada em ratos Wistar (SANTOS, 2015).

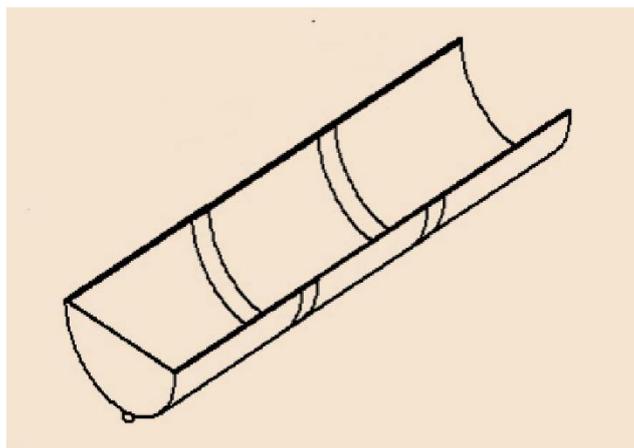
O alumínio pode produzir citotoxicidade conforme estudos de Hashimoto e Imazato (2015) que descreveram que nanopartículas de alumínio (Al_2O_3), em contato com células de rato (murino), resultou em citotoxicidade, levando à alteração do núcleo e morte celular observada através do microscópio confocal. O alumínio é tóxico para pessoas com insuficiência renal e possibilita o surgimento de problemas neurológicos, como a doença de Alzheimer (VEIGA, *et al.* 2013).

O uso da bandeja de apoio ao membro para tratar a fratura exposta poderá sofrer desgaste com a esterilização. Desta maneira, é necessário o conhecimento do comportamento mecânico dos materiais empregados para a construção deste dispositivo, com a finalidade de avaliar e propor uma forma de esterilização adequada de acordo com a matéria prima a ser utilizada para a fabricação (SOBECC, 2017; SILVA *et al*, 2005; MORIYA *et al.*, 2011).

3.9 Materiais propostos para a bandeja de apoio para antissepsia de membros com a fratura exposta

Os materiais propostos para a construção da bandeja de apoio e que foram avaliados neste estudo foram o alumínio 1100, o aço AISI 304, o polipropileno (PP). A Figura 3 mostra o desenho da bandeja de apoio ao membro utilizado durante o procedimento de antissepsia da fratura exposta.

Figura 3 – Bandeja de Apoio ao membro, utilizado durante o procedimento de antissepsia de membros.



Fonte: Inomata, 2016

3.9.1 Alumínio

O óxido de alumínio já era utilizado pelos ceramistas para fabricar vasos de barro há 7 mil anos na região da Pérsia. Após 30 séculos, os egípcios e os babilônios utilizavam um composto similar ao alumínio em cosméticos e produtos

medicinais (MIORI, 2014). O químico inglês Humphery Davy afirmou sobre a existência do alumínio em 1808; em seguida, o físico alemão Hans Oersted produziu uma pequena quantidade do metal (MIORI, 2014).

O alumínio é o terceiro elemento mais encontrado na Terra, sendo obtido a partir da bauxita. No Brasil, o primeiro lingote de alumínio foi produzido em 1945, na cidade de Ouro Preto, e a sua descoberta foi em 1854 por Henry Saint Claire Deville, o qual obteve o alumínio através de reações químicas. Em 1886, o americano Charles Martin Hall e o francês Paul Louis Tousaint Heroult obtiveram o alumínio através da redução eletrolítica da alumina dissolvida em banho fundido de criolita. Esse processo foi patenteado e ficou conhecido como Hall-Herout, utilizado atualmente (ABAL, 2016).

Para a obtenção do alumínio, a bauxita passa pelo processo de trituração e refinamento. Neste processo, o alumínio é dissolvido em soda cáustica e posteriormente filtrado para separar todo o material sólido. Os cristais são secos e calcinados para eliminar a água, sendo o pó de alumina reduzido através da eletrólise para a obtenção do alumínio, processo conhecido como Hall-Heroult (CARDOSO, 2011).

O alumínio possui ponto de fusão de 660 °C, ponto de ebulição de 2467 °C, baixa densidade e resistência à corrosão (MIORI, 2014). O módulo de elasticidade do alumínio representa 1/3 do módulo de elasticidade do aço. A adição de elementos de liga ao alumínio aumenta a resistência do material e, conseqüentemente, seu limite de resistência à tração (SOUZA, 2015).

O alumínio combina com elementos de liga, tais como o Manganês, o Cobre, o Silício e o Magnésio, e são agrupados de acordo com as características física e química em:

- ligas de fundição, que apresentam baixa capacidade de deformação;
- ligas trabalháveis, que são divididas em 2 grupos:
 - não tratáveis termicamente – são representadas pelas ligas das séries 1XXX, 3XXX, 5XXX e 8XXX; produzem o aumento das propriedades mecânicas com deformação plástica a frio;
 - ligas tratáveis termicamente – são representadas pelas ligas 2XXX, 4XXX, 6XXX e 7XXX; caracterizam-se por aumento das propriedades mecânicas

devido à precipitação de partículas de segunda fase, atuando como barreira à movimentos de discordância, elevando a resistência da liga (OTOMAR, 2010).

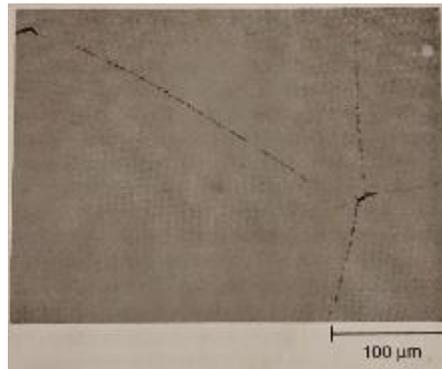
As ligas trabalháveis são identificadas com 4 números, onde cada número corresponde a uma função: a liga da série 1XXX, apresenta 99,00% de pureza. O segundo dígito significa modificações da liga original ou dos limites de impureza; os 2 últimos dígitos caracterizam os teores mínimos de alumínio na liga. (SCOPEL, 2014).

A liga 1100 é composta por 99,00% de alumínio mínimo, 0,30% de silício, 0,80% de ferro, 0,04% de cobre, 0,01% de manganês, 0,25% de magnésio e 0,01% de cromo (OTOMAR, 2010). São características da liga 1100 as altas condutibilidades elétrica e térmica, a resistência à corrosão e propriedades mecânicas reduzidas (OTOMAR, 2010).

SACCON *et al.*, 2010 e TONIATO *et al.* 2016, descreveram que as ligas de alumínio, após passar por processo de soldagem, apresentaram redução de 50% da ductilidade, devido ao efeito térmico que produziu pontos de tensão que facilitaram a propagação de trincas, com redução do limite plástico. O alumínio 1100 apresenta o valor de ductibilidade baixa com relação ao aço (SMITH; HASHEMI, 2012). O valor do limite de escoamento do alumínio 1100 é de 35 MPa, e o valor da microdureza Vickers do alumínio 1100 em chapa, denominado como valor recebido, é 60 HV (CALLISTER, 2014).

Os contornos dos grãos do alumínio são quimicamente mais reativos devido a ligações menos regulares, o que favorece ao ataque, revelando o grão. Os átomos de impurezas e precipitados são preferencialmente segregados nesta região. Em temperatura elevada, o grão cresce e reduz a energia da interface (FERRARI; 2008). A figura 11 mostra a morfologia da microestrutura do alumínio 1100.

Figura 4 Morfologia microestrutural do alumínio 1100

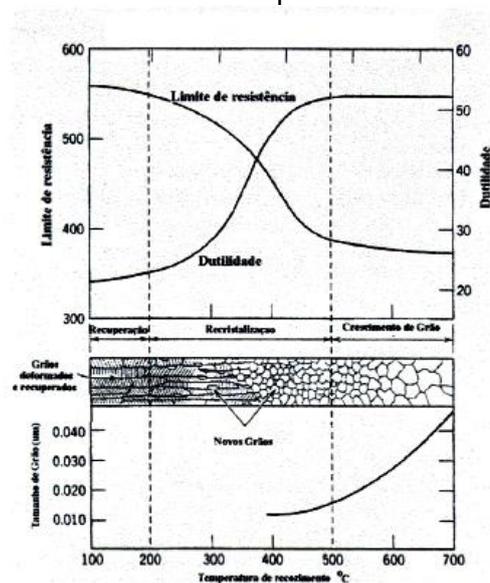


Fonte: ASM Handbook; 2008.

As impurezas depositam-se nos contornos de grãos por apresentar uma maior energia nesta região. O alumínio 1100 é puro, o que dificulta a visualização dos contornos (ASM; 2008).

A figura 5 mostra que o tamanho dos grãos metálicos da liga de Cobre e Zinco aumenta com o aumento da temperatura, diminui o limite de resistência e aumenta a ductilidade. O contorno de grão está relacionado com a resistência mecânica (FERRARI, 2008).

Figura 5: resistência mecânica do metal e o tamanho dos grãos de acordo com a temperatura.



Fonte: Sachs; Horn, 1940.

3.9.2 Aço Inoxidável

O aço inox surgiu no início do século XX, sendo uma liga ferrosa que contém os elementos de liga como o ferro, o cromo, o níquel, o carbono e o nitrogênio. O aço caracteriza-se por ser resistente à corrosão devido ao elevado teor de cromo (12%). É utilizado por diversas áreas: na indústria química, petrolífera, para a indústria de material hospitalar e farmacêutica (MODENESI, 2001).

Os aços inoxidáveis são divididos de acordo com a microestrutura e podem ser Austeníticos, Ferríticos, Martensíticos e Duplex (possui combinação das duas microestruturas, ferrítico e Austeníticos) (PEREIRA; 2012):

- Os aços Austeníticos são ligas não magnéticas que contém 16 a 25% de cromo e 7 a 20% de níquel com baixo teor de carbono. Possuem elevada capacidade de deformação por apresentar estrutura cristalina e apresentam boa soldabilidade, sendo excelentes para serem moldados mecanicamente (SIMÕES; CASTRO; ANDRADE; 2010) e, por isso, são muito utilizados. Alguns exemplos de aços pertencentes a esta classe de metal são: AISI 301, 304, 316 e 347.

- Os aços Ferríticos são ligas de ferro-cromo, que contém de 12 a 30% de cromo com baixo teor de carbono. São mais baratos pela ausência do níquel na composição e possuem boa resistência a corrosão e ao calor.

- Os aços Martensíticos são ligas de ferro-cromo contendo de 12 a 17% de cromo com alto teor de carbono 0,15 a 1,0%. Caracterizam-se pela formação martensítica quando exposta a tratamento térmico de austenitização e têmpera. Adicionalmente, possuem baixa resistência à corrosão quando comparados aos aços ferrítico e Austeníticos.

O aço austenítico possui características como resistência a corrosão, alta resistência mecânica, fácil para reciclar, limpar, boa soldabilidade e conformabilidade. Apresenta estrutura predominante austenítica, sendo excelente para ser moldado mecanicamente e, devido a estas características, é usado em diversas áreas (PEREIRA, 2012; CARVALHO, *et al.*, 2017). Possui desvantagens quanto à usinagem: baixa condutividade térmica, alto coeficiente de dilatação térmica, alto coeficiente de atrito e capacidade de encruamento (CARVALHO, *et al.* 2017).

O níquel aumenta a resistência à corrosão, melhora as propriedades de tenacidade, soldabilidade, estabiliza a austenítica e esta se mantém em temperatura ambiente. O aumento do cromo amplia a faixa de temperatura da ferrita (DIAS; 2009).

O aço inoxidável AISI 304 é austenítico composto por 0,08% de carbono, 2% de magnésio, 18 a 20% de cromo e 10 a 14% de Níquel (KLOECKNERMETALS; 2011). A Tabela 2 mostra os valores do módulo de elasticidade em MPa, o limite de resistência do aço AISI 304 e o valor da microdureza (CALLISTER, 2014; MATWEB, 2019).

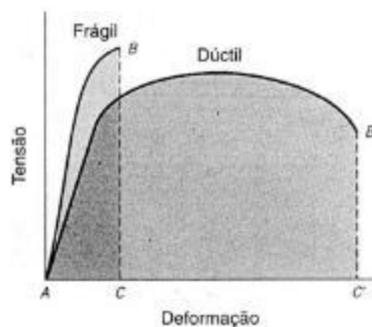
Tabela 2 – Resistência mecânica do aço AISI 304.

Material	Módulo de elasticidade	Limite de resistência	Dureza Vickers
Aço AISI 304	193 MPa	515 MPa	180 HV

Fonte: Callister, 2014.

A ductilidade mede o grau de deformação plástica até a fratura, e pode ser expressa pelo alongamento percentual. Os materiais frágeis apresentam uma redução da deformação plástica. A Figura 8 mostra o gráfico tensão-deformação de um material frágil e um material dúctil.

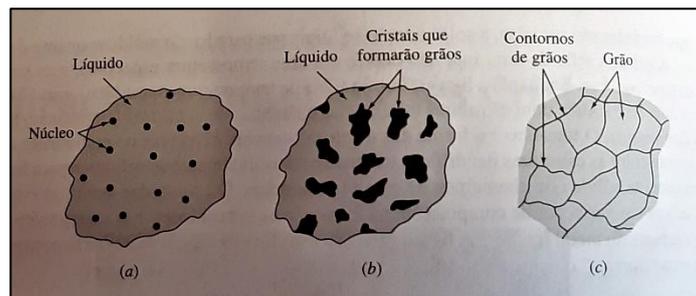
Figura 6 – Curva característica da tensão versus deformação do material frágil e o material dúctil



Fonte: Callister, 2014.

A resistência mecânica está diretamente relacionada ao tamanho dos grãos que se formam, a partir das etapas de solidificação durante o processo de fabricação, e abrangem a formação dos núcleos a partir do estado líquido, o crescimento dos núcleos que formam os cristais e estes se unem formando os grãos e os contornos dos grãos. As fases de solidificação do metal estão representadas de acordo com a Figura 7 (SMITH; HASHEMI, 2012).

Figura 7 Solidificação do metal



Fonte: Smith; Hashemi; 2015.

A forma do contorno de grão é determinada pelas restrições impostas pelo crescimento dos grãos localizados no entorno. Em temperatura normal, essas regiões dificultam o movimento de discordância; desta forma, o material torna-se mais rígido e duro quando deformado plasticamente (CALLISTER,2014).

A característica da microestrutura do aço AISI 304 tem influência no tratamento submetido. Estudos de Fonseca, Silva e Brant, 2017, sobre o aço AISI 304, descrevem a redução da microdureza na região da amostra que sofreu aquecimento.

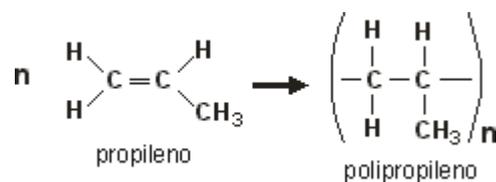
3.9.3 Polipropileno

O PP foi descoberto em 1951 por Paul Hogan e Robert Banks, durante uma pesquisa sobre o processo de conversão do eteno e propeno em componentes para gasolina, resultando em materiais sólidos. A sintetização do PP semicristalino, com aspecto de borracha, ocorreu pela primeira vez em 1954, por Giulio Natta, e a produção comercial iniciou em 1957, pela empresa Montecatini, utilizando o catalisador Ziegler Natta (PETRY, 2011). No Brasil, o processo de fabricação do PP iniciou-se pela empresa Polibrasil em 1978, no polo

Petroquímico de Capuava. Atualmente a empresa Braskem continua a produção (PETRY, 2011; BRASKEM, 2019).

O PP é obtido através de reações de polimerização; onde os monômeros reagem entre si, combinando as moléculas, e caracterizam-se pela repetição de uma unidade básica. O monômero para a produção do PP é o propeno, um hidrocarboneto insaturado de fórmula C_3H_6 obtido principalmente através do craqueamento da nafta, um derivado do petróleo. A Figura 8 ilustra a estrutura molecular básica do propileno e do polipropileno.

Figura 8 Estrutura molecular básica do propileno e do polipropileno.



Fonte: Petry, 2011.

O PP constitui um termoplástico “semicristalino” e pertence ao grupo das poliolefinas, produzido a partir da polimerização por adição do monômero propileno. É dividido em três tipos: homopolímero, copolímero heterofásico e copolímero estatístico ou randômico (MANO, 1990).

- Homopolímero - contém apenas um monômero (propeno) ao longo da sua cadeia molecular. Caracteriza-se pela elevada rigidez, “cristalinidade”, dureza e resistência à alta temperatura quando comparado com o copolímero. É utilizado em vários processos de transformação, tais como injeção, extrusão e termoformagem, originando diversos produtos (THOMPSON, 2009; JUNIOR, PIMENTEL, 2016).

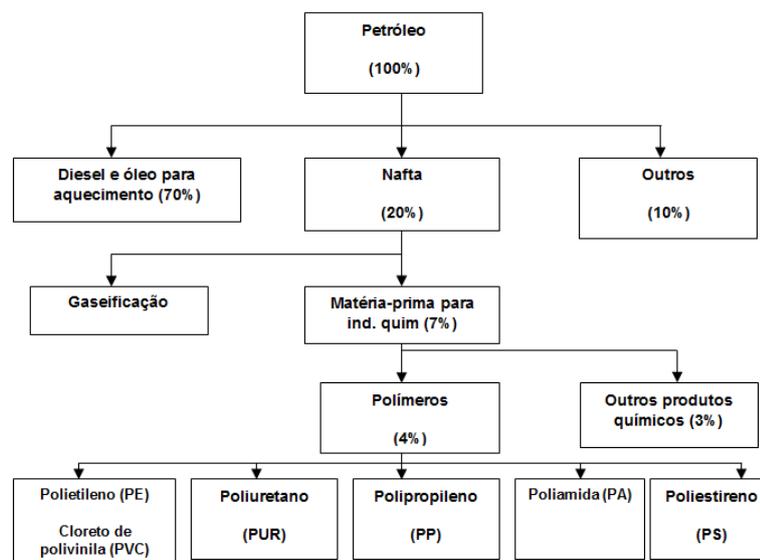
- Copolímero randômico ou aleatório - é obtido através da adição do eteno, que substitui o propeno na cadeia polimérica. Possui resistência ao impacto e dobramento; é transparente e possui baixa “cristalinidade” (THOMPSON, 2009, JUNIOR, PIMENTEL, 2016).

- Copolímero heterofásico - é polimerizado com eteno, consiste em uma matriz de polipropileno homopolímero ou copolímero randômico. É mais resistente

do que o homopolímero e pode alcançar alto impacto mesmo a baixas temperaturas (THOMPSON, 2009; JUNIOR, PIMENTEL, 2016).

A Figura 9 mostra que o polipropileno é obtido a partir da nafta, um subproduto do petróleo. Nos Estados Unidos, o polipropileno tem uma ampla utilização na indústria médica. Em 2011, o segmento de dispositivos médicos com polipropileno foi de 247.7 milhões de dólares (FROST & SULIVAN, 2016). No Brasil, foram produzidos 7,5 milhões de toneladas de resinas poliméricas em 2017. A previsão para a produção de produtos transformados em plásticos para o ano de 2021 é de 6,6 milhões de toneladas (ABIPLAST, 2018).

Figura 9 Processo de fabricação do PP a partir do petróleo.

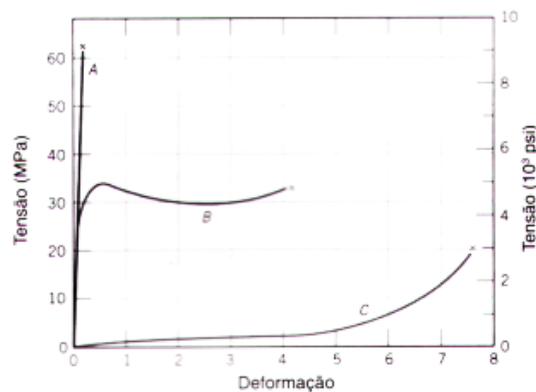


Fonte: Junior; Pimentel, 2016.

O PP apresenta qualidades como resistência à flexão e fadiga e alta resistência química; tem aspecto transparente ou opaco, é esterilizável a 220 °C, possui boa rigidez dielétrica, elevada estabilidade de forma, alta resistência a choques e boa dureza superficial (PETRY, 2011; JUNIOR; PIMENTEL, 2016). As características do PP, além do seu baixo custo, o tornam interessante para o uso em pesquisa e para a fabricação de diversos produtos como tanques de produtos químicos, conexões, válvulas, aparelhos ortopédicos e brinquedos (PETRY, 2011; JUNIOR PIMENTEL, 2016).

O comportamento mecânico do polímero é sensível à taxa de deformação quando o polímero é exposto à temperatura e à substâncias químicas. O polímero pode apresentar 3 comportamentos diferentes em tensão-deformação, conforme demonstra a Figura 10.

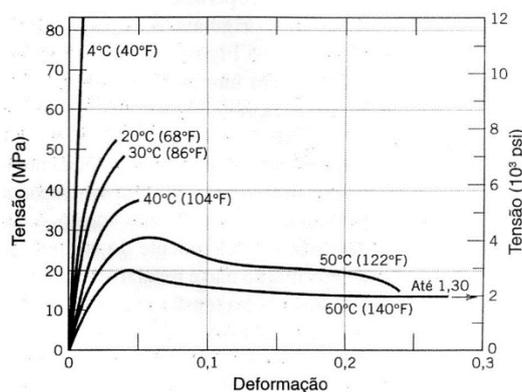
Figura 10 – Representação da curva de tensão e deformação do polímero, curva A; B e C.



Fonte: Callister, 2014.

A curva A representa a curva tensão-deformação de um polímero termorrígido, a curva B é semelhante ao comportamento de materiais metálicos, com deformação elástica, escoamento e uma região plástica e a curva C típica de um elastômero (CALLISTER, 2014). O polímero pode apresentar variações no valor do módulo de elasticidade (ser baixo da ordem de 7 MPa ou alto da ordem de 4 GPa), e o limite de resistência ser da ordem de 100 MPa. De acordo com a Figura 11, o módulo de elasticidade do poli metil metacrilato diminui com o aumento da temperatura.

Figura 11 Módulo de elasticidade do poli metil metacrilato com influência da temperatura.



Fonte: Callister, 2014.

A degradação do polímero é resultante do conjunto de reações que envolvem a quebra de ligações primárias da cadeia principal do polímero e formação de outras, resultando na mudança da estrutura química e redução da massa molar, tendo como causa mecânica, térmica ou oxidativa (CANEVAROLO JR., 2006; BATALIOTTI; 2016). A temperatura de degradação depende da energia da ligação química que constitui o polímero. O calor leva à instabilidade, que resulta ao ataque aleatório da cadeia principal, gerando a degradação térmica com cisão da cadeia aleatória. Este comportamento de tensão causada pela degradação térmica será do tipo termomecânica, o esforço pela tensão favorece a quebra (CAEVAROLO JR., 2006).

Durante a extrusão do polipropileno, ocorre a oxidação das cadeias poliméricas a partir do ataque do oxigênio ao carbono terciário ou secundário, e ambos os ataques levam a cisão da cadeia. De acordo com os estudos de Silva; Nunes e Rabello em 2016, o PP, após ser exposto à luz UV sob densidade de potência de 0,15 mW/cm² por um período de 20 semanas, apresentou alteração química, com deformação do grupo CH₃ e CH₂. Houve a formação de cromóforos, os quais iniciaram o processo de degradação do polipropileno. O início do processo de degradação do polímero está relacionado com a difusão do oxigênio para os produtos, formando o hidroperóxido e outras espécies reativas.

Após os materiais serem submetidos por várias repetições à esterilização por vapor úmido e pela TFD, o calor do vapor úmido poderá alterar o

comportamento mecânico dos materiais e as espécies reativas produzidas pela TFD poderão alterar a estrutura química dos materiais, produzindo alteração do comportamento mecânico. Desta maneira, se fazem necessários os testes mecânicos como o ensaio de microdureza Vickers e a dureza Shore D, os quais produzem uma marca superficial e profundidade, que representam os valores de dureza das amostras (GARCIA; SPIM; SANTOS, 2012).

3.10 Ensaio de Dureza

A dureza é uma propriedade mecânica que mede a resistência do material quando pressionado por marcador padronizado contra a amostra, apresentando um risco ou a formação de uma marca permanente. Os métodos de ensaio utilizam penetrador com formato específico.

3.10.1 Microdureza Vickers

A microdureza Vickers foi introduzida em 1925 por Smith e Sandland, e recebeu o nome Vickers devido ao nome da empresa (Companhia Vickers-Armstrong Ltda) que fabricou a máquina para operar este tipo de dureza. Ela mede a resistência que um material oferece à penetração de uma pirâmide de diamante de base quadrada na superfície. O penetrador aplica a carga sobre a superfície da amostra e deixa a impressão da forma de uma pirâmide de base quadrada com um ângulo de 136° entre 2 vértices opostos que permite o cálculo da microdureza HV. A impressão produzida é microscópica (SILGADO *et al.*, 2017; GARCIA; SPIM; SANTOS; 2012).

O cálculo da microdureza Vickers é realizado através da equação 1:

$$HV = F/A \quad (1)$$

Onde a microdureza Vickers (HV) é igual ao quociente da carga aplicada (F em kgf) pela área de impressão (A) deixada no corpo ensaiado. A área (A) é calculada através da equação 2:

$$A = d^2/2\text{sen} (136^\circ/2) \quad (2)$$

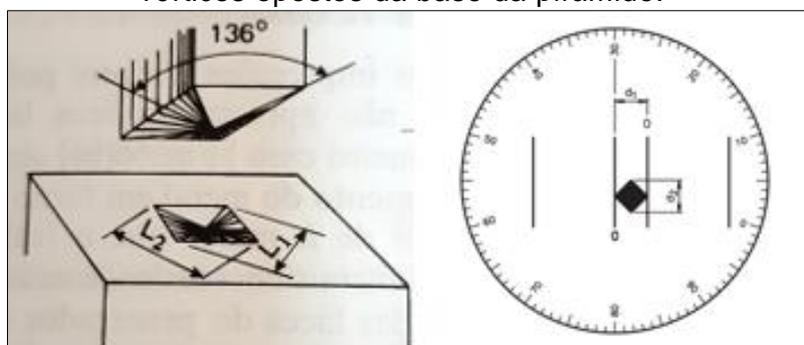
A diagonal (d) é calculada através da equação 3:

$$d = \frac{d1}{2} + \frac{d2}{2} \quad (3)$$

O valor da carga aplicada pode variar de 5 kgf a 100 kgf para ensaios com carga normal, e de 100 g a 5 kgf para ensaios com carga pequena; o período de aplicação é de 10 a 30s. A escolha do valor da carga a ser aplicada é de acordo com a impressão gerada no ensaio, de modo que seja suficientemente nítida para permitir uma boa leitura das diagonais (GARCIA; SPIN; SANTOS, 2012).

A Figura 12 mostra o formato da pirâmide da peça e o grau para medir os lados do teste de microdureza Vickers. A máquina fornece as medidas das diagonais da base quadrada, que possibilita o cálculo da área e o cálculo da microdureza Vickers (HV).

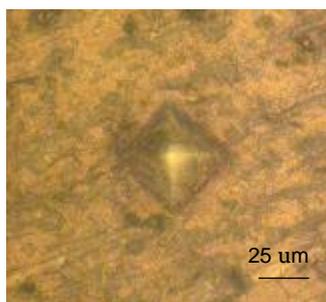
Figura 12 – Impressão da pirâmide, vista através do microscópio acoplado, no ângulo de 136° , mostrando as medidas das diagonais (d_1 e d_2), formada pelos vértices opostos da base da pirâmide.



Fonte: Rijeza Metalurgia; Souza, 2015.

A Figura 13 mostra a marca do indentador da microdureza Vickers deixado na amostra do alumínio 1100.

Figura 13 Marca do indentador na amostra do alumínio



Fonte: elaboração da autora.

O valor calculado da microdureza pode apresentar erros e afetar o resultado, que pode ser influenciado por vários fatores: calibração da máquina, vibração da máquina durante a execução do teste, condições de conservação da lente ocular e objetiva, condições de iluminação, seleção da carga e erros do operador (ALMEIDA, 2018). O ensaio de microdureza fornece dados que estão correlacionados com algumas propriedades mecânicas. A impressão deixada na amostra dependerá do escoamento e da velocidade do encruamento do metal; desta forma, espera-se uma correlação entre a resistência mecânica e a dureza (HORTA; JUNIOR, 2019).

Estudos de TONIATO *et al.*, 2016, demonstraram que o alumínio 6086-T⁶ composto por 1,5% de magnésio e silício, apresentou redução da dureza Vickers na região onde ocorreu a solda. O calor amoleceu a região da amostra resultou na redução da microdureza, de 100 HV para 56 HV. MOGHANIZADEH *et al.* 2016, estudaram o efeito da temperatura sobre a amostra do aço AISI 304 e observaram aumento dos grãos e a redução da microdureza com o aumento da temperatura a partir de 1000 °C.

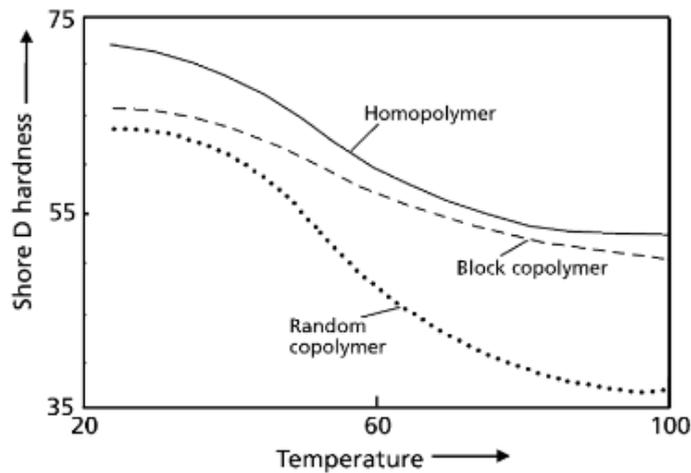
O aço AISI 304 apresentou aumento da microdureza à temperatura de 660 °C, que produziu a precipitação do carboneto e do cromo, o que impediu o movimento de deslocamento. Entretanto, as amostras do aço AISI 304, após passar por recozimento à temperatura de 1010 °C e 1050 °C apresentaram redução da microdureza devido à dissolução do carbono e do cromo (TUKUR, *et al.* 2014).

3.10.2 Dureza Shore D

O ensaio de microdureza é comumente utilizado por ser de baixo custo e pela facilidade de realização, e fornece informações sobre a resistência mecânica do material, como a ductilidade e o comportamento de desgaste (LEAL, 2019). A Dureza Shore é um método utilizado para polímeros, que caracteriza a medida da resistência que o material oferece à penetração de um penetrador padronizado sob uma carga de compressão específica, inversamente proporcional à profundidade de penetração. As escalas de dureza Shore mais utilizadas são a A e a D. A escala A é utilizada para materiais moles e a escala D é recomendada

para materiais mais duros, onde o penetrador é pontiagudo. A escala de medidas varia de 0 a 100 e o resultado está relacionado com a profundidade de penetração (GARCIA; SPIM; SANTOS, 2012). O valor da dureza Shore D para o PP é de 59D (MATWEB; 2019). De acordo com a Figura 14, o PP apresenta a redução da microdureza com o aumento da temperatura.

Figura 14 – Redução da microdureza do PP com o aumento da temperatura



Fonte: Tripathi, 2002.

As características físicas do polímero são determinadas pela mobilidade das cadeias poliméricas, que é função da agitação dos átomos das moléculas, e é diretamente proporcional à temperatura. Esta mobilidade determina as características físicas do produto, tais como plástico duro e frágil, borrachoso e tenaz (CANAVEROLO, JR., 2006).

A bandeja de apoio ao membro é classificada como biomaterial, devido ao contato desta aos tecidos estéreis. Os materiais irão ficar em contato com os tecidos durante o uso do apoio; desta forma necessita do teste de citotoxicidade dos materiais propostos neste estudo.

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1 Delineamento experimental

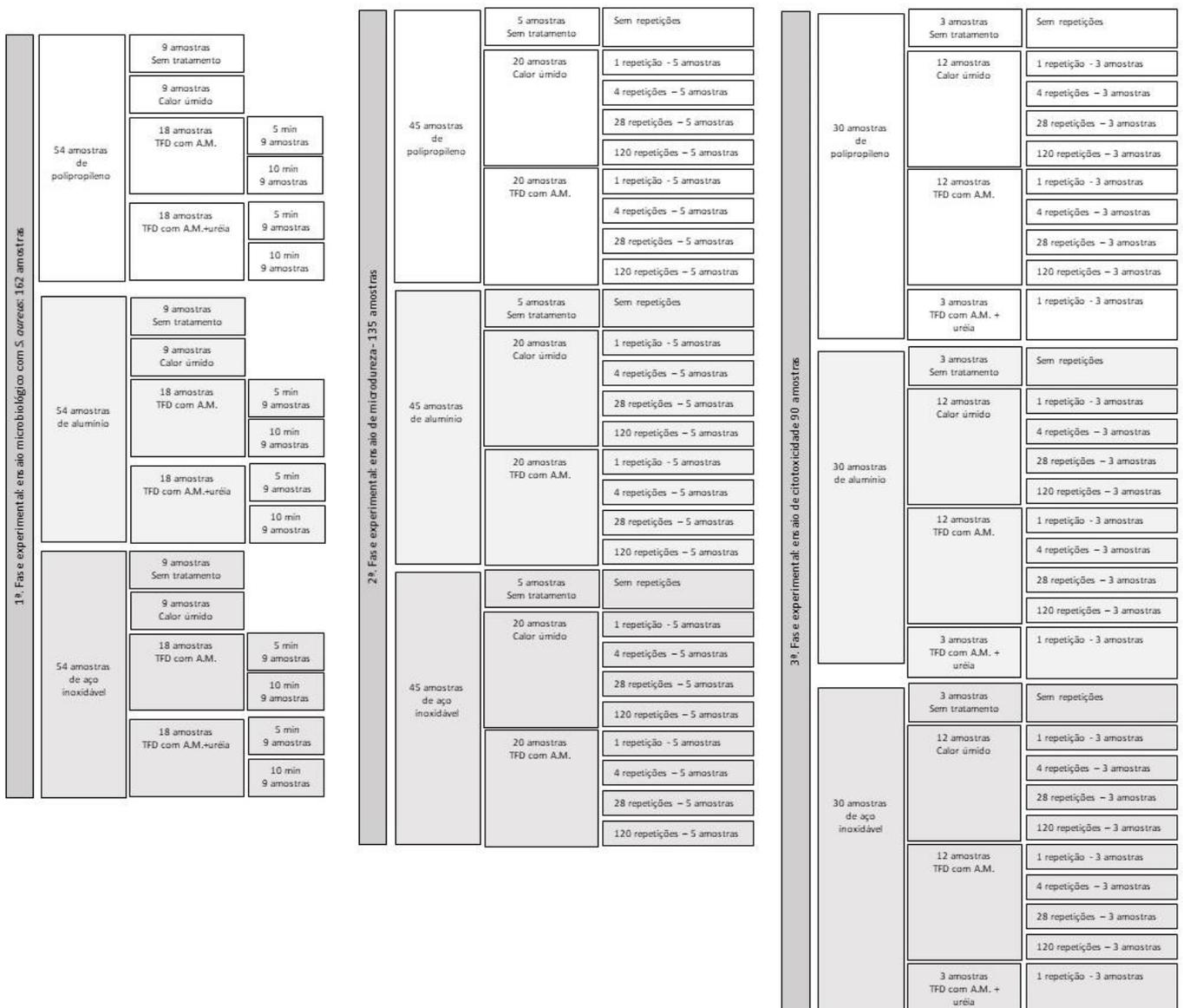
Foi conduzido um estudo *in vitro* randomizado, buscando-se avaliar os efeitos da terapia fotodinâmica (TFD) com dois fotossensibilizadores – azul de metileno puro (TFD com A.M.) e azul de metileno adicionado de ureia (TFD com A.M.+ ureia) – comparando-se aos do calor úmido (autoclave), sobre os materiais sugeridos para construção da bandeja para o apoio de membros de uso hospitalar (polipropileno, alumínio 1100 e aço AISI 304).

O estudo possui três fases experimentais. Na primeira fase experimental, foram avaliados os efeitos da TFD com A.M. e TFD com A.M.+ ureia com diferentes tempos de irradiação (5 e 10 minutos), comparados aos do calor úmido, em biofilme de *S. aureus* cultivados sobre amostras dos três materiais sugeridos. Na segunda fase experimental, foram avaliados os efeitos de diferentes repetições dos tratamentos TFD com A.M. e calor úmido (1x, 4x, 28x, e 120x) na microdureza dos três materiais e, na terceira fase experimental, foram avaliados os efeitos de diferentes repetições dos tratamentos TFD com A.M., TFD com A.M. + uréia e calor úmido (1x, 4x, 28x, e 120x) na citotoxicidade dos mesmos materiais. Vale ressaltar que o número de vezes que o material foi submetido aos tratamentos corresponde a uma estimativa do número de vezes que o protótipo será utilizado, supondo que a utilização seja de 4 vezes por dia, 28x na semana e 120x em 30 dias. O fluxograma da Figura 15 ilustra o delineamento experimental das diferentes fases deste estudo.

Na primeira fase experimental, 54 amostras de cada material tiveram cultivo de biofilme com *Staphylococcus aureus* e, após, foram aleatoriamente distribuídas em 6 grupos experimentais: sem tratamento (controle negativo), tratadas com calor úmido (controle positivo), tratadas com TFD com A.M. por 5 ou 10 minutos, e tratadas com TFD com A.M.+ ureia por 5 ou 10 minutos. Após os tratamentos, foi avaliado o crescimento bacteriano. Na segunda fase experimental, foram preparadas 45 amostras de cada material, as quais foram aleatoriamente distribuídas para os seguintes tratamentos: sem tratamento (controle negativo), tratadas com calor úmido (controle positivo) com 1, 4, 28 e 120 repetições, e tratadas com TFD com A.M. com 1, 4, 28 e 120 repetições. Após, elas foram

preparadas para o teste de microdureza Vickers (alumínio e aço inoxidável), enquanto o polipropileno foi preparado para o teste de Dureza Shore D. Na terceira fase experimental, foram preparadas 30 amostras de cada material, as quais foram aleatoriamente distribuídas para os seguintes tratamentos: sem tratamento (controle negativo), tratadas com calor úmido (controle positivo) com 1, 4, 28 e 120 repetições, tratadas com TFD com A.M. com 1, 4, 28 e 120 repetições, e tratadas com TFD com A.M. + ureia com 1 repetição. Em seguida, foi efetuado o ensaio de citotoxicidade por meio de testes de contato direto e indireto com fibroblastos Vero.

Figura 15 – Delineamento experimental das diferentes fases do presente estudo.



Fonte: elaboração da autora.

A análise estatística foi realizada individualmente para cada variável resposta analisada (contagem de UFC do biofilme com *Staphylococcus aureus*, teste de microdureza Vickers, teste de dureza Shore D e teste de contato indireto), sendo considerado os materiais, os tratamentos e o número de repetições dos tratamentos como fatores de variação e as unidades experimentais foram as amostras. O nível de significância estatístico adotado foi de 5%.

4.2. Tratamentos

Antes dos tratamentos de qualquer fase experimental, as amostras foram lavadas com detergente enzimático (Asfer Indústria Química Ltda, São Caetano do Sul, Brasil), diluindo 5 mL em 1 L de água. As amostras foram submersas por 5 minutos, conforme orientação do fabricante. Após este período, as amostras foram enxaguadas com água destilada por 1 min e secas ao ar livre.

4.2.1 Tratamento com calor úmido

Após passar pelo processo de limpeza com detergente enzimático, as amostras foram embaladas com papel grau cirúrgico (Estéril Care) e foram submetidas ao processo de esterilização por calor úmido, empregando-se autoclave (BIOTRON, ADL12B de 12 litros), durante 30 minutos a 121 °C. Durante o processo, foram utilizados os indicadores químicos 4 e 5 para monitorar os parâmetros de temperatura, tempo de exposição e qualidade do vapor. Foi utilizado o indicador biológico a cada 7 dias para monitorar o funcionamento da autoclave quanto à eficácia do processo de esterilização (SOBECC 2017).

4.2.2. Tratamento com TFD

Para a TFD, foram empregados dois fotossensibilizadores diferentes: o azul de metileno na concentração de 100 µM e o azul de metileno na concentração de 30 µM adicionado de ureia na concentração de 2 M (NUNEZ *et al.*, 2015).

Após passar pelo processo de lavagem com detergente enzimático e secagem, as amostras foram totalmente imersas no fotossensibilizador (Sigma Aldrich, EUA) por um tempo de pré-irradiação de 5 minutos. A quantidade de fotossensibilizador utilizada para cada amostra variou em função do tamanho da

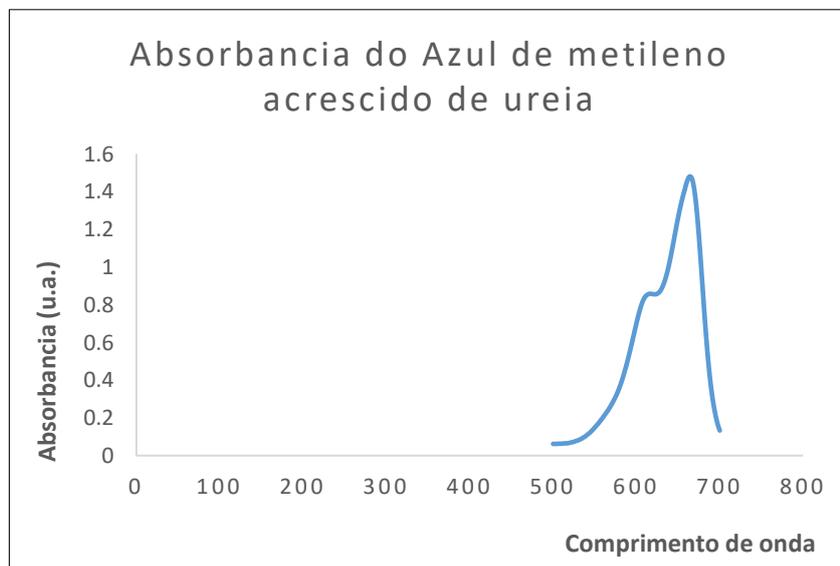
mesma e será descrita posteriormente. A caracterização da absorbância do azul de metileno puro e o acrescido de ureia 2 M encontra-se nos Gráficos 1 e 2. Ressalta-se que, para a realização das medidas de absorção, o fotossensibilizador foi diluído e, portanto, não apresenta a concentração empregada nos experimentos.

Gráfico 1 - Absorbância do azul de metileno puro.



Fonte: elaboração da autora.

Gráfico 2 - Absorbância do azul de metileno acrescido de ureia.



Fonte: elaboração da autora.

A fotoativação foi efetuada por um laser vermelho de comprimento de onda de 660 nm (DMC Ortho Lase, DMC Equipamentos, São Carlos, Brasil). Para os tratamentos, foi empregado laser sob modo de emissão contínua, com diâmetro da fibra de 600 μm , área de spot de 0,0028 cm^2 e irradiação pontual, potência de 100 mW, com tempo de irradiação de 5 minutos ou 10 minutos, e energia total entregue de 30 J ou 60 J, respectivamente. Considerando que os experimentos foram efetuados posicionando-se a fibra do laser a 1 mm da área distância das áreas a serem irradiadas, de forma que fosse coberta a área total de 0,9 cm^2 de uma placa de 24 poços, obteve-se densidade de potência de 111 mW/cm^2 e densidade de energia de 33,33 J/cm^2 ou 66,66 J/cm^2 , respectivamente. A caracterização do comprimento de onda do feixe de luz emitida foi efetuada empregando-se espectrômetro Ocean Optics (FL – EUA), conforme pode ser identificado no gráfico 3.

Gráfico 3- Comprimento de onda do laser utilizado para a TFD.



Fonte: elaboração da autora.

Antes das irradiações, a potência emitida pelo laser foi aferida empregando-se medidor de potência FieldMax TOP II (Coherent, EUA).

4.2.3 Fase experimental 1 – Teste microbiológico

4.2.3.1 Preparo do inóculo

Foi cultivada uma alçada de bactérias de *S. aureus* ATCC 25923, em TSA (*Trypticase Soy Agar*) por 24 horas a 37 °C. Após, foi utilizada uma alçada de *S. aureus* em soro fisiológico (Prófarmacos), que foi agitado no vórtex por 15 segundos; e realizou-se a leitura no espectrofotômetro no comprimento de onda de 625 nm e valor da absorbância de 0,08. Foi acrescentado soro até a concentração de 10^8 UFC/mL na escala de 0,5 de Mac Farland, que corresponde a 2×10^8 UFC/mL.

Para a confirmação da carga bacteriana do inóculo, foi feita a diluição seriada do inóculo até 10^{-7} UFC/mL e, então, pipetado 10 μ L em placa de TSA em triplicata. Foi feita a contagem, e o valor de 0,08 corresponde a 2×10^8 UFC/mL.

4.2.3.2 Preparo das amostras para o ensaio microbiológico

Para este ensaio, foram preparadas 54 amostras de cada material. As amostras dos materiais PP, alumínio 1100 e do aço AISI 304 foram cortadas nas medidas 0,6cm x 0,6cm na cortadeira elétrica (Isomet 4000 Linear Precision Saw, Buehler), sob refrigeração, com velocidade de 3000 rpm.

As amostras do aço AISI 304 e do alumínio 1100 passaram por um tratamento de superfície através do aparelho DC POWER SUPPLY, empregando-se voltagem de 7 Volts, com corrente de 0,44 Amperes, durante 20 segundos. Durante o processo, as amostras foram mergulhadas em 500 mL de água com NaCl e então lavadas em água deionizada. Posteriormente, foram encaminhadas para a esterilização em vapor úmido a 121 °C, durante 30 min (WU *et al.*; 2018). A densidade (J) da corrente (q) do tratamento efetuado, calculada sobre a área do alumínio e do aço, foi de 2,50J. O tratamento de superfície foi realizado para melhorar a adesão bacteriana do biofilme com *S. aureus* nas superfícies dos materiais (WU *et al.*, 2018). O PP, por sua vez, foi apenas lavado com detergente enzimático e esterilizado por calor úmido a 121 °C, durante o período de 30 min.

4.2.3.3 Formação do Biofilme com *S. aureus*

A formação do biofilme sobre a superfície das amostras foi realizada de acordo com Wu (2018) com algumas modificações. As amostras foram incubadas em placas de 24 poços, com 999 μ L de TSB acrescido de 0,25g de glicose (KASVI) e 0,01 mL de suspensão bacteriana preparada na concentração de 10^8 UFC/mL. Após 24 horas, o meio foi trocado.

4.2.3.4 Grupos experimentais

Os grupos experimentais propostos para a análise microbiológica estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3: Grupos experimentais considerados para a análise microbiológica.

Material	Forma de esterilização	Tempo de irradiação	Quantidade de amostras
Alumínio (total = 54 amostras)	Sem tratamento	-	9
	Calor úmido	-	9
	TFD com A.M.	5 minutos	9
	TFD com A.M.	10 minutos	9
	TFD com A.M.+ uréia	5 minutos	9
	TFD com A.M.+ uréia	10 minutos	9
Aço Aisi 304 (total = 54 amostras)	Sem tratamento	-	9
	Calor úmido	-	9
	TFD com A.M.	5 minutos	9
	TFD com A.M.	10 minutos	9
	TFD com A.M.+uréia	5 minutos	9
	TFD com A.M.+ uréia	10 minutos	9
Polipropileno (total = 54 amostras)	Sem tratamento	-	9
	Calor úmido	-	9
	TFD com A.M.	5 minutos	9
	TFD com A.M.	10 minutos	9
	TFD com A.M.+ uréia	5 minutos	9
	TFD com A.M.+ uréia	10 minutos	9

Fonte: elaboração da autora.

4.2.3.4.1 Tratamento com TFD com azul de metileno puro

Cada amostra do material contendo o biofilme com *S. aureus* foi lavada separadamente, na placa de cultivo com 1000 µL de soro fisiológico, a fim de retirar as células não aderidas. Após, cada amostra isoladamente foi submersa em 1000 µL de azul de metileno por 60 segundos e então irradiada isoladamente no poço da placa, por 5 minutos ou 10 minutos, de acordo com o grupo experimental a que pertencia.

4.2.3.4.2 Tratamento com TFD com A.M. acrescido de ureia

Cada amostra que pertencia aos grupos que receberam a TFD com o azul de metileno e ureia foi submersa individualmente em 500 µL de ureia e 500 µL de azul de metileno, durante 5 minutos, de forma individual. Após, a amostra recebeu a irradiação por 5 minutos ou 10 minutos, de acordo com o grupo a que pertencia.

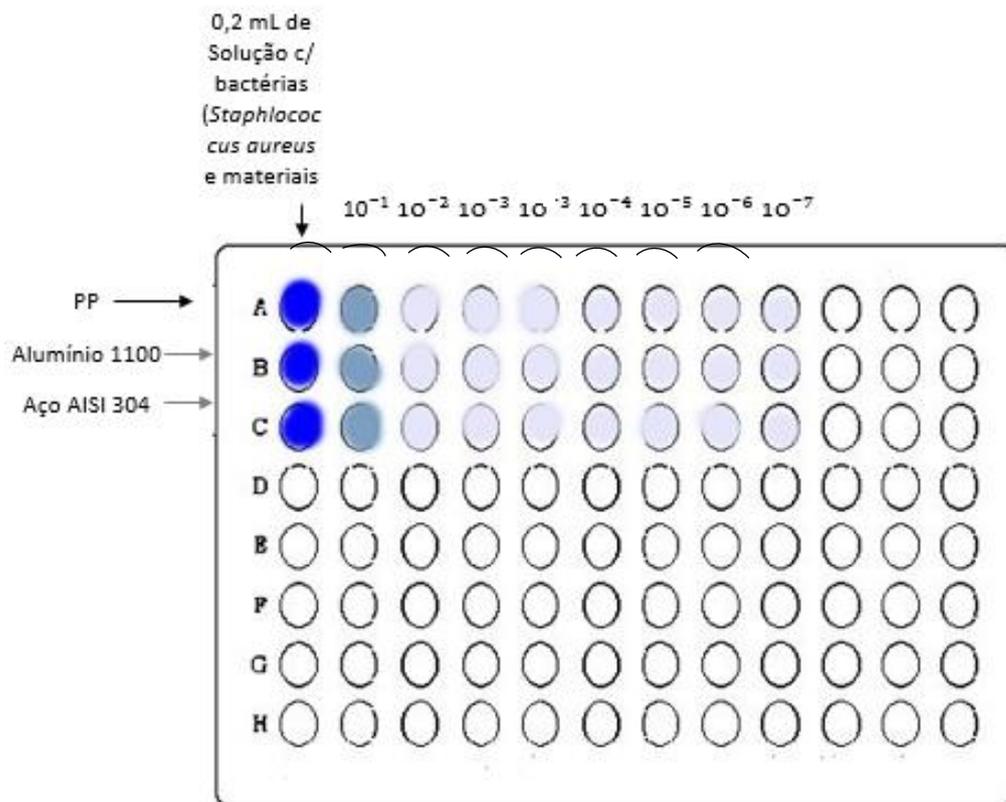
4.2.3.4.3 Tratamento com calor úmido

As amostras com biofilme foram lavadas separadamente com 1000 µL de soro fisiológico, no próprio poço da placa de cultura, individualmente. Foi colocado, em recipiente próprio, 1000 µL de soro fisiológico e, então, esterilizada em calor úmido, a 121 °C, durante 30 minutos. Após, foi realizada a diluição seriada, para quantificar o número de bactérias viáveis.

4.2.3.5 Preparo das amostras para a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC)

Para a contagem das UFCs após os tratamentos, as amostras foram lavadas de forma individualizada com 1 mL de soro fisiológico 0,9%, uma vez, na própria placa de cultura, desprezada a solução e ressuspensa em 1 mL de soro fisiológico 0,9%. Então, cada amostra foi raspada com a ponteira da pipeta por 8 vezes (Lemos, 2010 com modificação). Após, a solução contendo a amostra do material foi deixada no eppendorf e colocada na cuba ultrassônica Cristofoli (60Hz), por 525 segundos. Após, as amostras foram agitadas, por 2 minutos, no Vortex (Nova instrumets NI 1069) por 3 vezes (MOLEY *et al.*, 2018). Após, foi pipetado 200 µL da solução contendo o material na primeira coluna da placa de 96 poços, conforme demonstrado através da Figura 15.

Figura 15 - Representação da diluição seriada para quantificar as células do biofilme com *S. aureus* dos materiais na placa de 96 poços.



Fonte: elaboração da autora.

A partir da segunda coluna da placa, foi adicionado 180 µL de soro fisiológico a 0,9% até a oitava coluna da placa. Após, foi transferido 0,02 mL da 1^a. para a 2^a. coluna, com diluição de 10⁻¹. Após, foi homogeneizado e transferido 0,02 mL da 2^a. para a 3^a. coluna, com diluição de 10⁻²; foi homogeneizado e transferido 0,02 mL da 3^a. para a 4^a. coluna, com diluição de 10⁻³; foi homogeneizado e transferido 0,02 mL da 4^a. para a 5^a. coluna, com diluição de 10⁻⁴; foi homogeneizado e transferido 0,02 mL da 5^a. para a 6^a. coluna, com diluição de 10⁻⁵; foi homogeneizado e transferido 0,02 mL da 6^a. para a 7^a. coluna, com diluição de 10⁻⁶; e então foi homogeneizado e transferido 0,02 mL da 7^a. para a 8^a. coluna, com diluição de 10⁻⁷, conforme representado na Figura 17. Depois a diluição seriada, foi pipetado 10 µL em forma de gota escorrida na placa de TSA (*Trypticase soy agar*), em colunas, de -3 a -7, conforme mostra a Figura 16. O plaqueamento foi feito em triplicata para caracterizar melhor o resultado.

Figura 16 – Placa de TSA em colunas de -3 a-7.



Fonte: elaboração da autora.

4.2.3.6 Preparo das amostras para análise morfológica

Para analisar o crescimento, adesão e espalhamento do biofilme com *S. aureus* cultivados sobre as amostras dos materiais, as mesmas foram observadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Para isto, os materiais foram colocados sobre placas de cultivo e, em seguida, foi inoculada uma suspensão celular, na concentração de 10^8 células/mL. A placa foi incubada por 48 horas a 37 °C e o meio foi trocado após 24 h. Em seguida, as amostras dos materiais contendo o biofilme com *S. aureus* foram fixadas por 2 horas, em temperatura ambiente, em solução de paraformaldeído 2,5% (Exodo) e glutaraldeído 2,5% (Sigma, St Louis, MO, USA) sendo dissolvidos em tampão cacodilato (0,1M, pH 7,4). Em seguida, os materiais foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (15%, 30%, 50%, 70%, 95% e 100%). Então, os materiais foram secos, em equipamento de Ponto Crítico (Balzers, CTD-030), pertencente à Central Multiusuário da UFABC, e foram submetidos à metalização a ouro (Balzers, CTD-050). A avaliação foi efetuada em Microscópio Eletrônico de Varredura FEI Quanta 250, pertencente à Central Multiusuário da UFABC.

4.2.5 Fase experimental 2 - Ensaio de microdureza

4.2.5.1 Preparo das amostras

Foram preparadas 45 amostras de cada material nas medidas de 0,5 cm x 0,5 cm e, após o corte, as mesmas foram embutidas em resina de cura a frio (Ideal). Depois de embutidas, as amostras foram lixadas, por meio da utilização de lixas de água de SiC 320, 400, 600 e 1200 em politriz (Aropol 2V, Arotec). O polimento foi realizado com pano de polimento metalográfico e a utilização de uma suspensão de pasta de alumina de 1 e 0,05 μm , até a obtenção de uma superfície de boa qualidade.

4.2.5.2 Tratamentos

Os tratamentos realizados para esta fase experimental se encontram na Tabela 4.

Tabela 4: Grupos experimentais considerados para a análise de microdureza.

Material	Tratamento	Repetição/ tempo	Número de amostras
Alumínio	Sem tratamento		5
	Calor úmido 121 °C	1 x (30 minutos)	5
		4 x (120 minutos)	5
		28 x (840 minutos)	5
		120x (3600 minutos)	5
	TFD com A.M.	1 x (10 minutos)	5
		4 x (40 minutos)	5
		28 x (280 minutos)	5
		120 x (1200 minutos)	5
	Aço Aisi 304	Sem tratamento	
Calor úmido 121 °C		1 x (30 minutos)	5
		4 x (120 minutos)	5
		28 x (840 minutos)	5
		120x (3600 minutos)	5
TFD com A.M.		1 x (10 minutos)	5
		4 x (40 minutos)	5
		28 x (280 minutos)	5
		120 x (1200 minutos)	5
Polipropileno		Sem tratamento	
	Calor úmido 121 °C	1 x (30 minutos)	5
		4 x (120 minutos)	5
		28 x (840 minutos)	5
		120x (3600 minutos)	5
	TFD com A.M.	1 x (10 minutos)	5
		4 x (40 minutos)	5
		28 x (280 minutos)	5
		120 x (1200 minutos)	5

Fonte: elaboração da autora.

4.2.5.3 Ensaio de microdureza Vickers

O teste de microdureza Vickers foi realizado nas amostras de aço inoxidável e alumínio. Os experimentos seguiram a norma E92-17 ASTM, sendo conduzidos no microdurômetro Equilam HVS 1000 – Digital Microhardness tester. Foi utilizada a carga de 0,98 N por 15 segundos. O valor médio de dureza de cada amostra analisada corresponde a 05 medidas de dureza.

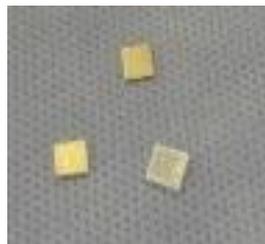
4.2.5.4 Ensaio da Dureza Shore D

O teste de Dureza Shore D foi efetuado nas amostras de polipropileno. Os mesmos foram executados de acordo com a norma ASTM D 2240 e, para tal, foi utilizado o aparelho de microdureza HOMIS HT 6510D. Anteriormente ao teste, foi realizada a calibração do aparelho utilizando a escala de $21,5 \pm 0,2$, sendo que a amostra a ser testada foi colocada na posição horizontal sob uma superfície plana. O valor médio de dureza de cada amostra analisada corresponde a 05 medidas de dureza.

4.2.4 Fase experimental 3 - Ensaio de citotoxicidade

Para este ensaio, foram preparadas 30 amostras de 0,6 cm x 0,6 cm de cada material, conforme Figura 17. As amostras foram cortadas com tesoura para ourives (Corneta) e, após serem lavadas com detergente enzimático, foram encaminhadas para esterilizar. Após, as amostras foram aleatoriamente distribuídas em grupos experimentais ($n = 3$), conforme Tabela 5.

Figura 17 Amostras dos materiais para o ensaio de citotoxicidade.



Fonte: a própria autora.

Tabela 5: Grupos experimentais considerados para a análise de citotoxicidade.

Material	Tratamentos	Repetição/ tempo	Número de amostras	
Alumínio (30 amostras)	Sem tratamento		3	
	Calor úmido 121 °C	1 x (30 minutos)	3	
		4 x (120 minutos)	3	
		28 x (840 minutos)	3	
		120 x (3600 minutos)	3	
	TFD com A.M.	1 x (10 minutos)	3	
		4 x (40 minutos)	3	
		28 x (280 minutos)	3	
		120 x (1200 minutos)	3	
	TFD com A.M. e a ureia	1 x (10 minutos)	3	
	Aço Aisi 304 (30 amostras)	Sem tratamento		3
		Calor úmido 121 °C	1 x (30 minutos)	3
4 x (120 minutos)			3	
28 x (840 minutos)			3	
120 x (3600 minutos)			3	
TFD com A.M.		1 x (10 minutos)	3	
		4 x (40 minutos)	3	
		28 x (280 minutos)	3	
		120 x (1200 minutos)	3	
TFD com A.M. e ureia		1 x (10 minutos)	3	
Polipropileno (30 amostras)		Sem tratamento		3
		Calor úmido 121 °C	1 x (30 minutos)	3
	4 x (120 minutos)		3	
	28 x (840 minutos)		3	
	120 x (3600 minutos)		3	
	TFD	1 x (10 minutos)	3	
		4 x (40 minutos)	3	
		28 x (280 minutos)	3	
		120 x (1200 minutos)	3	
	TFD com A.M. e ureia	1 x (10 minutos)	3	

Fonte: elaboração da autora.

4.2.4.1 Cultura celular

Foram utilizadas as Células Vero, uma linhagem fibroblástica estabelecida a partir do macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*). Essas células foram

cultivadas em meio de cultura DMEM (*Dulbecco modification of minimum essential média* - Lonza Group Ltda, USA) com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB, Nutricell Nutrientes Celulares, Campinas, SP, Brasil) a 37 °C em estufa (Thermo 4110), com 5% de CO₂. Foi realizada a troca do meio sempre que houve acidificação do mesmo e os subcultivos foram efetuados duas vezes por semana. Foram utilizadas as normas vigentes para ensaios com biomateriais (ISO 10993-5).

4.2.4.2 Toxicidade por contato indireto

Os extratos dos diferentes materiais foram obtidos através da incubação destes, em meio de cultura, com 10% SFB a 37 °C, por 24 horas, sem agitação, na proporção de 0,2 g/mL de meio. Depois de transcorrido esse período, o meio foi recolhido, permitindo, desta forma, avaliar o possível efeito de substâncias liberadas pelos diferentes materiais, que poderiam estar presentes no meio de cultura. O teste de citotoxicidade por extratos foi feito de acordo com recomendações internacionais (ISO 10993-5). Como controle positivo, foi utilizado solução de etanol 70%, em meio de cultura. Já para o controle negativo de toxicidade foi usada a própria placa de cultura livre de tratamento.

Para o ensaio de toxicidade celular foi utilizada uma modificação do método descrito por MURAKAMI *et al.* 1998. Resumidamente, as amostras foram adicionadas a uma placa de 96 poços com meio durante 24 horas a 37 °C. Terminada a incubação, as células foram mantidas durante 24 horas, lavadas com água destilada e fixadas em formalina a 10% (em PBS 0,1 M, pH 7,4, a 37 °C) durante 15 min. Após, foram lavadas em PBS (Tampão fosfato salino) e coradas com cristal violeta a 0,5% (em 20% de metanol) durante 15 min. As amostras, foram, então, lavadas três vezes, com PBS 0,1 M e incubadas com citrato de sódio 0,1 M em etanol a 50%, com pH 4,2, durante 30 min. Os poços foram lidos em leitor de microplacas Epoch (Biotek) no comprimento de onda de 540 nm.

4.2.4.3 Teste de contato direto

As amostras foram colocadas em placa de cultura de 24 poços. As células foram inoculadas na concentração de cerca de $1,0 \times 10^5$ células/poço (1,0 mL) sobre as amostras. As células foram mantidas em meio DMEM (Dulbecco

modification of minimum essential média) com 10% de SFB a 37° C com 5% CO₂, sendo o meio trocado diariamente.

As células foram fixadas em paraformaldeído 2,5% (em PBS – Tampão fosfato salino, 0,1M em pH 7,2) na própria placa de cultura e lavadas em água destilada duas vezes. Então, as amostras foram fotografadas em microscópio invertido (Zeiss Axio observer A1) com a objetiva de 20x. As imagens foram capturas pelo programa Axiovision. As amostras foram guardadas para posterior análise citoquímica.

4.2.4.4 Análise morfológica e citoquímica

Para análise geral da morfologia celular, as células foram coradas com cresil violeta (Sigma Aldrich). Para a análise citoquímica, utilizaram-se as colorações com azul de toluidina (Sigma Aldrich) em pH 4,0 para evidenciar o DNA, RNA e os glicosaminoglicanos, e o corante Xylidine Ponceau (Sigma Aldrich) em pH 2,5 para evidenciar as proteínas totais (LISON, 1960; MÓDIS, 1991; MELLO, 1997).

5. Análise estatística

A análise estatística foi efetuada individualmente para cada variável de resposta quantitativa: as unidades formadoras de colônias (UFC); o ensaio de microdureza (HV); o ensaio de dureza Shore D e o teste de contato indireto. A avaliação da citotoxicidade pelo teste de contato direto foi efetuada de forma qualitativa descritiva.

Para a análise estatística, primeiramente foi realizado teste de normalidade e homogeneidade das variâncias, por meio dos testes de Levene e Shapiro-Wilk. Nos casos de normalidade e homogeneidade das variâncias, foi efetuado teste de análise de variância (ANOVA) seguida do teste *post hoc* de Tukey. Foi efetuada também a comparação estatística entre o número de bactérias aderidas às amostras de aço e alumínio antes e após o tratamento de superfície por meio do teste *t* de Student.

As análises efetuadas em cada fase estão detalhadas nos Resultados. Para as análises, foi empregado os *softwares* estatísticos GraphPad Prisma 7.04

e programa Microsoft Excel versão 2010. O nível de significância estatístico adotado foi de 5%.

6 RESULTADOS

6.1 Testes do calor úmido

A Figura 18a) mostra os indicadores químicos do tipo 4 e a Figura 18b) mostra o indicador químico tipo 5 antes e após passar pelo processo de esterilização por calor úmido. Eles mostram a efetividade do processo de esterilização com a mudança da cor da fita de rosa para marrom escuro.

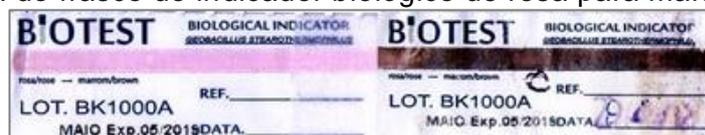
Figura 18 – Indicadores químicos tipos 4 e 5 utilizados antes e após o ciclo de esterilização.



Fonte: elaboração da autora.

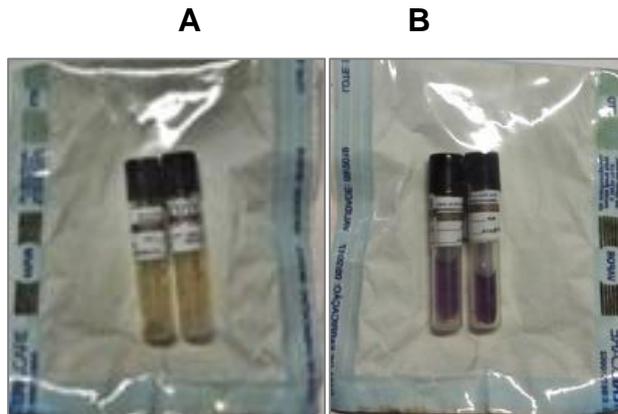
A Figura 19 mostra a fita do indicador biológico após passar por esterilização por calor úmido. Há uma mudança de cor de rosa para marrom.

Figura 19 - Indicador biológico esterilizado em calor úmido e a mudança da cor da fita do frasco do indicador biológico de rosa para marrom.



Fonte: elaboração da autora.

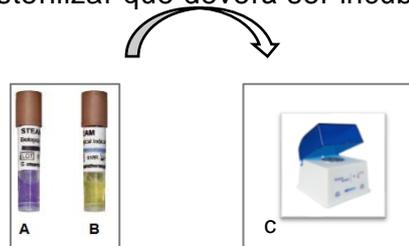
Figura 20 - Indicador biológico antes de passar pelo processo de esterilização (A) e após passar pelo processo de esterilização (B).



Fonte: elaboração da autora.

A Figura 20 mostra o indicador biológico antes (A) e depois (B) de passar pela esterilização por calor úmido. Na figura 22, o passo seguinte, a realização de incubação por 48 horas.

Figura 21 - Indicador biológico A controle negativo esterilizado e B controle positivo sem esterilizar que deverá ser incubado por 48hs.



Fonte: elaboração da autora.

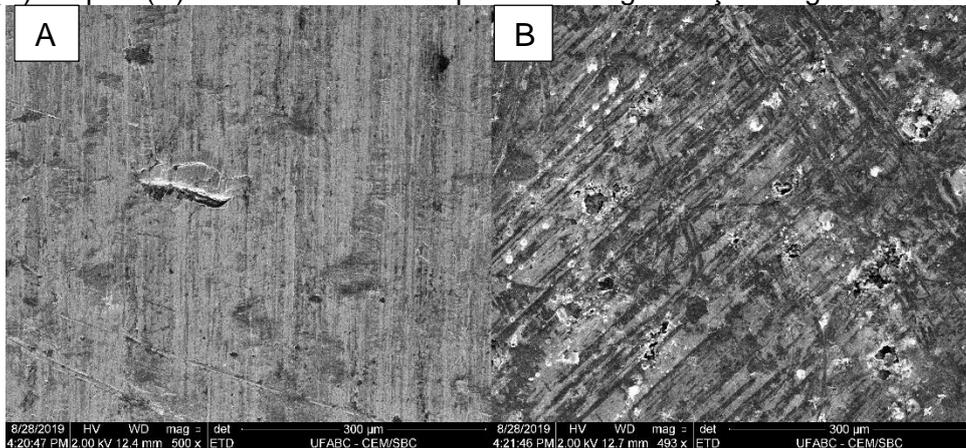
As anotações do controle do processo de esterilização por calor úmido utilizado para esterilizar os materiais deste estudo estão nos anexos.

6.2 Fase experimental 1 – teste microbiológico

6.2.1 Adesão bacteriana após tratamento de superfície do alumínio 1100 e do aço AISI 304

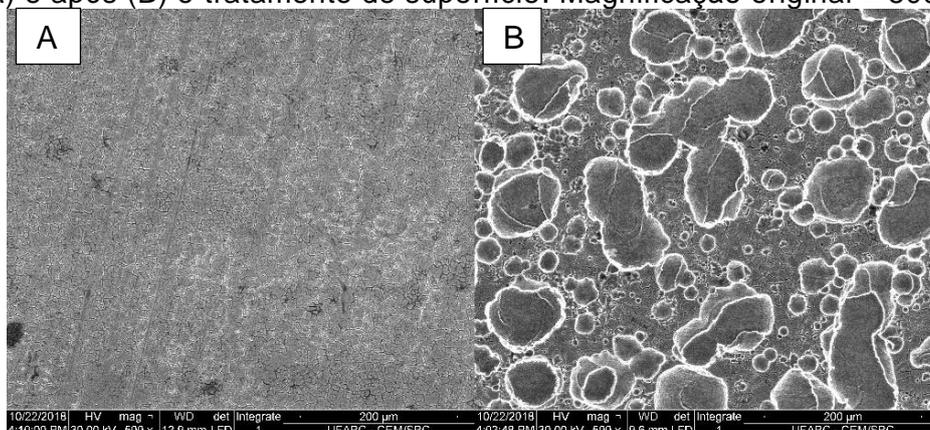
As alterações na morfologia superficial resultantes do tratamento da superfície realizado sobre as amostras dos materiais estão representados nas Figuras 22 (alumínio 1100) e 23 (Aço AISI 304). É possível notar que houve alteração da superfície, sendo promovidas micro rugosidades que favoreceram a adesão bacteriana.

Figura 22 – Eletromicrografias representativas de amostras do alumínio 1100 antes (A) e após (B) o tratamento de superfície. Magnificação original = 500 x.



Fonte: elaboração da autora.

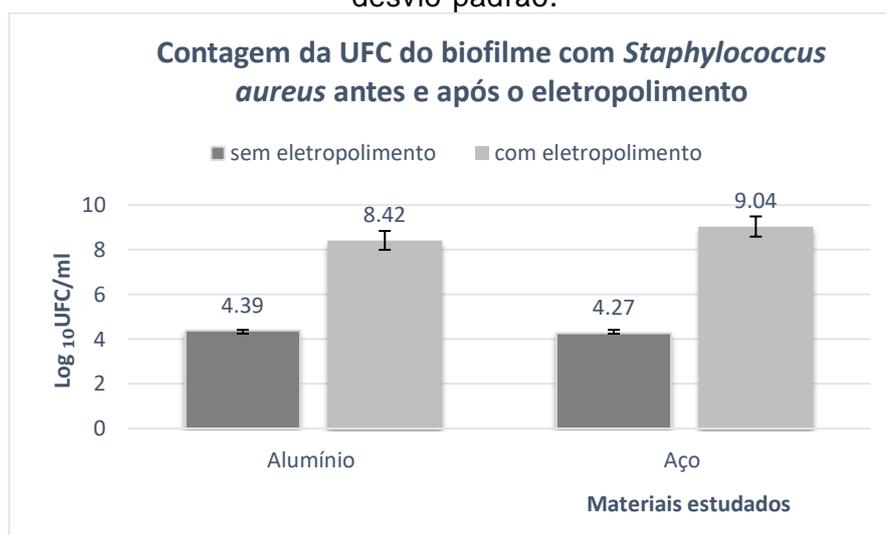
Figura 23 – Eletromicrografias representativas de amostra do aço AISI 304 antes (A) e após (B) o tratamento de superfície. Magnificação original = 500 x.



Fonte: elaboração da autora.

De acordo com o teste estatístico *t* de Student, o aumento do número de bactérias após o tratamento de superfície realizado sobre as amostras do alumínio 1100 e do aço AISI 304 aumentou significativamente (com $p < 0,001$). Após o tratamento de superfície, houve aumento de 92% do número de bactérias nas amostras de alumínio e, para as amostras do aço AISI 304, houve aumento de 117% do biofilme com *S. aureus* (Figura 24).

Figura 24 – Médias do número de bactérias antes e após o tratamento de superfície nas amostras do aço AISI 304 e do alumínio 1100. As barras indicam desvio-padrão.



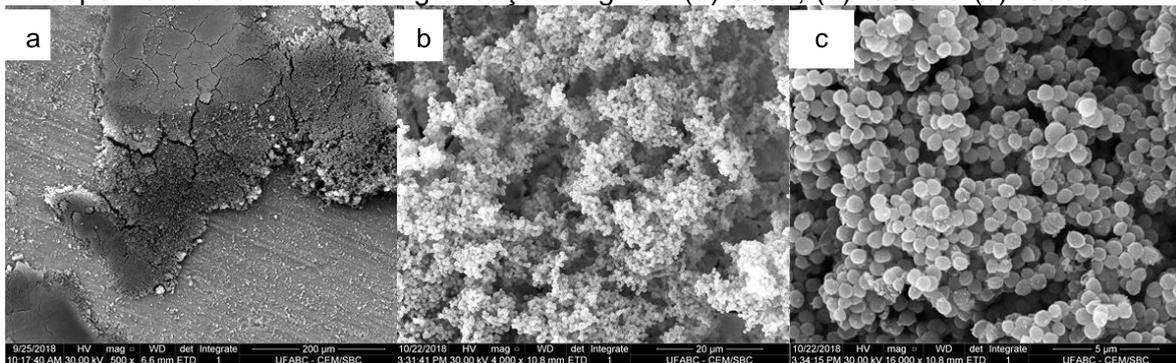
Fonte: elaboração da autora.

6.2.2 Análise morfológica do biofilme com *S. aureus* cultivado sobre a superfície dos materiais

A caracterização morfológica do biofilme com *S. aureus* sobre a superfície dos materiais estudados (polipropileno, alumínio 1100 e aço AISI 304) está representada nas Figuras 25, 26 e 27, respectivamente. O crescimento do biofilme foi visualizado em todas as amostras dos materiais com adesão, espalhamento e formação da estrutura tridimensional ligada à matriz polimérica.

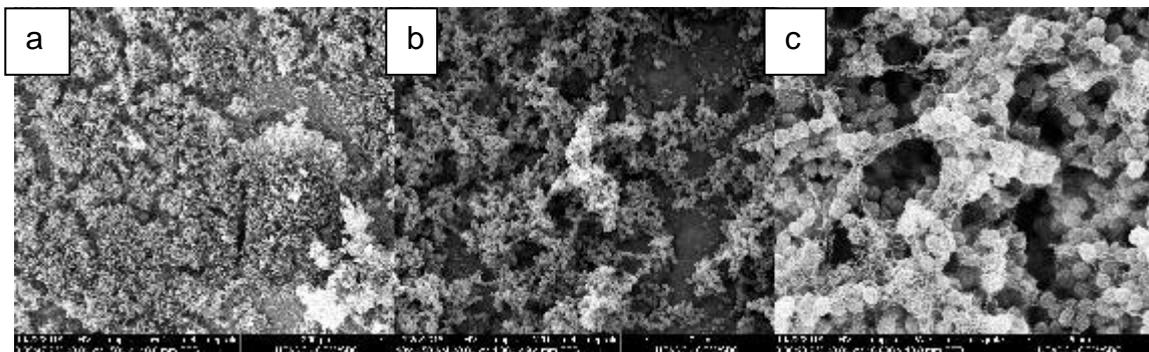
A Figura 25(a) mostra a adesão, e espalhamento do biofilme com *Staphylococcus aureus* sobre a superfície do alumínio. Nas imagens (b) e (c), observa-se que as bactérias estão em formato de cocos agrupados com formação da estrutura tridimensional ligados à matriz polimérica.

Figura 25 - Eletromicrografias representativas de biofilme de *S. aureus* sobre a superfície do alumínio. Magnificação original: (a) 500x; (b)4000x e (c)16000x.



Fonte: elaboração da autora.

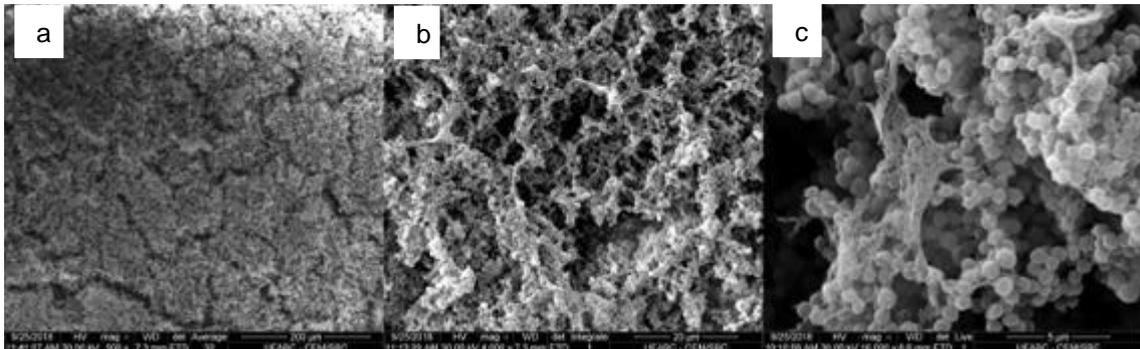
Figura 26- Eletromicrografias representativas de biofilme de *S. aureus* sobre a superfície do aço Aisi 304. Magnificação original: (a) 500x, (b)4000x e (c)16000 x.



Fonte: elaboração da autora.

De acordo com a Figura 26, o biofilme de *S. aureus* apresentou adesão e espalhamento também sobre a superfície do aço AISI 304, com formação de estrutura tridimensional ligadas à matriz polimérica. A Figura 27 (a) mostra o espalhamento, o crescimento e a adesão do biofilme sobre a superfície do polipropileno. Nas figuras (b) e (c), observa-se a presença de cocos agrupados com aspecto semelhante a cachos de uva, característicos da bactéria cultivada, ligados à matriz polimérica, que inicia após a adesão das bactérias à superfície, e compõe 90% da biomassa do biofilme.

Figura 27- Eletromicrografias representativas de biofilme de *S. aureus* sobre a superfície do polipropileno. Magnificação original: (a) 500x; (b)4000x; e (c) 16000x.

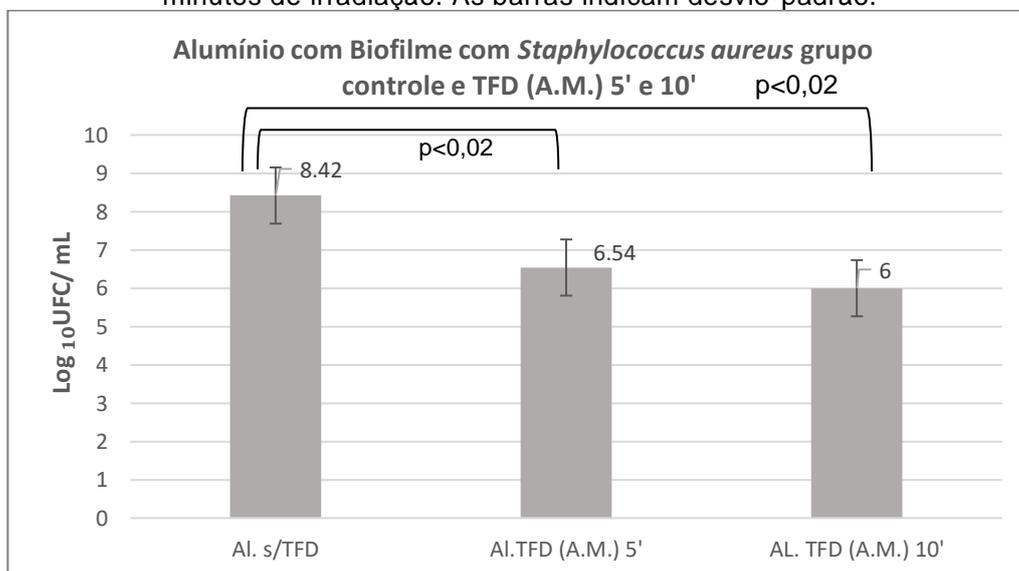


Fonte: elaboração da autora.

6.2.3 Efeitos da TFD com A.M. puro e com A.M. adicionado de ureia sobre o biofilme contendo *S. aureus* cultivado nos materiais

A Figura 28 mostra a quantidade média de bactérias presentes nas amostras do alumínio 1100 sem tratamento e após tratamentos com TFD com A.M. puro, sob diferentes tempos de irradiação. Foi possível observar redução estatisticamente significativa ($p < 0,02$), de $8,42 \log_{10}$ UFC/mL para $6,54 \log_{10}$ UFC/mL e $6 \log_{10}$ UFC/mL nos grupos irradiados durante 5 e 10 minutos, respectivamente.

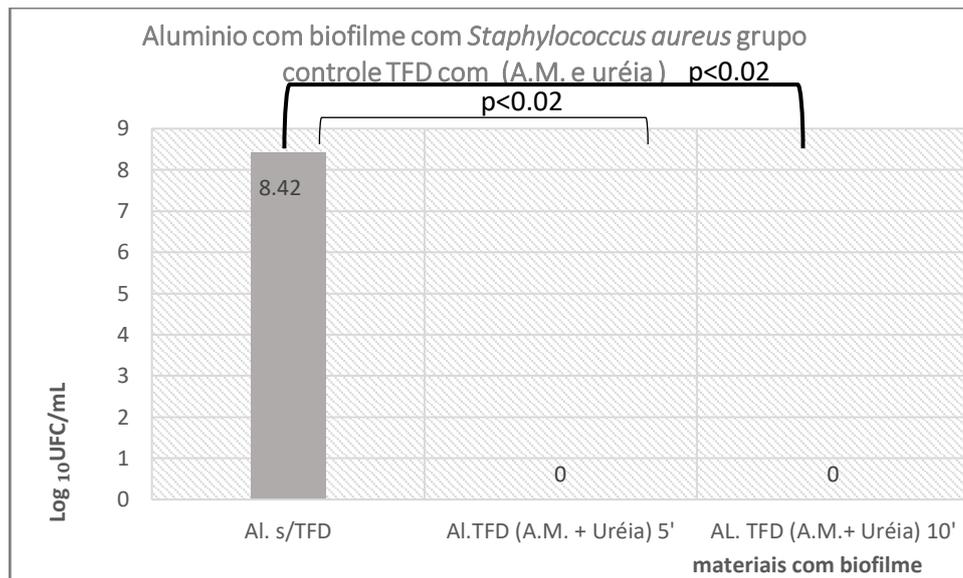
Figura 28 Valores médios da quantidade de bactérias (em \log_{10} UFC/mL) do alumínio 1100 contendo biofilme com *S. aureus* sem irradiação e após TFD (A.M.), por 5 e 10 minutos de irradiação. As barras indicam desvio-padrão.



Fonte: elaboração da autora.

A Figura 29 mostra os valores médios da quantidade de bactérias observados no alumínio 1100 sem irradiação e após TFD com A.M. adicionado de ureia. Nota-se que houve redução total do biofilme em ambos os tempos de irradiação.

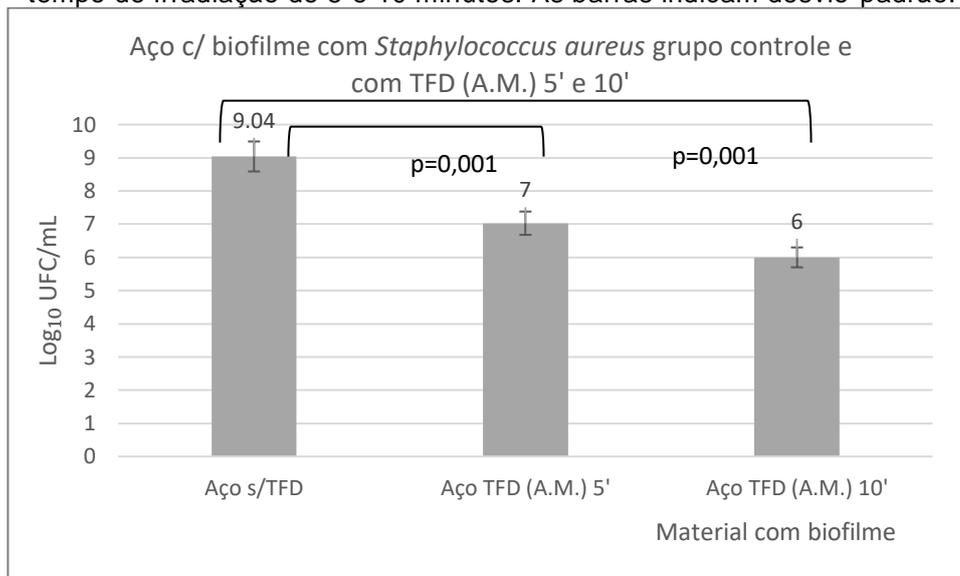
Figura 29 – Valores médios da quantidade de bactérias (em \log_{10} UFC/mL) do alumínio 1100 contendo biofilme com *S. aureus* sem irradiação e após TFD (A.M.+ ureia) 5 e 10 minutos de irradiação. As barras indicam desvio-padrão.



Fonte: elaboração da autora.

A Figura 30 mostra a redução do biofilme com *S. aureus* sobre a superfície do aço AISI 304, após a TFD com A.M. puro. É possível evidenciar redução estatisticamente significativa (com $p < 0,001$) da quantidade de bactérias, de 9,04 \log_{10} UFC/mL para 7,00 \log_{10} UFC/mL e 6,0 \log_{10} UFC/mL após 5 e 10 minutos de irradiação, respectivamente.

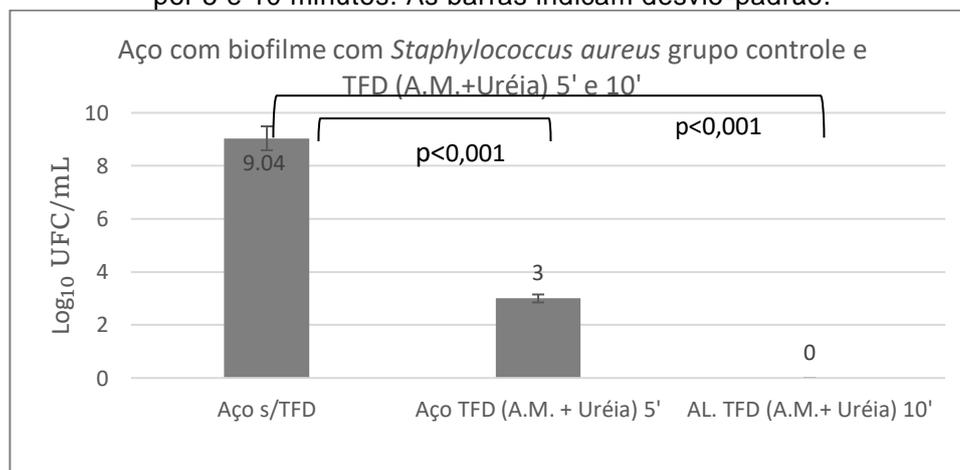
Figura 30 - Valores médios da quantidade de bactérias (em \log_{10} UFC/mL) das amostras do aço AISI 304 contendo biofilme de *S. aureus* do grupo sem e com a TFD com A.M., com tempo de irradiação de 5 e 10 minutos. As barras indicam desvio-padrão.



Fonte: elaboração da autora.

A Figura 31 mostra o valor médio da quantidade de bactérias (em Log₁₀ UFC/mL) presentes nas amostras de aço AISI 304, sem e após passar pela TFD utilizando o fotossensibilizador A.M. adicionado de ureia. É possível notar uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,001$), de 9,04 \log_{10} UFC/mL para 3 \log_{10} UFC/mL após 5 minutos de irradiação e redução total com tempo de 10 minutos.

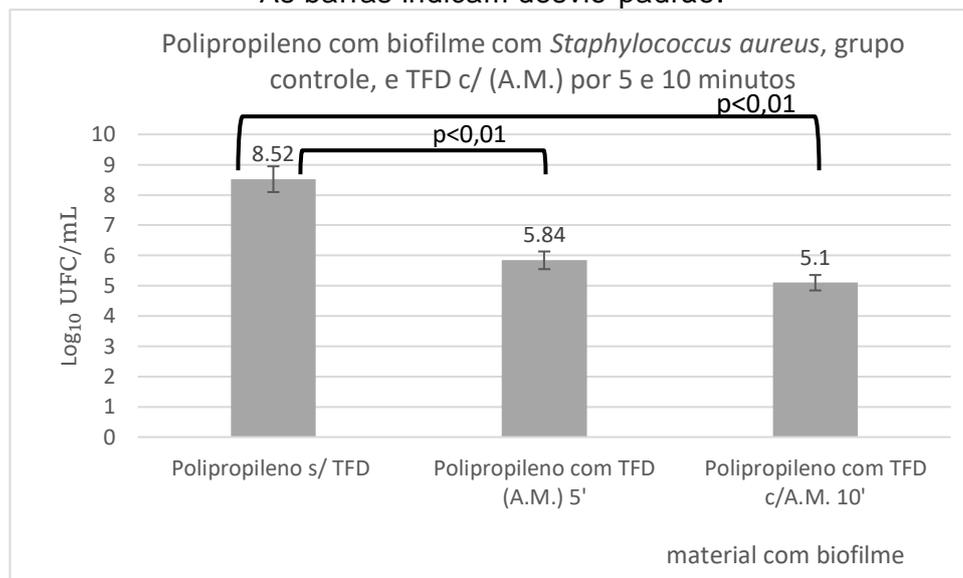
Figura 31 - Valores médios da quantidade de bactérias (em Log₁₀ UFC/mL) do aço AISI 304 contendo biofilme com *S. aureus* sem irradiação e após TFD (A.M. + ureia) irradiada por 5 e 10 minutos. As barras indicam desvio-padrão.



Fonte: elaboração da autora.

A Figura 32 mostra os valores médios da quantidade de biofilme sobre as amostras de polipropileno tratadas com TFD e A.M. puro. Observa-se redução estatisticamente significativa ($p < 0,01$), de $8,52 \log_{10}$ UFC/mL para $5,84 \log_{10}$ UFC/mL e $5,1 \log_{10}$ UFC/mL nas amostras após 5 e 10 minutos de irradiação, respectivamente.

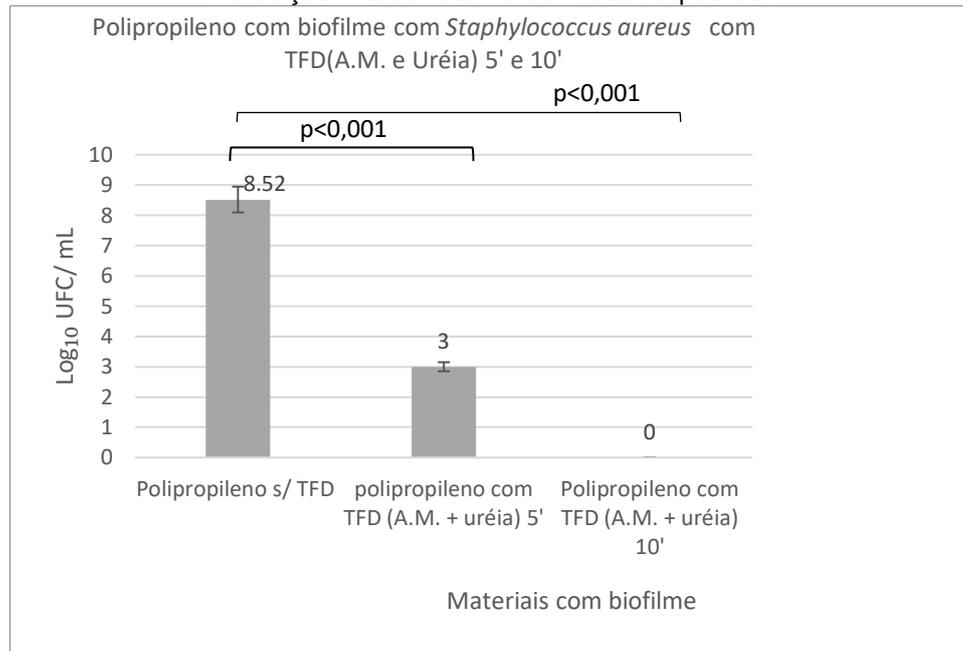
Figura 32– Valores médios da quantidade de bactérias (em \log_{10} UFC/mL) sobre a amostra do PP sem irradiação e após TFD (A.M.) por 5 e 10 minutos de irradiação. As barras indicam desvio-padrão.



Fonte: elaboração da autora.

A Figura 33 mostra os valores médios da quantidade de bactérias sobre a amostra do PP sem irradiação e após a TFD com A.M. adicionado de ureia por 5 e 10 minutos de irradiação. Nota-se com redução estatisticamente significativa após TFD ($p < 0,001$), com valor final de $3 \log_{10}$ UFC/mL para as amostras irradiadas por 5 minutos e redução total para as amostras irradiadas por 10 minutos.

Figura 33 – Valores médios da quantidade de bactérias (em \log_{10} UFC/mL) sobre a amostra do PP sem irradiação e após TFD com A.M. adicionado de ureia por 5 e 10 minutos de irradiação. As barras indicam desvio-padrão.

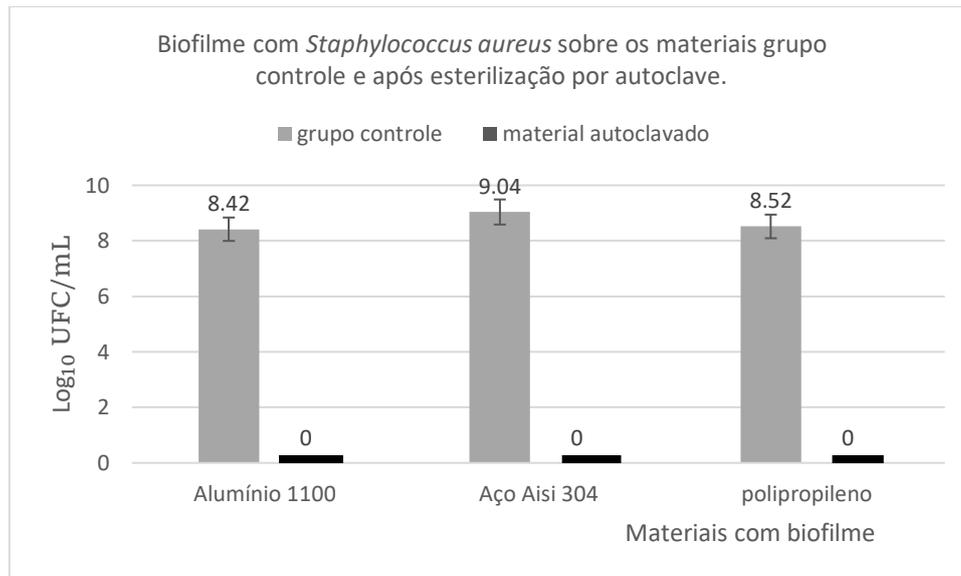


Fonte: elaboração da autora.

6.2.3 Efeito do calor úmido sobre o biofilme com *S. aureus* cultivado nos materiais

Na Figura 34 verifica-se os efeitos promovidos pelo calor úmido nos diferentes materiais testados. É possível notar uma redução significativa na quantidade de bactérias em relação ao grupo controle negativo (sem tratamento), ou seja, em todos os materiais, o calor úmido eliminou completamente o biofilme.

Figura 34 – Valores médios da quantidade de bactérias (em \log_{10} UFC/mL) sobre as amostras dos diferentes materiais testados sem esterilização e após esterilização c/ autoclave. As barras indicam desvio-padrão.

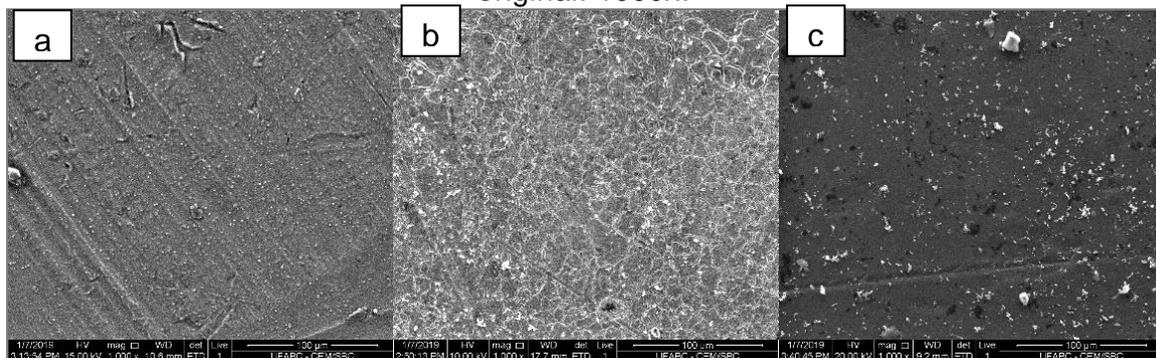


Fonte: elaboração da autora.

6.2.4 Análise morfológica dos materiais com biofilme após os tratamentos

A Figura 35 mostra imagens representativas, obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), dos três materiais estudados, nos quais foi cultivado o biofilme com *Staphylococcus aureus* e, em seguida, efetuada a TFD com azul de metileno com 10 minutos de irradiação. As imagens mostram que houve ruptura do biofilme e interrupção da estrutura do mesmo sobre a superfície dos materiais.

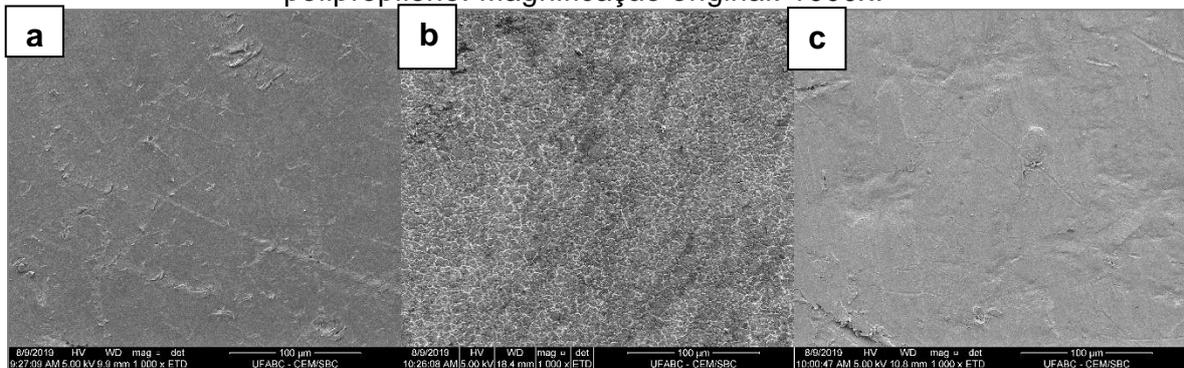
Figura 35– Eletromicrografias representativas dos materiais com biofilme de *Staphylococcus aureus*, após o tratamento com a TFD com azul de metileno e irradiação por 10 minutos: (a) alumínio, (b) aço, (c) polipropileno. Magnificação original: 1000x.



Fonte: elaboração da autora.

A figura 36 mostra as imagens dos três materiais, que continham o biofilme com *Staphylococcus aureus*, imediatamente após a TFD com A.M. adicionado de uréia, utilizando o tempo de irradiação de 10 minutos. Nota-se a interrupção da formação do biofilme em todos os materiais avaliados.

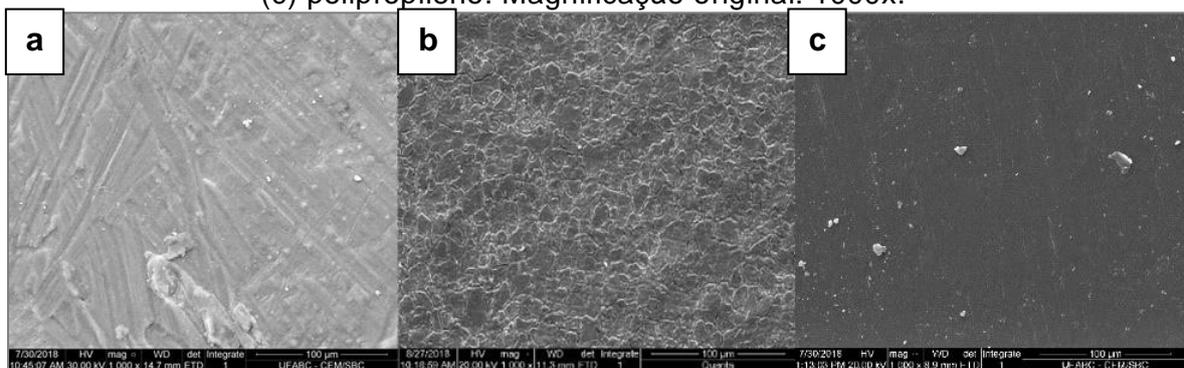
Figura 36 – Eletromicrografias representativas dos materiais que continham biofilme com *Staphylococcus aureus*, após a esterilização com a TFD utilizando o fotossensibilizador azul de metileno adicionado de uréia: (a) alumínio, (b) aço, (c) polipropileno. Magnificação original: 1000x.



Fonte: elaboração da autora.

A figura 37 mostra as imagens dos materiais, o aço AISI 304, o alumínio 1100 e o PP que continham o biofilme com o *S. aureus* após passar por esterilização por calor úmido. Foi observada redução total do biofilme também em todos os materiais.

Figura 37 – Eletromicrografias representativas dos materiais que continham biofilme com *S. aureus*, após a esterilização com autoclave: (a) alumínio, (b) aço, (c) polipropileno. Magnificação original: 1000x.



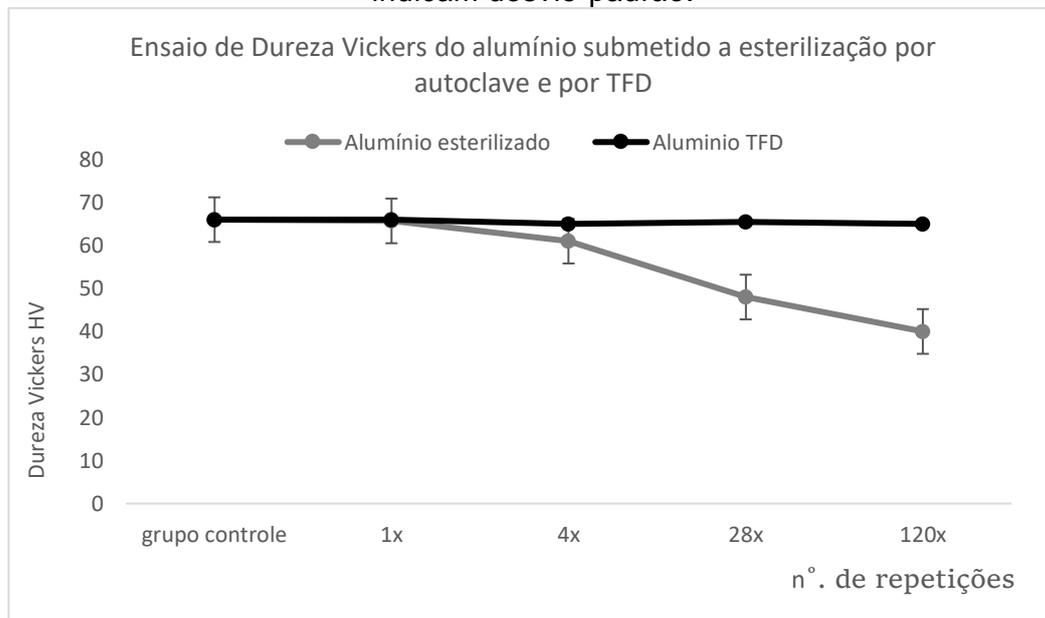
Fonte: elaboração da autora.

6.3 Fase experimental 2 – teste de microdureza

6.3.1 Microdureza Vickers

A Figura 38 ilustra o resultado do teste de microdureza Vickers obtidos nas amostras de alumínio após tratamento com calor úmido ou TFD com A.M., por diferentes repetições. Nota-se que o alumínio tratado com calor úmido apresentou maior redução da microdureza (Anova e Tukey), após 28 repetições ($p < 0,02$) e 120 repetições ($p < 0,03$), quando comparados com o tratamento por TFD nas mesmas repetições.

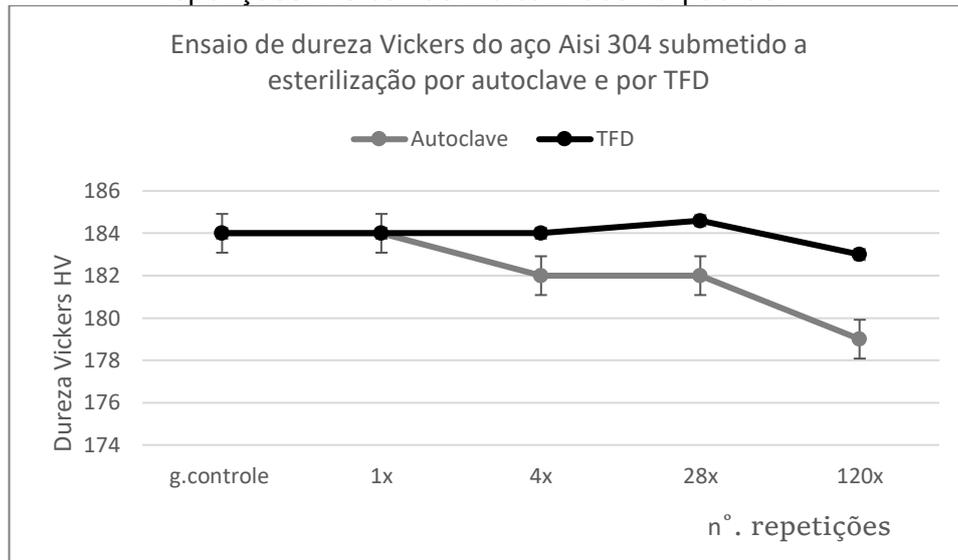
Figura 38 – Comparação dos valores médios de microdureza Vickers do alumínio após tratamento com autoclave ou com TFD por diferentes repetições. As barras indicam desvio-padrão.



Fonte: elaboração da autora.

A Figura 39 ilustra a análise comparativa entre os valores médios de microdureza Vickers observados nas amostras do aço AISI 304 após tratamento por calor úmido ou TFD com A.M., com diferentes repetições. O aço apresentou maior redução da microdureza para a amostra que foi tratada com calor úmido por 120 repetições (Anova e Tukey, $p < 0,02$).

Figura 39 – Comparação dos valores médios de microdureza Vickers do aço AISI 304 após tratamento com calor úmido ou com TFD com A.M., por diferentes repetições. As barras indicam desvio-padrão.

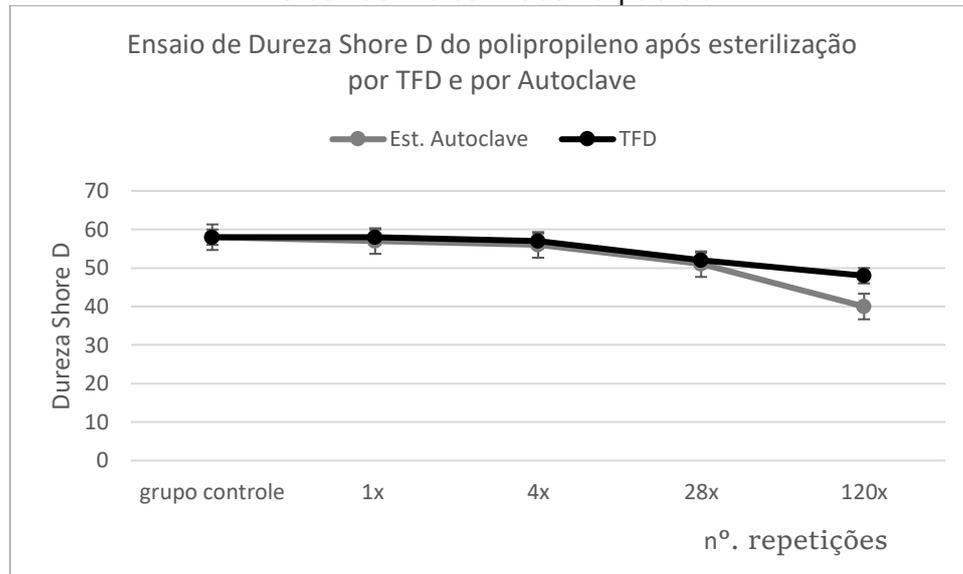


Fonte: elaboração da autora.

6.3.2 Dureza Shore D do polipropileno

De acordo com os resultados obtidos, é possível inferir que o polipropileno tratado com calor úmido por 120 repetições apresentou redução estatisticamente significativa ($p < 0,02$), com maior redução da dureza (de 59D para 40D) em comparação com a amostra que passou por TFD com A.M. por 120 repetições (de 59 D para 48 D), conforme mostra a Figura 40.

Figura 40 - Comparação dos valores médios de dureza Shore D do polipropileno após tratamento com calor seco ou com TFD com A.M. por diferentes repetições. As barras indicam desvio-padrão.



Fonte: elaboração da autora.

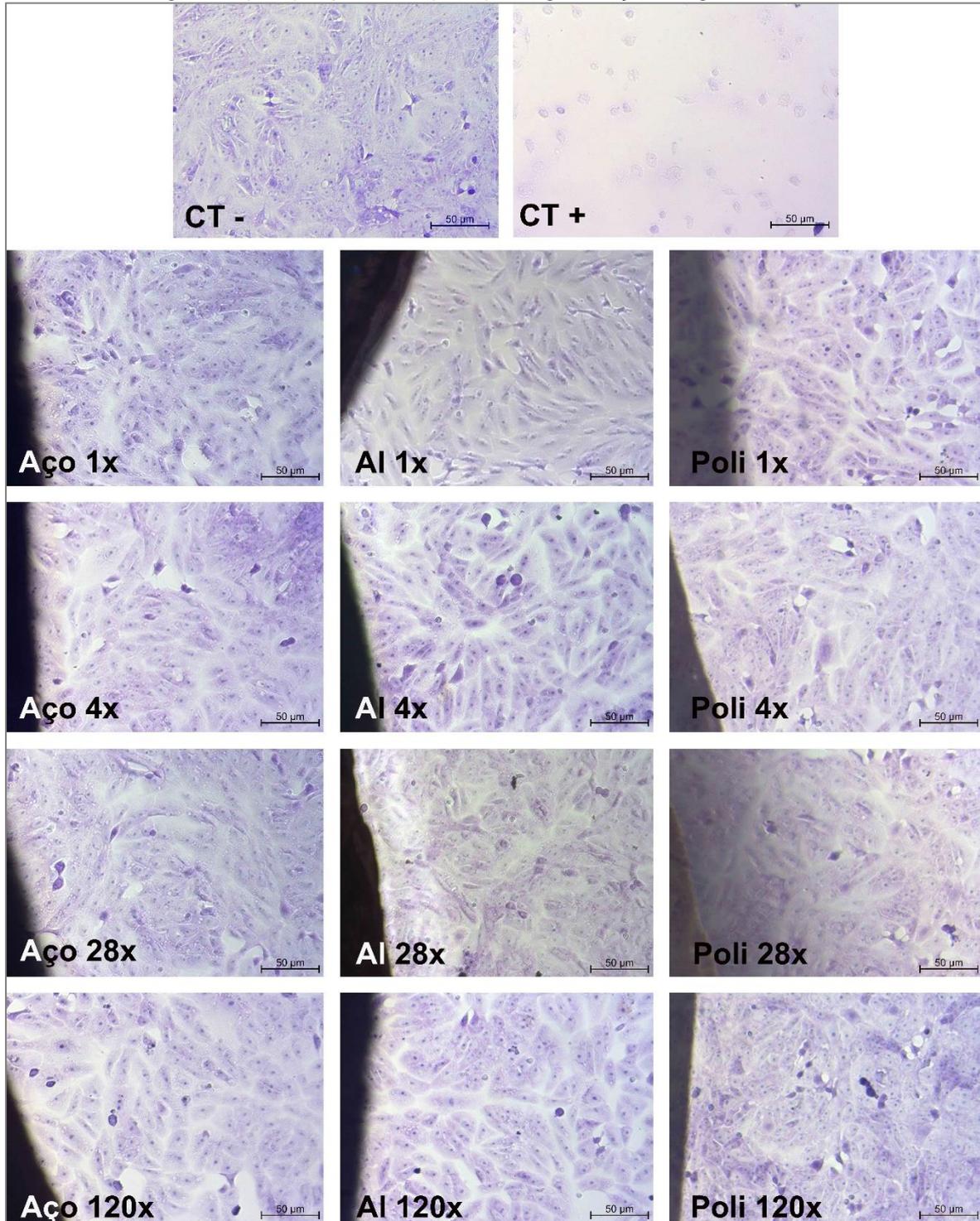
6.4 Fase experimental 3 – teste de citotoxicidade

6.4.1 Testes de contato direto

A Figura 41 apresenta as células que cresceram sobre as amostras tratadas com TFD com A.M. puro. Nota-se que as mesmas apresentam características semelhantes às células do grupo controle negativo, ou seja, mantiveram o formato alongado e o crescimento em monocamada.

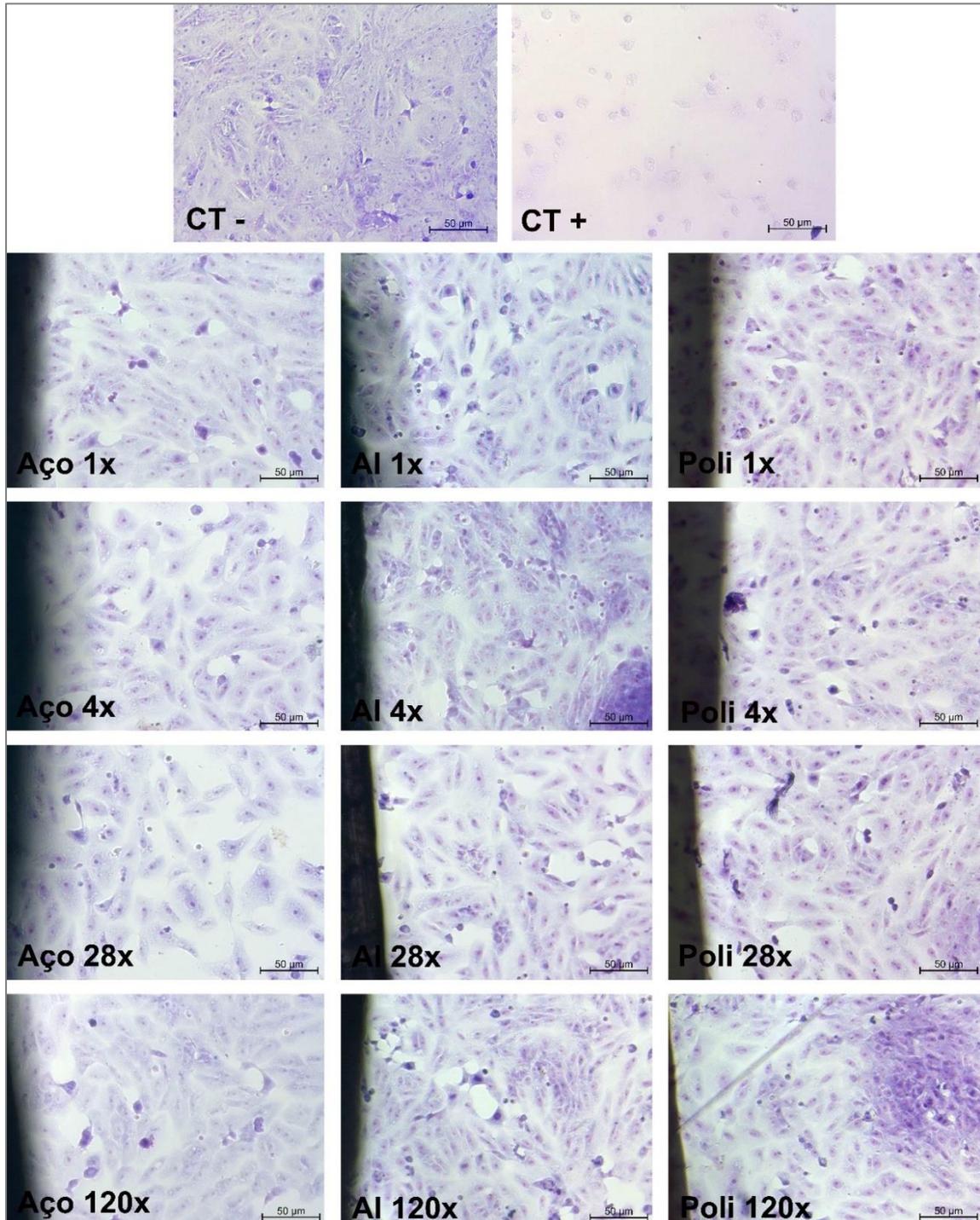
A figura 42 apresenta as células que cresceram juntamente com as amostras dos três materiais após tratamento com calor seco. Também é possível observar que não houve sinais de citotoxicidade, ou seja, as células Vero não apresentaram alteração na forma e no crescimento quando comparadas às células do grupo controle negativo para citotoxicidade.

Figura 41 – Imagens representativas das amostras dos três materiais (Aço = aço inoxidável; Al = alumínio; Poli = polipropileno) submetidas à TFD com A.M. puro, sob diferentes repetições (1x, 4x, 28x e 120x), obtidas por meio do ensaio de toxicidade direta por contraste de fase, em comparação com os grupos controle negativo (CT-) e positivo (CT+). Magnificação original: 200x.



Fonte: elaboração da autora.

Figura 42 – Imagens representativas das amostras dos três materiais (Aço = aço inoxidável; Al = alumínio; Poli = polipropileno) submetidas ao tratamento com calor seco, sob diferentes repetições (1x, 4x, 28x e 120x), obtidas por meio do ensaio de toxicidade direta por contraste de fase, em comparação com os grupos controle negativo (CT-) e positivo (CT+). Magnificação original: 200x.

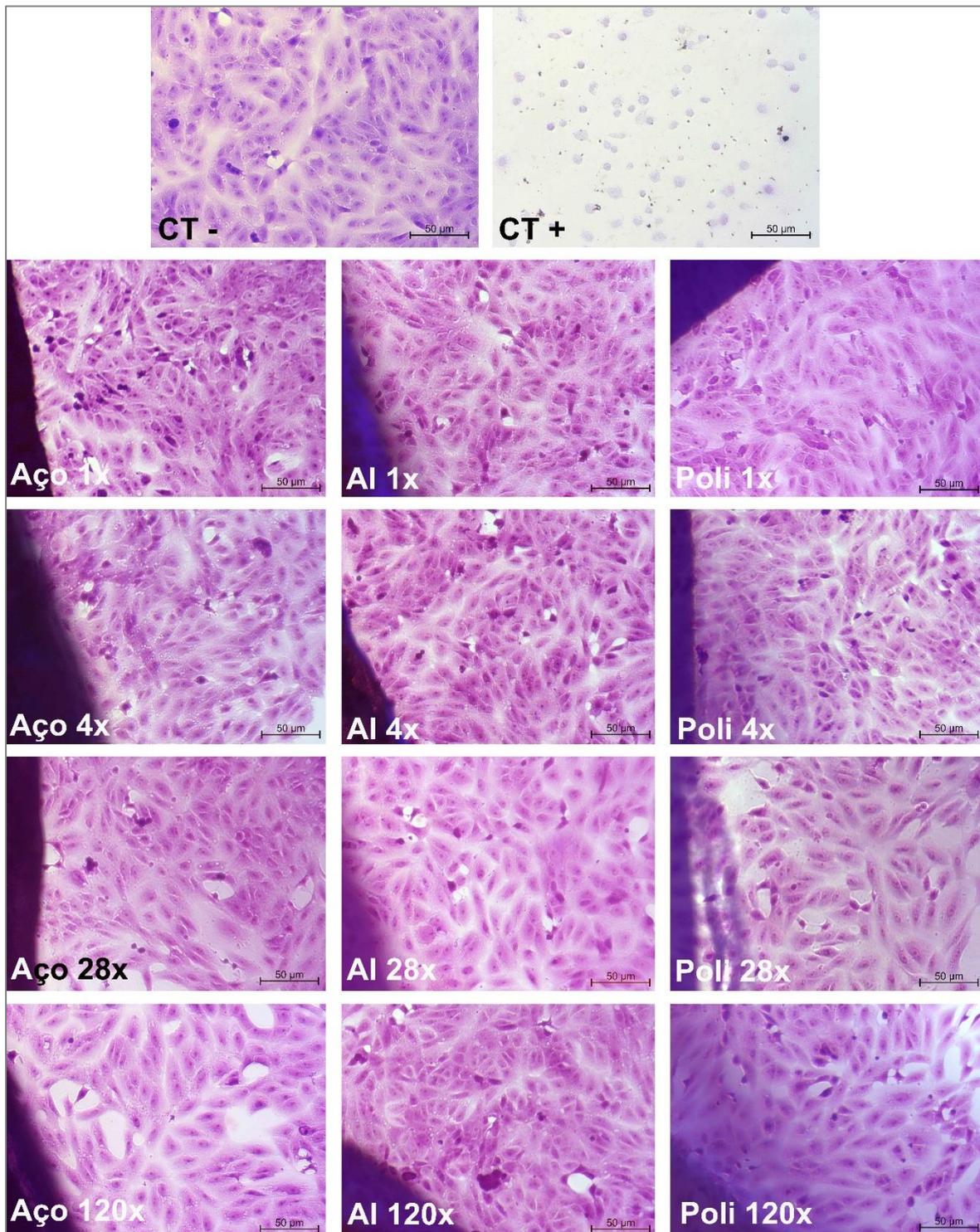


Fonte: elaboração da autora.

6.4.2 Análise da morfologia celular após tratamentos

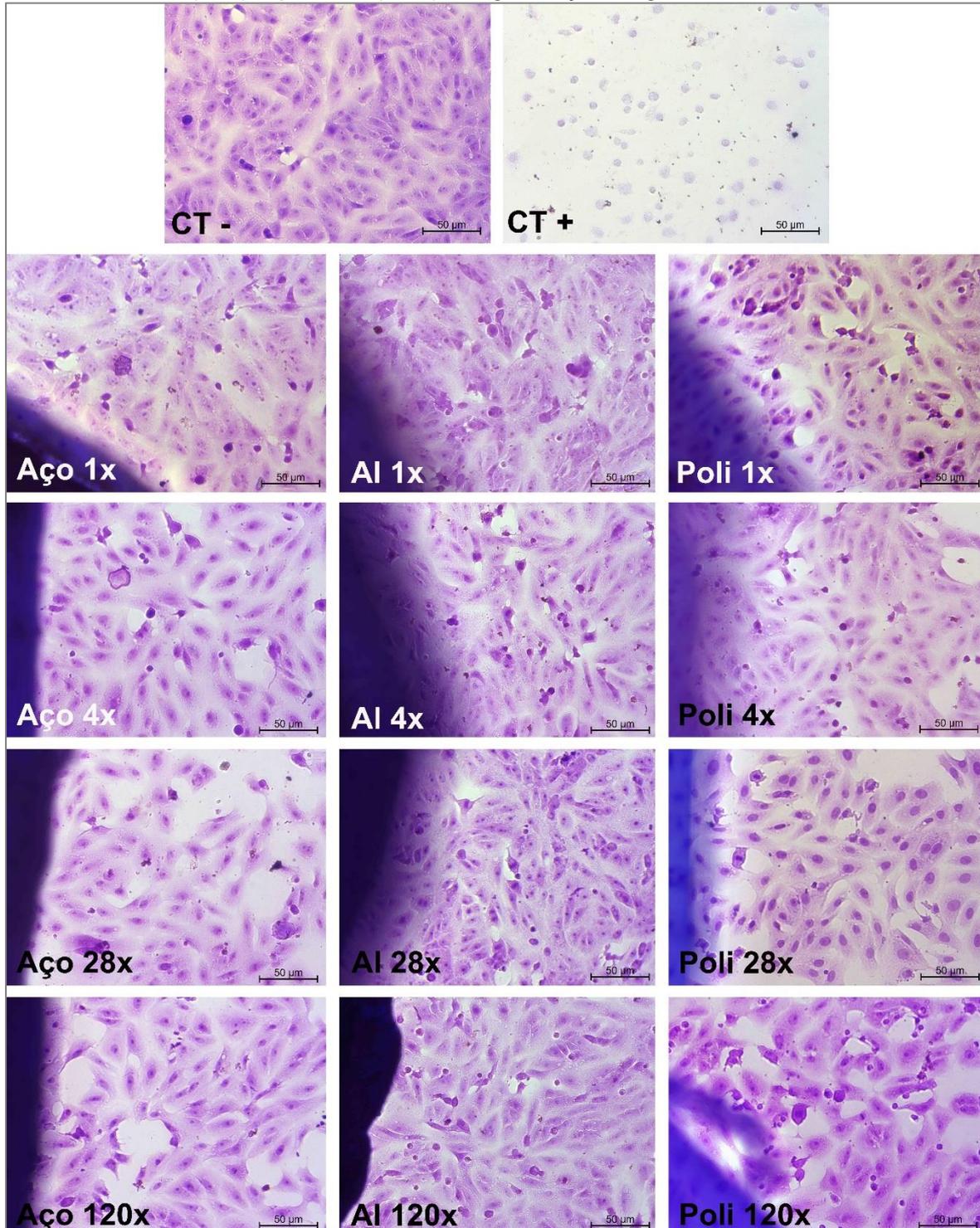
A análise da morfologia celular das células que cresceram sobre os materiais tratados com TFD com A.M. puro ou calor seco evidenciou não haver alteração celular quando comparadas às células que cresceram no grupo controle negativo. As células Vero apresentaram características semelhantes ao grupo controle negativo com adesão, espalhamento, crescimento em monocamada e morfologia alongada, aspectos característicos da forma *in vitro* das células Vero, conforme pode ser observado na Figura 43 e na Figura 44.

Figura 43 – Análise morfológica, com cristal violeta, das células que cresceram juntamente com as amostras dos materiais (Aço = aço inoxidável; Al = alumínio; Poli = polipropileno) submetidas ao tratamento com TFD com A.M. puro, sob diferentes repetições (1x, 4x, 28x e 120x), em comparação com os grupos controle negativo (CT-) e positivo (CT+). Magnificação original: 200x.



Fonte: elaboração da autora.

Figura 44 – Análise morfológica, com cristal violeta, das células que cresceram juntamente com as amostras dos materiais (Aço = aço inoxidável; Al = alumínio; Poli = polipropileno) submetidas ao tratamento com calor seco, sob diferentes repetições (1x, 4x, 28x e 120x), em comparação com os grupos controle negativo (CT-) e positivo (CT+). Magnificação original: 200x.



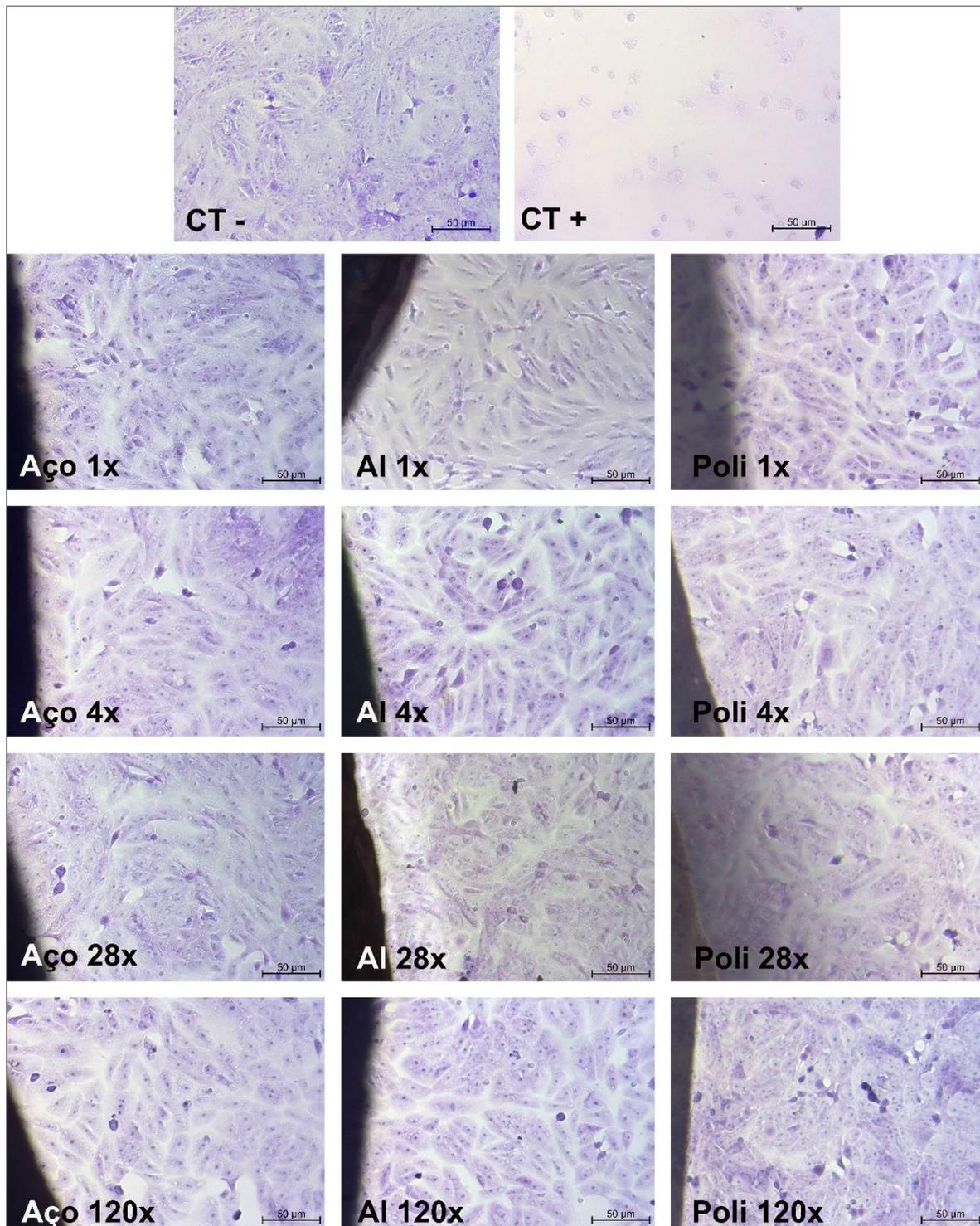
Fonte: elaboração da autora.

6.4.3 Análise citoquímica com azul de toluidina com pH 4,0

O corante utilizado para a análise citoquímica, azul de toluidina com pH 4,0, demonstrou a atividade celular, através da ligação do corante ao RNA, DNA e glicosaminoglicanos da célula. O corante azul de toluidina liga-se ao RNA do citoplasma que está localizado no retículo endoplasmático rugoso, caracterizando a atividade (SANTOS Jr., 1999; TOBOGA, 2013).

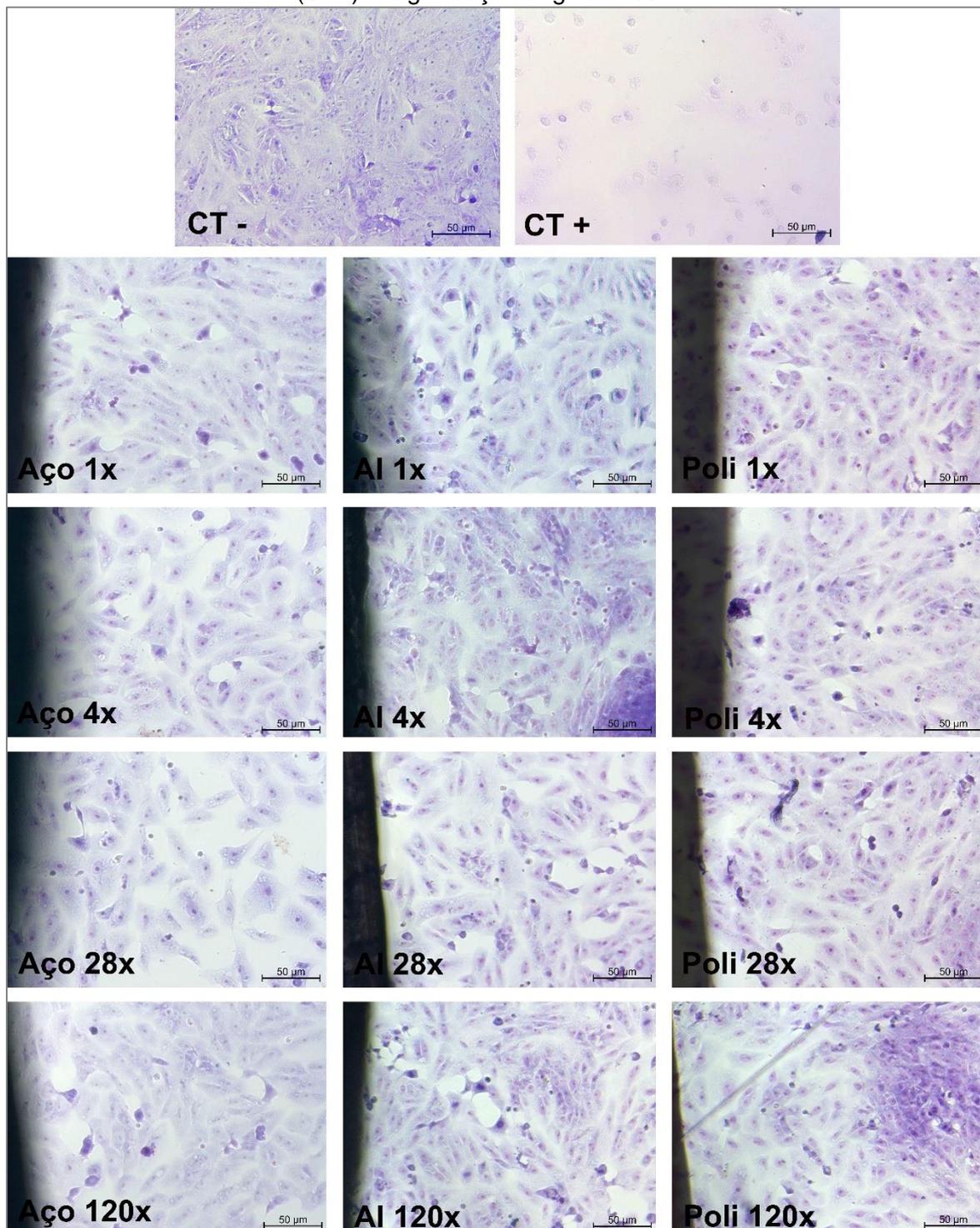
Analisando as imagens das Figuras 45 e 46, todos os substratos não apresentaram diferenças quando comparados com o grupo controle negativo, ou seja, nenhum dos tratamentos propostos e nenhuma das repetições promoveram alterações celulares.

Figura 45 – Análise citoquímica, com azul de toluidina, das células que cresceram juntamente com as amostras dos materiais (Aço = aço inoxidável; Al = alumínio; Poli = polipropileno) submetidas ao tratamento com TFD com A.M. puro, sob diferentes repetições (1x, 4x, 28x e 120x), em comparação com os grupos controle negativo (CT-) e positivo (CT+). Magnificação original: 200x.



Fonte: elaboração da autora.

Figura 46 - Análise citoquímica, com azul de toluidina, das células que cresceram juntamente com as amostras dos materiais (Aço = aço inoxidável; Al = alumínio; Poli = polipropileno) submetidas ao tratamento com calor seco, sob diferentes repetições (1x, 4x, 28x e 120x), em comparação com os grupos controle negativo (CT-) e positivo (CT+). Magnificação original: 200x.



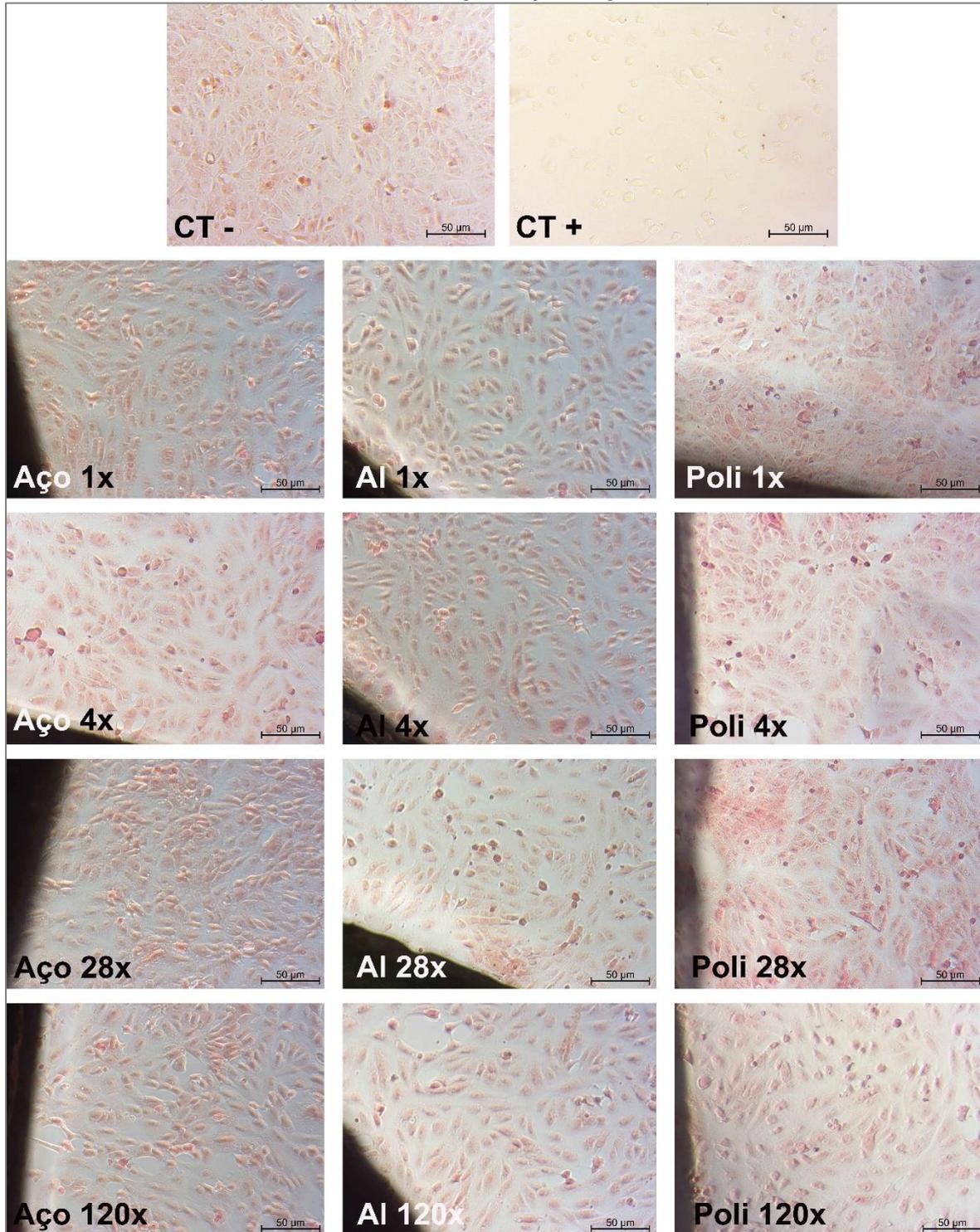
Fonte: elaboração da autora.

6.4.4 Análise citoquímica com Xylidine Ponceau com pH 2,5

O corante Xylidine Ponceau é um corante ácido utilizado para identificar os radicais catiônicos presentes nas proteínas. Com pH 2,5, evidencia as proteínas totais, mostrando que as células têm grande capacidade de síntese proteica e acumulam parte destas proteínas no citoplasma. Podemos citar que se trata de células com grande atividade funcional (LISON, 1960; MELLO, 1997; MODIS, 1991; OLIVEIRA, *et al.*,2014). A partir das Figuras 47 e 48, são observadas as proteínas totais coradas no retículo endoplasmático com formato arredondado.

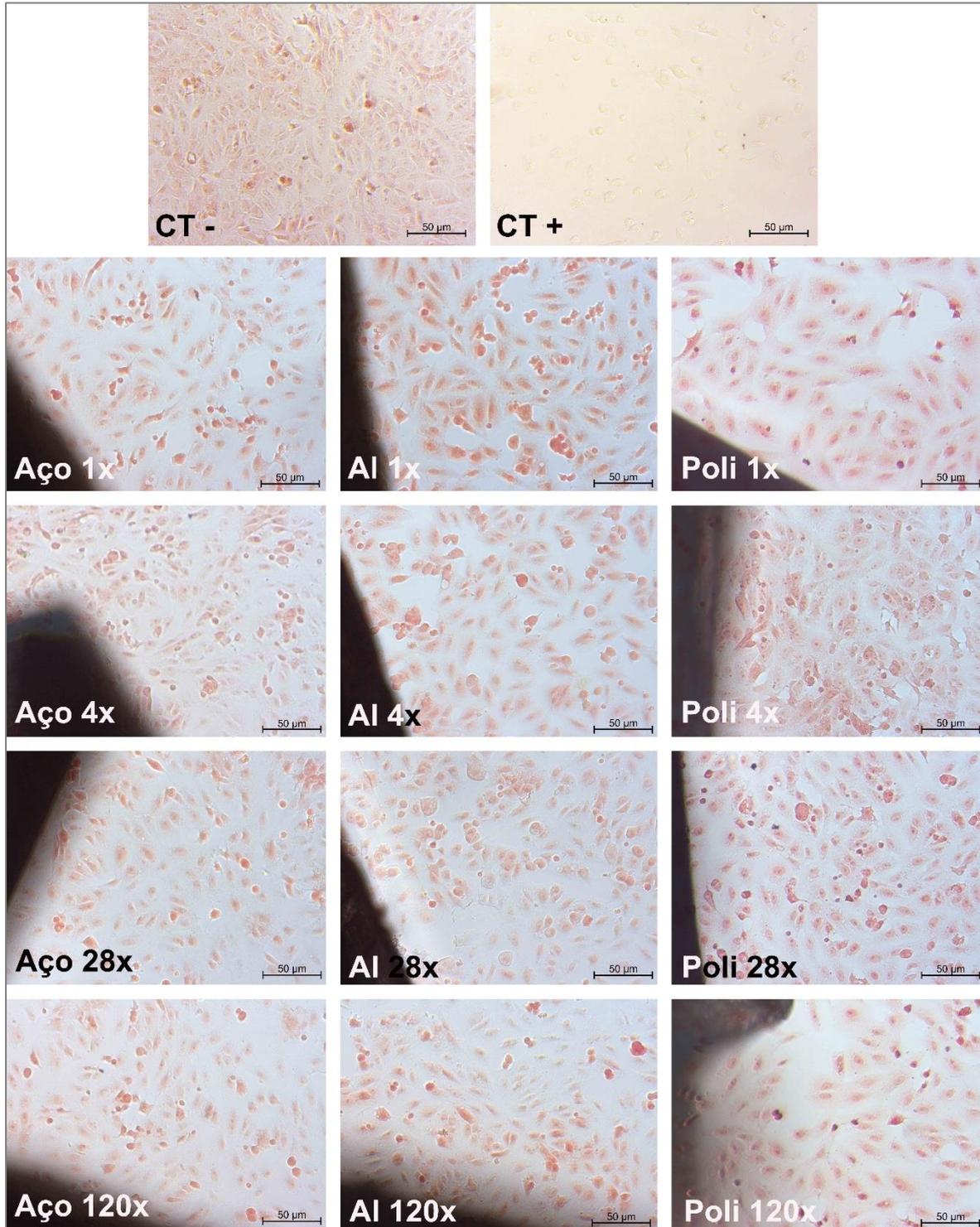
As amostras dos materiais submetidos aos tratamentos por calor seco ou por TFD com A.M. puro não apresentaram diferenças quando comparadas com o grupo controle negativo, ou seja, as células apresentaram proteínas coradas que confirmam a atividade celular presente no citoplasma.

Figura 47 – Análise citoquímica, com Xylidine Ponceau, das células que cresceram juntamente com as amostras dos materiais (Aço = aço inoxidável; Al = alumínio; Poli = polipropileno) submetidas ao tratamento com TFD com A.M. puro, sob diferentes repetições (1x, 4x, 28x e 120x), em comparação com os grupos controle negativo (CT-) e positivo (CT+). Magnificação original: 200x.



Fonte: elaboração da autora.

Figura 48 – Análise citoquímica, com Xylidine Ponceau, das células que cresceram juntamente com as amostras dos materiais (Aço = aço inoxidável; Al = alumínio; Poli = polipropileno) submetidas ao tratamento com vapor úmido, sob diferentes repetições (1x, 4x, 28x e 120x), em comparação com os grupos controle negativo (CT-) e positivo (CT+). Magnificação original: 200x.

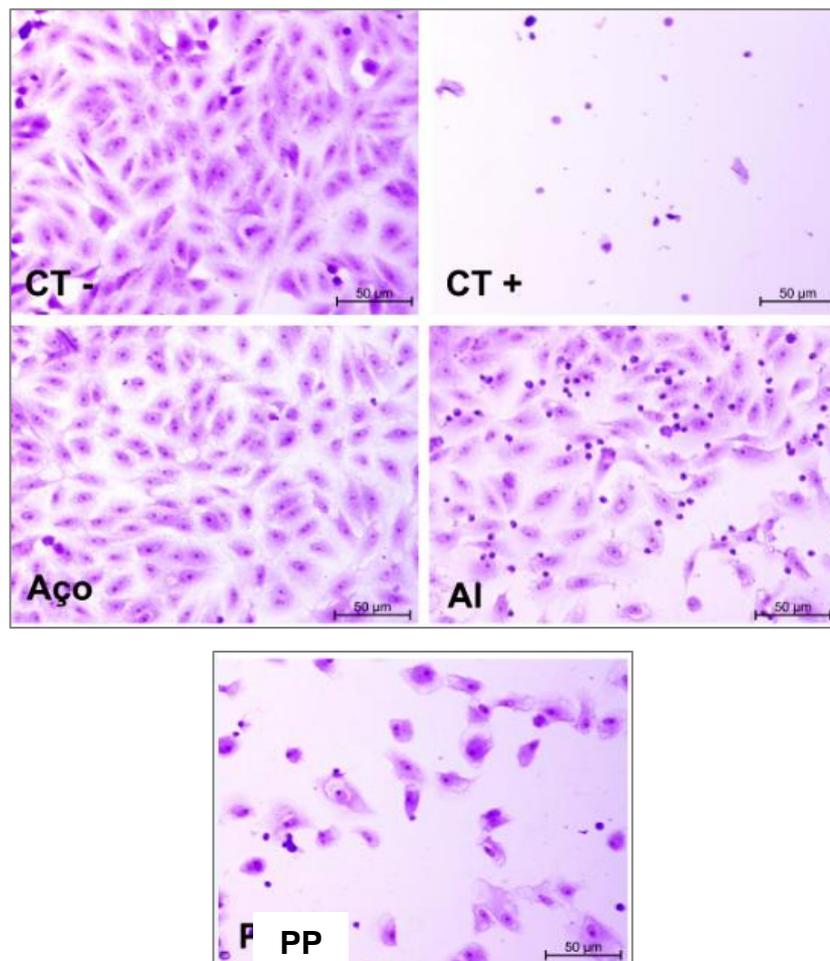


Fonte: elaboração da autora.

6.4.5 Análise morfológica dos materiais após tratamento com TFD com A.M. adicionado de ureia

A Figura 49 mostra o resultado do teste de citotoxicidade dos materiais submetidos à TFD com A.M. adicionado de uréia. É possível evidenciar que nenhum dos materiais apresentou citotoxicidade quando comparado com o grupo controle positivo.

Figura 49 – Análise morfológica, com cristal violeta, das células que cresceram juntamente com as amostras dos materiais (Aço = aço inoxidável; Al = alumínio; Poli = polipropileno) submetidas ao tratamento com TFD com adição de uréia por 10 minutos, com apenas uma repetição, em comparação com os grupos controle negativo (CT-) e positivo (CT+). Magnificação original: 200x.

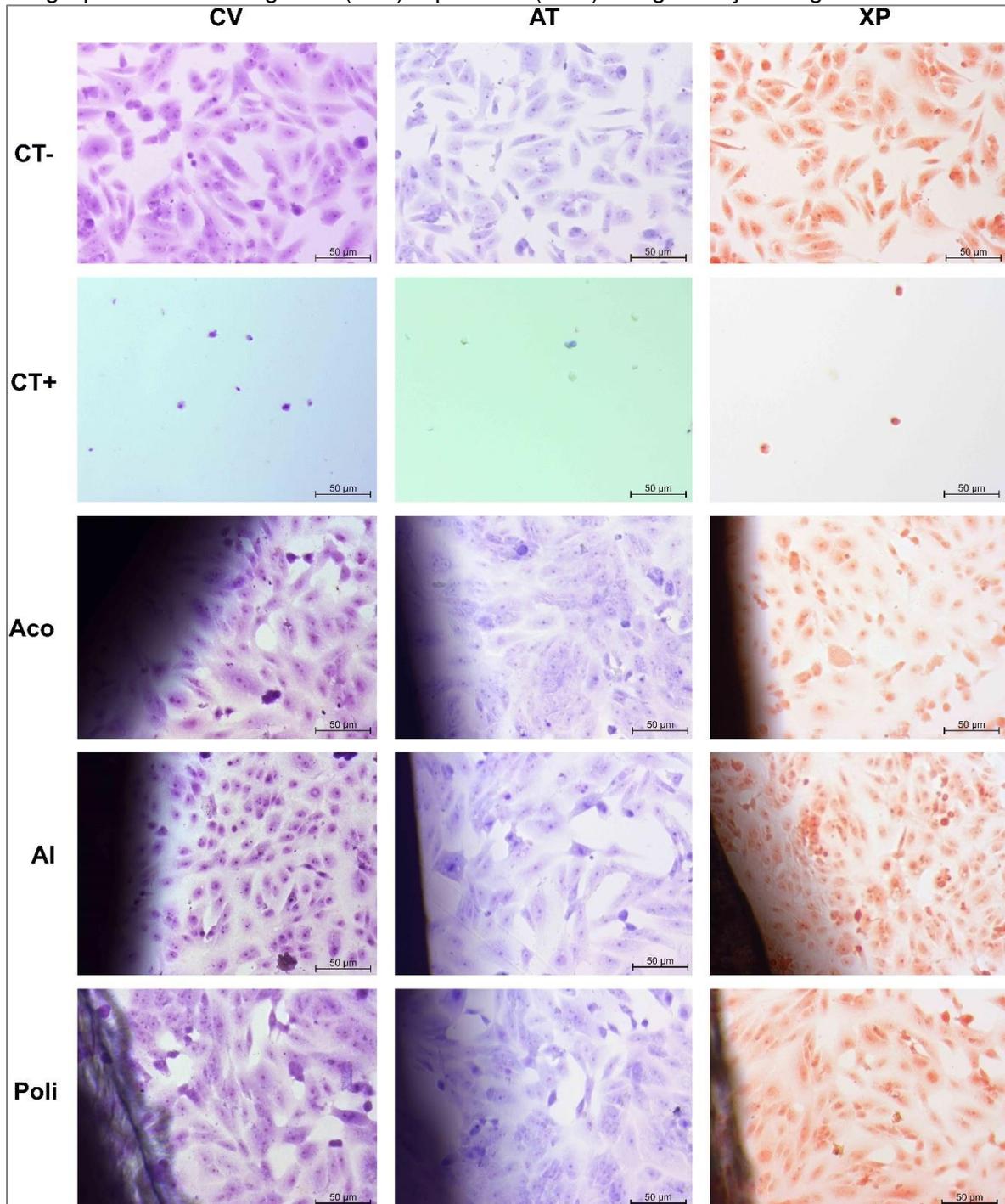


Fonte: elaboração da autora.

6.4.6 Análise citoquímica das amostras tratados com TFD com A.M. adicionado de ureia

A figura 50 mostra o resultado do teste de contato indireto das amostras que foram tratadas com a TFD com A.M. adicionado de ureia, utilizando o Cristal Violeta, Azul de Toluidina com pH 4,0 e o Xylidine Ponceau com pH 2,5. É possível notar que as amostras dos materiais não apresentaram citotoxicidade quando comparadas com o grupo controle positivo.

Figura 50 – Análise morfológica com cristal violeta (CV), análise citoquímica com azul de toluidina (AT) e análise citoquímica com Xylidine Ponceau (XP) das células que cresceram juntamente com as amostras dos materiais (Aço = aço inoxidável; Al = alumínio; Poli = polipropileno) submetidas ao tratamento com TFD com adição de uréia por 10 minutos, com apenas uma repetição, em comparação com os grupos controle negativo (CT-) e positivo (CT+). Magnificação original: 200x.

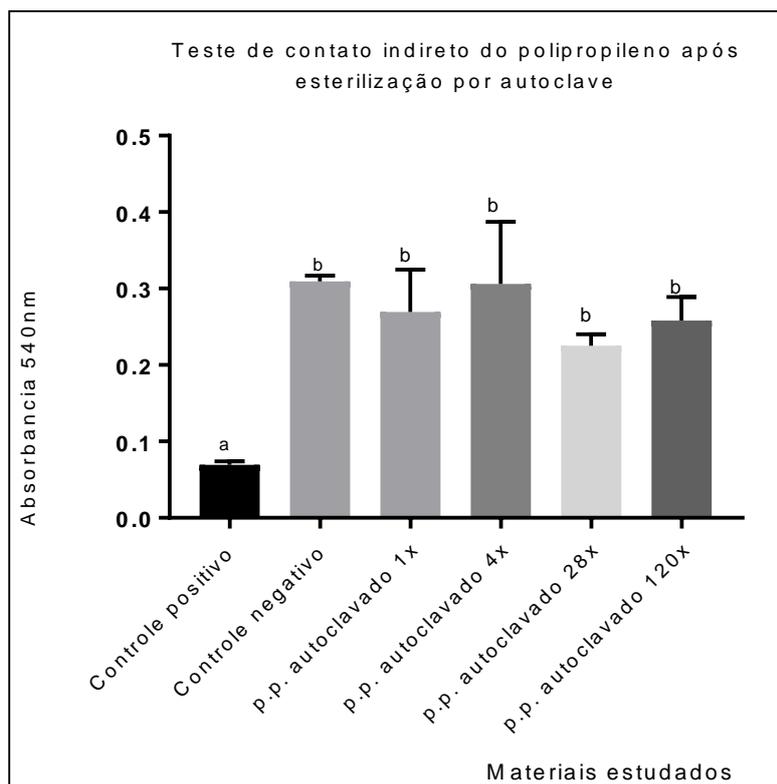


Fonte: elaboração da autora.

6.4.7 Teste de contato indireto

A figura 51 mostra o resultado do teste de contato indireto das amostras do polipropileno após tratamento com calor seco com diferentes repetições. É possível notar que todos os grupos experimentais apresentaram diferença estatisticamente significativa com relação ao grupo controle positivo ($p < 0,001$), o que indica que nenhuma amostra apresentou citotoxicidade.

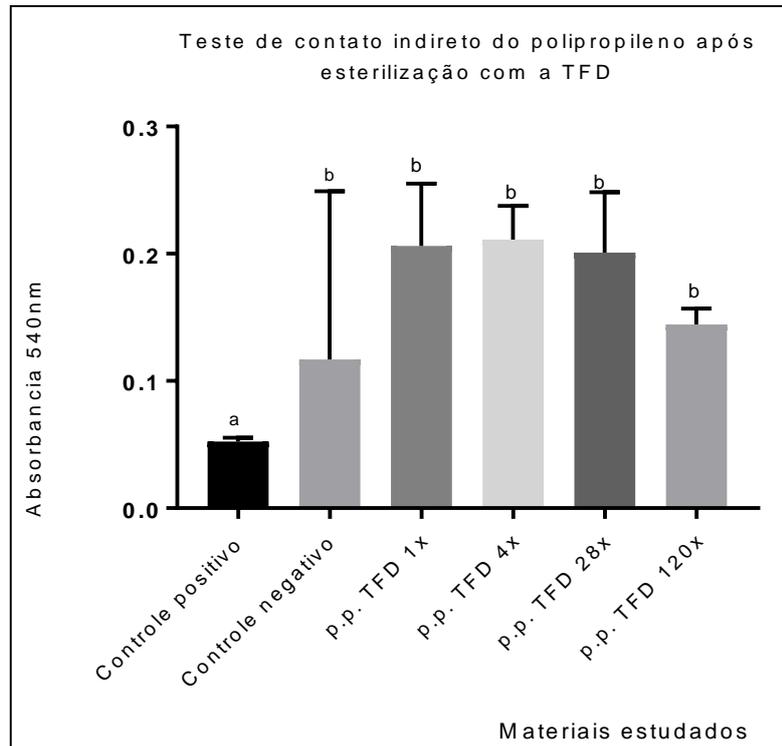
Figura 51 – Resultado do teste de contato indireto do polipropileno após tratamento por calor seco sob diferentes repetições (1x, 4x, 28x e 120x). As barras indicam desvio-padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significantes de acordo com o teste Anova e Tukey ($p < 0,05$).



Fonte: elaboração da autora.

A figura 52 mostra que todas as amostras de polipropileno que foram tratadas com a TFD com A.M. puro apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparada com a amostra do grupo controle positivo ($p < 0,001$); portanto, não apresentaram citotoxicidade.

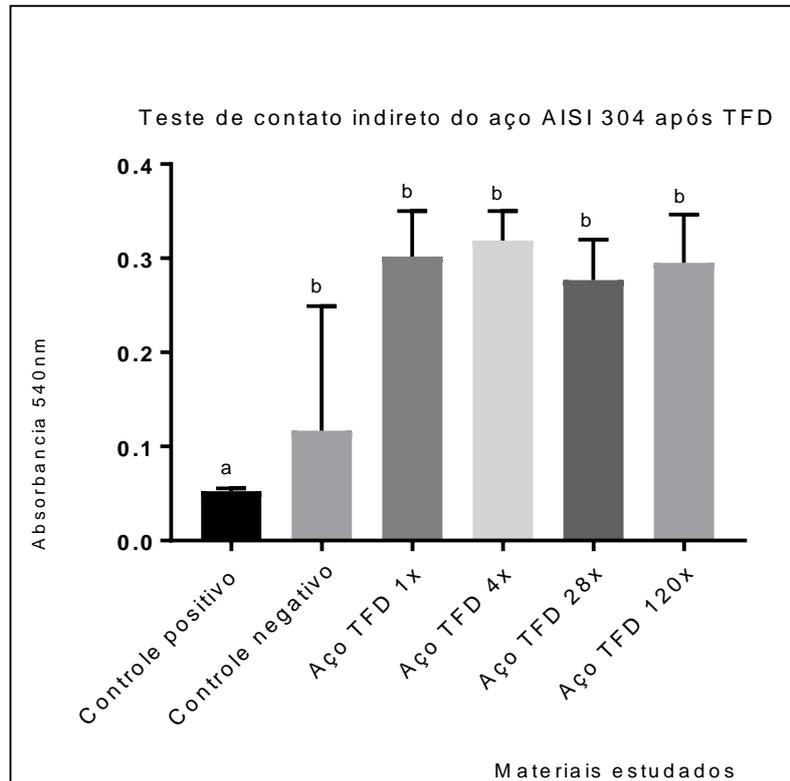
Figura 52 – Resultado do teste de contato indireto do polipropileno após tratamento com TFD com A.M. puro. As barras indicam desvio-padrão. Letras diferentes denotam diferenças estatisticamente significantes de acordo com o teste estatístico Anova e Tukey ($p < 0,05$)



Fonte: elaboração da autora.

A figura 53 demonstra que todos os grupos do aço AISI 304 após tratamento TFD com A.M. puro apresentaram diferenças significativas quando comparados com o grupo controle positivo (com $p < 0,05$), isto é, não apresentaram citotoxicidade.

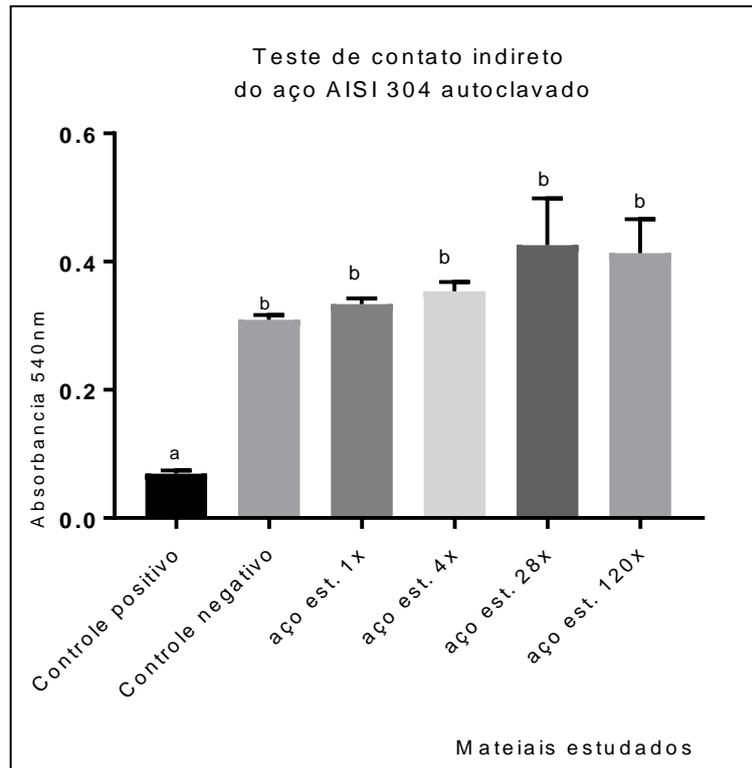
Figura 53 – Resultado do teste de contato indireto do aço AISI 304 após TFD com A.M. puro. As barras indicam desvio-padrão, letras diferentes denotam diferenças estatisticamente significantes entre as médias de acordo com o teste Anova e Tukey ($p < 0,05$).



Fonte: elaboração da autora.

A figura 54 mostra o resultado do teste de citotoxicidade por contato indireto do aço AISI 304 após tratamento por calor úmido. Nota-se que todos os grupos apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo controle positivo (Anova e Tukey, $p < 0,05$).

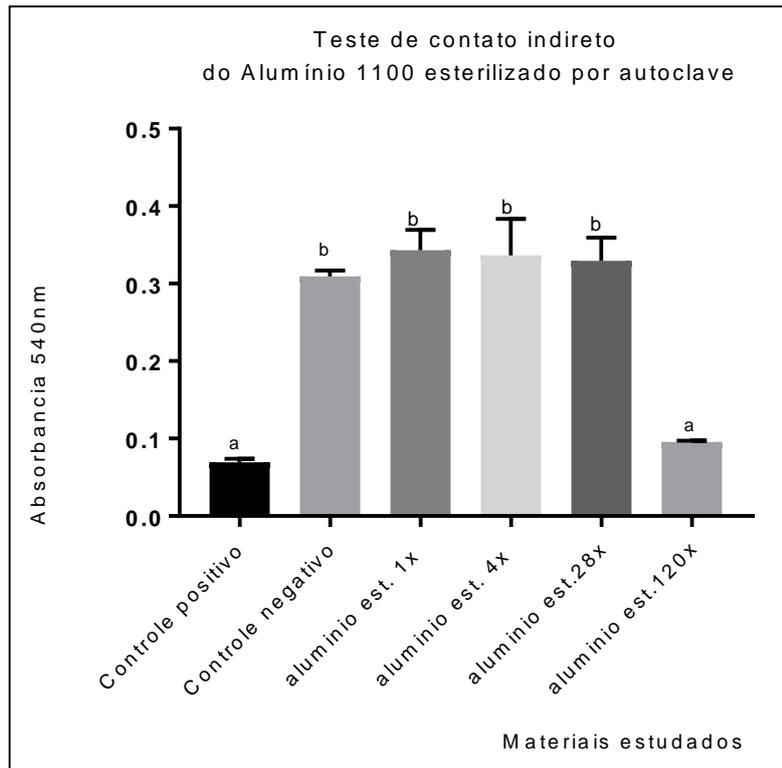
Figura 54 – Resultado do teste de contato indireto do aço AISI 304 após tratamento com calor úmido. As barras indicam desvio-padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significantes de acordo com o teste Anova e Tukey ($p < 0,05$).



Fonte: elaboração da autora.

De acordo com a figura 55, o alumínio 1100, após tratamento com calor úmido por 120 repetições, não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo controle positivo, ou seja, este grupo apresentou citotoxicidade (Anova e Tukey test, $p > 0,05$).

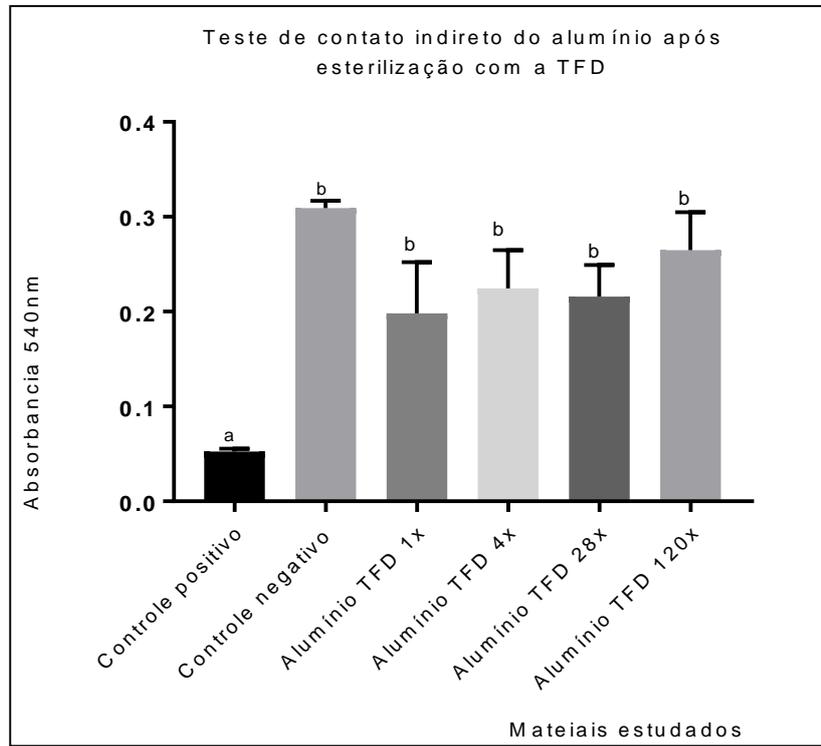
Figura 55 - Resultados do teste de contato indireto do alumínio 1100 após tratamento com calor úmido com diferentes repetições. As barras indicam desvio-padrão. Letras distintas denotam diferenças estatisticamente significantes entre as médias de acordo com o teste Anova e Tukey ($p > 0,05$).



Fonte: elaboração da autora.

A figura 56 mostra o resultado do teste de citotoxicidade indireta do alumínio 1100 após tratamento com TFD com A.M. puro com múltiplas repetições. Todas as amostras dos grupos experimentais apresentaram diferença significativa com relação ao grupo controle positivo (com $p < 0,001$), ou seja, não apresentaram citotoxicidade.

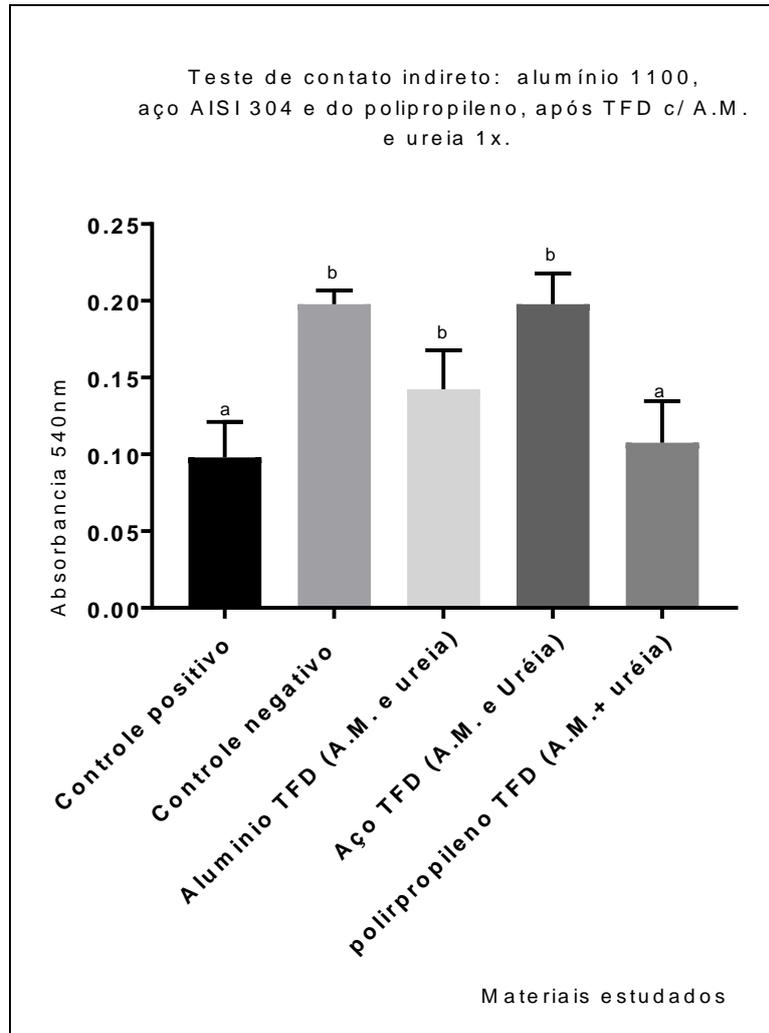
Figura 56 – Resultados do teste de citotoxicidade indireta do alumínio 1100 após tratamento com TFD com A.M. puro. As barras indicam desvio-padrão. Letras diferentes denotam diferenças estatisticamente significantes entre as médias de acordo com o teste Anova e Tukey ($p < 0,05$).



Fonte: elaboração da autora.

A figura 57 mostra o resultado do teste de citotoxicidade indireta das amostras dos três materiais submetidos ao tratamento com TFD com A.M. adicionado de ureia, com uma única repetição. Nota-se que as amostras do alumínio 1100 e o aço AISI 304 apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando comparadas com o grupo controle positivo, sendo que o alumínio 1100 apresentou $p < 0,05$ e o aço AISI 304 apresentou $p < 0,01$. As amostras do polipropileno não apresentaram diferenças estatisticamente significantes quando comparadas com o grupo controle positivo ($p > 0,05$), ou seja, apresentaram citotoxicidade.

Figura 57 – Resultados do teste de citotoxicidade indireta do alumínio 1100, do polipropileno e do aço Aisi 304, após tratamento com TFD com A.M. adicionado de uréia. As barras indicam desvio-padrão. Letras distintas denotam diferenças estatisticamente significantes entre as médias de acordo com o teste Anova e Tukey ($p > 0,05$).



Fonte: elaboração da autora.

7. DISCUSSÃO

Sabe-se que a esterilização por vapor úmido é um dos métodos mais empregados para materiais utilizados em âmbito hospitalar; porém, o risco de desgaste de certos tipos de materiais leva à busca por métodos de descontaminação alternativos que sejam eficazes e causem menores danos. O presente estudo considerou a terapia fotodinâmica como método alternativo para descontaminação de diferentes materiais para construção de uma bandeja de apoio para pacientes com fratura exposta.

Em relação à metodologia empregada, foi possível considerar que a monitoração da autoclave, realizada através do indicador químico e do teste biológico, para assegurar o teste de esterilização dos materiais, demonstrou a efetividade do processo, através da mudança da cor da fita de rosa para marrom. Ainda, no presente estudo, foi empregada a bactéria *S. aureus* para o teste microbiológico pois esta bactéria se encontra comumente presente em inúmeras infecções nos pacientes em ambiente hospitalar, tais como infecção em ferida cirúrgica, infecção óssea (osteomielite), infecção em cateter central, formações do biofilme em implante de materiais ortopédicos e instrumentais cirúrgicos (RIBEIRO, MONTEIRO, FERRAZ; 2012). As imagens do biofilme com o *S. aureus* cultivado sobre as amostras dos três materiais avaliados, observadas por microscopia eletrônica de varredura, demonstraram adesão, espalhamento e formação da estrutura tridimensional, características do biofilme típico com esta bactéria de acordo com a literatura (BECKER, 2017).

A adesão celular do biofilme sobre a superfície do aço AISI 304 e do alumínio 1100 foi possibilitada através de um tratamento de superfície prévio, o que aumentou a adesão do biofilme em 92% para o alumínio e 117% para o aço. De acordo com o estudo de WU *et al.* (2018), que relataram a dificuldade da adesão celular em superfícies lisas, demonstrou-se que a superfície com este tipo de tratamento facilita a formação de microcolônias da bactéria *Staphylococcus aureus*. Neste mesmo estudo, os autores utilizaram o tratamento superficial com tempo de 20 segundos na superfície do aço e obtiveram um aumento de $3,1 \times 10^2$ CFU/mL para $9,3 \times 10^3$ CFU/mL. Desta maneira, os resultados observados no presente estudo concordam com o trabalho supramencionado.

O tipo de superfície do material e o tipo de bactéria influenciam na adesão de microrganismos (ARAUO *et al.*, 2010). A superfície hidrofóbica facilita a adesão dos mesmos (DOMINICIANO, 2015; LOPES, 2016; FRIEDRICZEWSKI, *et al.*, 2018). Há controvérsias sobre a adesão celular em superfícies rugosas (MALMONGE, *et al.* 1999; ROSA, 2018), enquanto ARAUJO *et al.*, 2016 e ANDREOTTI, 2017 relatam que há facilidade de adesão celular em superfície rugosa. É importante salientar que materiais que apresentam a superfície com dificuldade de adesão bacteriana são excelentes para fabricar dispositivos de uso hospitalar, pois contribuem indiretamente para a redução de transmissão de infecção durante o uso (LOPES, 2016).

O método de esterilização mais utilizado em ambiente hospitalar para materiais termorresistentes é a esterilização por vapor úmido (com autoclaves); porém a exposição do material ao calor pode produzir alteração no comportamento mecânico dependendo do material e do número de exposições. Desta maneira, é importante certificar-se sobre a resistência do material quando exposto ao calor da autoclave para fabricar materiais de uso hospitalar.

Estudos prévios demonstram a eficiência da TFD para tratamento de infecções (BIEL, *et al.*, 2011). Podemos ter como exemplo o estudo de ROSA *et al.*, (2015), o qual utilizaram a TFD (660nm, potência 40mW, fluência 257J/cm² por 180 segundos) com azul de metileno sobre o biofilme com *S. aureus* cultivado sobre amostras de ossos da tíbia de bovinos e obtiveram 3,06log₁₀ de redução bacteriana.

A bactéria *S. aureus* caracteriza-se por apresentar resistência à ação de antibióticos (DOMICIANO, 2015; BECKER, 2017). Em relação à TFD, a ação da molécula do fotossensibilizador, durante a aplicação da TFD, é dificultada devido à presença da dupla camada lipídica na membrana de algumas bactérias (DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004; HORI, 2013). No presente estudo, os resultados foram promissores, pois a aplicação da TFD com o azul de metileno, sobre o biofilme com *S. aureus* com tempo de irradiação de 5 minutos reduziu 1,88 log₁₀ UFC/mL do alumínio 1100, 2,04 log₁₀ UFC/mL do aço AISI 304 e 2,68 log₁₀ UFC/mL do polipropileno. Já a aplicação da TFD com A.M. com irradiação por 10 minutos apresentou redução de 2,42 log₁₀ UFC/mL para o alumínio 1100, 3,04

\log_{10} UFC/mL para o aço AISI 304 e 3,41 \log_{10} UFC/mL para o polipropileno, ou seja, melhores resultados foram obtidos quando maiores energias foram entregues, o que sugere que houve maior formação de espécies reativas de oxigênio que resultou em maior morte celular.

Contudo, considerando a necessidade de se obter uma descontaminação mais eficiente, sugeriu-se a adição de ureia, tendo em vista que a literatura (NUNEZ *et al.* 2015) reporta um aumento do efeito da TFD, pois a ureia reduz a agregação, melhora a solubilidade do corante e aumenta absorvância da luz. Neste mesmo estudo (NUNEZ *et al.* 2015), a TFD com azul de metileno 30 μ M e 2M de uréia, com tempo de irradiação de 6 minutos, propiciou a redução de 100% da suspensão com *Candida Albicans*.

No presente estudo, a redução total do biofilme com *S. aureus* cultivado sobre as amostras dos materiais foi alcançada através do uso da TFD com A.M. e ureia 2 M. O tempo de 5 minutos resultou na redução total para as amostras do alumínio 1100. Neste mesmo tempo, as amostras do aço AISI 304 apresentaram redução de 6,04 \log_{10} UFC/mL e as amostras do polipropileno apresentaram redução de 5,52 \log_{10} UFC/mL. Aumentando o tempo de irradiação para 10 minutos, ocorreu redução total em todas as amostras dos três materiais, o que comprovou a eficiência da ureia em potencializar o efeito da TFD. Como esperado, o resultado do teste de esterilização com vapor úmido (autoclave) realizado com as amostras dos materiais contendo o biofilme com *S. aureus* também apresentou a redução total em todas as amostras.

De acordo com a *American National Standard Institute* (ANSI 2011), o nível de esterilização considerado seguro para materiais de uso hospitalar classificados como críticos é de 10^{-6} , valor que equivale à sobrevivência de 1 em 1.000.000 de microrganismos. Comparando o efeito da esterilização com vapor úmido e o efeito da TFD com A.M. e ureia, sobre as amostras dos materiais contendo o biofilme com *S. aureus*, a TFD demonstrou redução total utilizando o tempo de 10 minutos, enquanto a esterilização por vapor úmido demorou 30 minutos a 121 °C. Ambas as técnicas atingiram o recomendado pela ANSI; porém, para validação como agente esterilizante, para uso em equipamentos médicos, há a necessidade de se

comprovar a eficiência sobre outros tipos de microrganismos como vírus, fungos e protozoários.

De acordo com a RDC n.35 de agosto de 2010 da Vigilância Sanitária, para a desinfecção de nível intermediário, é necessária a destruição de todos os microrganismos, com exceção do alto número de esporos bacterianos. A redução total do biofilme após a TFD com A.M. e ureia pode ser considerada desinfecção de nível intermediário. Pode ser indicada, de acordo com as descrições de RUTALA; WEBER, 2013 e do guia de desinfecção do *Center Disease Control* (CDC, 2009), para o uso em materiais não críticos; ou seja, que entram em contato com a pele íntegra. Para tanto, a TFD com A.M. e ureia não poderá ser empregada para a bandeja de apoio ao membro, por este ser classificado como material crítico.

Para comparar a ação da TFD com A.M. e ureia à ação do desinfetante de alto nível, indicado para materiais críticos, haveria a necessidade de se realizar testes com esporos bacterianos, sendo a morte destes a característica que difere o desinfetante de nível intermediário do desinfetante de nível elevado (BRASIL, 2010). Vale ressaltar que os desinfetantes de grande uso geral apresentam algumas desvantagens. O desinfetante Glutaraldeído apresenta toxicidade durante a manipulação, produzindo a corrosão nos materiais metálicos. O álcool pode ocasionar endurecimento, dilatação nos materiais de borracha e danificar instrumentos óticos (SOBECC, 2017; PSALTIKDS, 2014).

A análise morfológica dos materiais com cultivo de biofilme, após passar por TFD com A.M. durante 10 minutos, evidenciou interrupção e ruptura da estrutura do biofilme. As amostras que foram desinfetadas com a TFD com A.M. e uréia e as amostras que foram esterilizadas por calor úmido mostraram redução total, corroborando os resultados microbiológicos.

Os testes de citotoxicidade avaliaram a segurança do método de esterilização e desinfecção. Para tal, foram utilizadas as células Vero por sua similaridade com tecido conjuntivo humano. Embora os resultados do teste de contato direto não resultaram em citotoxicidade para nenhum dos materiais ou tratamentos propostos, o teste por contato indireto do polipropileno tratado com a TFD com A.M. acrescido de ureia relatou efeito citotóxico. Este efeito pode ser resultante do aumento das espécies reativas de oxigênio que se formaram durante

a aplicação da TFD com A.M. e ureia (NUNEZ *et al.* 2015), que podem ter promovido a degradação do material e os subprodutos desta degradação podem ser tóxicos para as células Vero.

As espécies reativas de oxigênio, formadas a partir da TFD, contribuem para a degradação do polipropileno, que se caracteriza pelo rompimento da cadeia polimérica principal ou lateral (PAOLI, 2008). Em estudo de TALLEY *et al.*, 2017, foi observado que a degradação de telas de polipropileno utilizadas em cirurgias ginecológicas produziu inflamação; a degradação da tela de polipropileno foi confirmada com a observação do explante no microscópio ótico. Neste mesmo estudo, os autores conferiram a degradação do PP através da produção do processo oxidativo *in vitro*; para tal, utilizaram amostras de PP incubadas em meio contendo 0,1M de Fosgênio COCl_2 com 20% de Peroxido de Hidrogênio H_2O_2 , por 3 semanas, confirmado através do FTIR, com a presença da formação dos grupos de carbonila (C=O) e radical hidroxil (OH-) (TALLEY *et al.*, 2017).

O alumínio, após esterilização por autoclave com 120 repetições apresentou, apresentou citotoxicidade no teste de contato indireto. GARCIA, em 2014, descreveu conter 0,13% de resíduos de alumínio no arroz após cozinhar na panela de alumínio por 30 minutos. A autora descreve que o resíduo do alumínio no alimento aumenta com o tempo de exposição. A exposição crônica ao alumínio pode levar à doença de Alzheimer e à doença renal (RISVI, *et al.*, 2015). Um estudo realizado com nanopartículas de alumínio, após entrar em contato com as células de fibroblastos e macrófagos, demonstrou que elas apresentaram efeito citotóxico, ocasionando danos no núcleo da célula (HASHIMOTO; SASAKI; IMAZATO, 2015). O mesmo efeito ocorreu após o contato do alumínio com as células epiteliais do intestino (DJOUINA, *et al.*, 2016).

O calor pode produzir alteração do comportamento mecânico dos materiais (CALLISTER, 2014). O resultado do teste de microdureza Shore D do PP dado como recebido foi de 59D, valor condizente ao valor da Matweb. De acordo com os testes realizados, observou-se que o PP apresentou redução da microdureza Shore D para as amostras esterilizadas por autoclave com 28 e 120 repetições, com os valores médios de microdureza de 58D e 45D, respectivamente. Contudo, as amostras do PP esterilizadas por TFD, após 28 e 120 repetições apresentaram alteração da microdureza para 58D e 48D, respectivamente. Comparando-se o

comportamento do PP frente às duas formas de tratamento, a esterilização por vapor úmido demonstrou maior redução da microdureza em comparação com as amostras esterilizadas por TFD com A.M. puro. Este fato sugere que o calor da autoclave promove maior alteração na microestrutura deste material do que as espécies reativas de oxigênio geradas pela TFD. O comportamento mecânico do polímero se altera devido a fatores como o aumento da temperatura e o processo fotoquímico. Isto leva ao rompimento de uma ligação química covalente, que pode ser da cadeia principal ou na cadeia lateral; este rompimento gera espécies reativas que poderão propagar o processo de degradação (SUTHERLAND, *et al.* 1996; ENKO, *et al.*, 2013; WU, *et al.*, 2018).

O teste de microdureza do alumínio apresentou redução para as amostras submetidas ao calor úmido após 4, 28 e 120 repetições, com valores de 61HV, 48HV e 40HV respectivamente, enquanto para as amostras tratadas por TFD não apresentaram redução estaticamente significativa em comparação com o grupo controle negativo (sem tratamento). A redução da propriedade mecânica das amostras tratadas com calor úmido pode ser devido à exposição do material ao calor da autoclave (121 °C por 30 minutos) por diversas vezes, o que produziu o recozimento do material com consequente redução da microdureza, possivelmente associada a aniquilação de discordância. TONIATO *et al.*, 2016 descreveram sobre o amolecimento do alumínio na região afetada pelo calor com redução da dureza Vickers de 100,3 HV para 50,7 HV (FERRARI, 2008; SMITH; HASHEMI, 2012).

De acordo com os resultados do teste de microdureza Vickers, o valor do aço AISI 304 dado como recebido foi de 184 HV; tal valor encontra-se um pouco acima do valor descrito pela Armco (180 HV, recozido). As amostras do aço AISI 304 que passaram por tratamento com calor úmido por 120 repetições apresentaram redução da microdureza estatisticamente significativa quando comparada com o grupo controle (de 184 HV para 179 HV), próximo do valor do aço recozido da Armco. Contudo, as amostras do aço AISI 304 esterilizadas por TFD não apresentaram redução estatisticamente significativa quando comparadas com o grupo controle. A exposição do aço AISI 304 ao calor da autoclave por 120 vezes ocasionou a redução da microdureza, embora esta redução pode não ser significativa a ponto de alterar a durabilidade do material. A literatura mostra que

a temperatura influencia no tamanho dos grãos do aço AISI 304 e este, por sua vez, está relacionado com a resistência mecânica (MUHAMMAD, *et.al*, 2014 e MOGHANIZADEH; FARZI, 2018). O aumento dos grãos reduz a microdureza (FERRARI, 2008).

De acordo com os resultados apresentados, o alumínio apresentou citotoxicidade no teste de contato indireto após a esterilização por 120 repetições; além disso, apresentou redução do valor da microdureza para ambos os tratamentos (vapor úmido e TFD); desta maneira, este material não poderá ser recomendado para a fabricação da bandeja de apoio ao membro. O aço AISI 304 não apresentou citotoxicidade no teste de contato direto e indireto, mas apresentou redução do valor da microdureza Vickers após a esterilização por calor seco. Portanto, a bandeja de apoio ao membro poderá ser fabricada com aço AISI 304 e poderá ser desinfetado pela TFD com AM. Acrescido de ureia. O PP apresentou citotoxicidade nas amostras por contato indireto quando tratado por TFD com A.M. acrescido de uréia, assim como apresentou redução da microdureza após tratamento com calor úmido e por TFD. Desta forma, este material não seria recomendado para a fabricação da bandeja de apoio ao membro.

A esterilização realizada pelo calor úmido promove o desgaste de materiais, o calor da autoclave promove alteração do comportamento mecânico de alguns materiais. A TFD, embora menos destrutiva para os materiais, tem limitações principalmente em relação às regiões atingidas pela luz, necessitando de cuidado para o uso. Este processo pode ser utilizado em ambiente hospitalar e ambulatorial, devido ao baixo custo e a portabilidade, é indicada para materiais termosensíveis e termorresistentes, além de não ser tóxica para o manuseio. O uso deste processo poderá contribuir para a redução de gastos e indiretamente no impacto do custo da assistência à saúde. Há a possibilidade de estudos da ação da TFD com A.M. e ureia sobre outros agentes etiológicos assim como a fabricação de um aparelho com feixe de luz maior para possibilitar testes que envolvem materiais com dimensão maior.

8. CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia proposta e os resultados obtidos, é possível concluir que:

1 - A TFD com azul de metileno é uma técnica promissora para desinfecção de materiais empregados para uso hospitalar, sendo potencializada com a adição de uréia 2 M ao fotossensibilizador, com melhores efeitos quando efetuada com tempo de irradiação de 10 minutos;

2 - O calor úmido, embora bastante eficaz para a esterilização dos materiais propostos, gera alterações significativas na microdureza dos materiais após 120 repetições, podendo comprometer a vida útil deles;

3 – A citotoxicidade do alumínio foi confirmada após tratamento com calor úmido por 120 repetições, assim como o polipropileno se apresentou citotóxico após a TFD com A.M. e ureia;

4 - Dos materiais avaliados, o aço AISI 304 parece ser o mais apropriado para confecção da bandeja de apoio aos membros a ser utilizada em âmbito hospitalar, independentemente do método de desinfecção ou esterilização adotado.

8. REFERENCIAS

ABAL. Associação Brasileira do Alumínio. **Fundamentos e aplicações do alumínio**. 2007. Disponível em: <<http://www.abal.org.br/site/pdf/fundamentos-do-aluminio/001.pdf/>>. Acesso em: 15 agosto 2016.

ABIPLAST. Associação Brasileira da Indústria do Plástico. **Perfil 2018**. p. 16. Disponível em: http://www.abiplast.org.br/wp-content/uploads/2019/10/perfil2018-web_VC.pdf. Acesso em: 02/11/2019.

ABRAHAMSE, Heidi. HAMBLIN, Michael R. **New photosensitizers for photodynamic therapy**. Biochem J. London. v.473, n.4. p. 347-364. 2016.

ALMEIDA, Lisiane Marcolin. SILVA, Helena Terezinha Hubert. **Equipamento médico-hospitalar: uma gestão na área da saúde**. Interdisciplinary Journal of Health Education. v.1. p.34-39. 2016.

ALMEIDA, Monica Santos. **Análise comparative da microestrutura e da Dureza do aço ASTM A182 F22**. 2018. 48p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação de Engenharia Mecânica). Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa.2018.

AMERICAN NATIONAL STANDARD. **Sterilization of health care products**. 14160:2011. Estados Unidos, 2011. p.33.

ARMCO. **Aços inoxidáveis especificações técnicas**. n.1. Disponível em: <http://www.armco.com.br/wp/wpcontent/uploads/2011/09/AcosInoxidaveis_especificacoestecnicas.pdf>. Acesso em: 20 de agosto de 2019.

ALVIM, André Luiz Silva. SANTOS, Fernanda Carolina Ribeiro. **Medidas de precaução de contato para prevenção e controle de infecções: relato de experiencia**. Revista de Enfermagem. v.7.p. 1-6. 2017.

ALUMIPLAST Comercio de Metais. **Propriedade mecânica do alumínio**. Disponível em: http://www.alumiplast.com.br/documentos/propriedades_mecanicas.pdf . Acesso em: 10 outubro 2018.

ANDREOTTI, Agda Marobo. **Influência da rugosidade de superfície e ação de diferentes desinfetantes na formação do biofilme em resina acrílica para prótese ocular e sua biocompatibilidade em contato com células da**

conjuntiva humana. 2017. 146p. Doutorado. (Doutorado em Odontologia). Universidade Estadual Paulista. Araçatuba. São Paulo. 2017.

ARAUJO, Emiliane Andreoli. **Aspectos coloidais de adesão de microrganismos.** Quimica Nova. v.33, n.9. p.1940-1949. 2010.

ASM HANDBOOK. ***Metallography and Microstructures.*** v.9.Editorial Assistance. 2004. 711p.

ASM 06813G: 2015. ***Properties of aluminum alloys: tensile. Creep and fatigue data at high and low temperatures.*** 2015. p.1-10.

ASTM D2240-15. ***Standard Test Method for Rubber Property- Durometer Hardness.*** 2017.p.1-13.

ASTM E92: 2017. ***Standard Test Method for Vickers Hardness and Knoop Hardness of Metallic Materials.*** 2017. p.1-27.

AYDINURAZ, Kuzey. *et al.* ***In vitro S. epidermidis and S. aureus adherence to composite and lightweight polypropylene grafts.*** Journal of Surgical Research. Turkey.v.157. p.79-86. 2009.

AZEVEDO, *et al.* **Ensaio mecânico de tensão-deformação sob tração: um estudo integrado com a disciplina de cálculo.** Persp. Online:Exatas & Eng. v.15, n.06. p. 29-35. 2016.

BAGNATO, Vanderlei S. INADA, Natalia M., Fontana, Carla Raquel. **Biofotônica e os benefícios para a saúde.** in: BAGNATO, Vanderlei S. **Novas técnicas ópticas para as áreas da saúde.** São Paulo: Livraria da Física, 2008.p.11-21.

BARBOSA, Adriana Sierra Assencio Almeida. **Eficácia do álcool etílico e quaternário de amônio na desinfecção de equipamentos médicos hospitalares.** Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção. n.8, v.4. p. 409-414. 2018.

BARBOSA, Luciane Seixas. SARTORI, Mara Rubia Keller. **Métodos de esterilização de artigos hospitalares efetivos contra micobactérias não tuberculosas de crescimento rápido.** Curitiba. Caderno da Escola de Saúde. v.1, n.5. p.136-153. 2017.

BATALIOTTI, Murilo Dobri. **Avaliação da degradação do polipropileno sob múltiplas extrusões com e sem antioxidante**. 2016. 43p. TCC (Engenharia de Materiais). Londrina. 2016.

BECKER, Ana Paula. **Investigação da formação de biofilme e sua associação com características clínicas e sistemas de bombas de efluxo em *Staphylococcus aureus***. 2017. 101p. Tese – (Doutorado em Ciência Farmacêutica) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.2017.

BIEL, Merril A. *et al.* **Antimicrobial photodynamic therapy treatment of chronic recurrent sinusitis biofilm**. Int. Forum Allergy Rhinol. Mineapolis, v.1, n.5. p.329-334. 2011.

BORINI, Júlio Cesar. **Protocolo de verificação do processo de esterilização por vapor de formaldeído**. 2016. 83p. Dissertação – (Mestrado em Engenharia Biomédica)- Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Paraná, Curitiba.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº15, de 15 de Março de 2012. **Dispõe sobre requisitos de boas práticas para o processamento de produtos para a saúde e dá outras providências**. Ministério da saúde. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0015_15_03_2012.html. Acesso em: 22 outubro de 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 306, de 07 de dezembro de 2004. **Dispõe sobre Regulamento Técnico para o Gerenciamento de resíduos de serviços de saúde**. Ministério da saúde. Disponível em: <<http://www.portalanvisa.gov.br>>. Acesso em: 03 outubro 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº35, de 16 de Agosto de 2010. **Dispõe sobre o Regulamento técnico para produtos com ação antimicrobiana utilizados em produtos críticos e semicríticos**. Ministério da saúde. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0035_16_08_2010.html. Acesso em: 26 outubro 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Sítio Cirúrgico – Critérios Nacionais de Infecções relacionadas à assistência à Saúde**. Mar. 2009.

Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/criterios_nacionais-isc.pag>. Acesso em: 24 janeiro 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Staphylococcus aureus**. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo4/intr_sta.htm. Acesso em: 22/11/2019.

BRASIL. Centro de Vigilância Epidemiológica. **Infecções Relacionadas a Serviços de Saúde.2012** Disponível em: <http://www.cvesaude.sp.gov.br/htm/ih/pdf/iras12_pub_geral.pdf>. Acesso em: 24 janeiro 2016.

BRASIL. Centro de Vigilância Epidemiológica. **Autoclave HB CISA.2001** Disponível em: <<http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/REL/REL%5B23433-1-2%5D.PDF>>. Acesso em: 04 abril 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Estabelecer os limites de tolerância da concentração do gás oxido de etileno em ambiente de trabalho**. Portaria n. 482 de 16 de Abril de 1999. DOU, seção I, p. 15, Brasília, 19 de abril de 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria interministerial nº.482 de 16 de Abril de 1999. Disponível em:<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/1999/pri0482_16_04_1999.html>. acesso em: 26 outubro 2018.

BRITO Maria de Fatima Paiva *et al.* **Validação do processo de esterilização de artigos médico-hospitalares segundo diferentes embalagens**. Rev. Bras.de Enferm. v.55, n.4. p.414-419, jul. /ago. 2002.

BRITTO, Tales Rogério de Magalhães. **Manual de instruções da lavadora desinfectora Belimed modelos WD 230, WD 250 e WD 290**. Disponível em: <[http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/REL/REL\[30704-1-2\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/REL/REL[30704-1-2].PDF)>. página visitada em 07/11/2019.

CAETANO, Mário J.L. **Tensão de rotura e alongamento na rotura**. Disponível em:<http://ctborracha.com/?page_id=1588>. Página visitada em: 21 agosto 2017.

CALLISTER, Willian D. Jr. **Ciência e engenharia de materiais uma introdução**. 8ª.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2014. 844p.

CARDOSO, José Guilherme da Rocha. **A indústria do alumínio: estrutura e tendências**. BNDES Setorial. v.33. p.43-88. 2011.

CAMARGO, Antônio B. Marangone. MAIA, Paulo Borlina. **O perfil das mortes por acidente de transporte no Estado de São Paulo**. 1ª. análise. SEADE: n.3, p.1-19. mai. 2017.

CANEVAROLO JR. Sebastião V. **Ciência dos polímeros**. 2ª.ed. Artliber Editora Ltda. 2006. p.149-152.

CARRETERO, Salvador Gomes. NYBOM, Rolf Dahlfors. AGNETA, Richter. ***Electroenhanced Antimicrobial Coating Based on Conjugated Polymers with Covalently Coupled Silver Nanoparticles Prevents Staphylococcus aureus Biofilm Formation***. Adv. Healthcare Mater.1700435. 2017. p.2-10.

CARVALHO, Andressa Caroline da Silva. *et al.* In: **Investigação da qualidade do furo gerado na furação de chapa de aço inoxidável Aisi 304**. In: Congresso Brasileiro de Engenharia de Fabricação. 9º., Santa Catarina. Brasil. 2017.p.1-9.

CARVALHO, Carlos Henrique Ribeiro. **Desafios de mobilidade urbana no Brasil**. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada – IPEA. Rio de Janeiro.1-30p. 2016.

CARVALHO, K.C.S. **Estudo comparativo da relação custo-benefício do serviço de esterilização: serviço hospitalar versus empresa terceirizada**. 2009. 77p. Monografia (Hotelaria Hospitalar do Centro de Excelência) - Universidade de Brasília. Brasília. 2009.

CARVALHO, Lídia Barbosa. **Produção de polipropileno bi orientado (BOPP) Tecnologia e aplicações**. 2008. 44f. Dissertação. (Mestrado em Engenharia Química). Instituição Politécnico de Bragança. Bragança.2008.

CARVALHO, José Luiz Moreira; TOLEDO, José Carlos. **Polipropileno: um mercado em constante evolução**. In: Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, XIV, São Pedro, 2000.

CARVALHO, Wladimir Cordeiro. **Osteomielite por bacilos gram-negativos: estudo comparativo das características clínico-microbiológicas e fatores de risco com as infecções por *Staphylococcus aureus***. 2013. 72f. Tese. (Doutorado em Ortopedia). Faculdade de Medicina USP. São Paulo.2013.

CDC. *Centers for disease control and prevention. **Guideline for Prevention***.

Atlanta, Ga.1999. Disponível em:<<http://www.cdc.gov/hai/ssi/ssi.html>>.Acesso em: 04 Abril 2018.

CDC. Centers for disease control and prevention. **Guideline for disinfection and sterilization in health care facilities**. Atlanta: 2009. Disponível em:<http://www.cdc.gov/hicpac/desinfection_sterilization/13_Osterilization.html>.Acesso em: 30 outubro 2014.

CDC. Centers for disease control and prevention. **Surgical site infection**, Atlanta, 2012. Disponível em:<<http://www.cdc.gov/HAI/ssi/ssi/htm#rphp>>. Acesso em: 21 novembro 2017.

COELHO, Bruno Nazário. **Automatic Vickers Microhardness measurement based on image analysis. Internacional Conference on Image Processing computer vision and pattern recognition**. Las Vegas, p. 249-255. 2015.

COUTO, Marcelo. **Diversidade nas técnicas de esterilização**. Rev. SBCC. São Paulo, v.53. São Paulo, p.10-17.2011.

DEMIDOVA, T.N. HAMBLIN, M.R. **Photodynamic therapy targeted to pathogens. Journal of immunopathology and pharmacology**. v.17, n.3. p.245-254. 2004.

DIAS, Alexandre de Oliveira. **Análise de influência dos parâmetros de pulsação na soldagem do aço inoxidável Aisi 304 através do arame tubular AWS E316LT1-6**. 2009. 138p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Universidade Federal de Itajubá. Minas Gerais. 2009.

DJOUINA, Madjid. **Toxicological consequences of experimental exposure to aluminum in human intestinal epithelial cells**. Food and chemical toxicology. n.91. p.108-116. 2016.

DOMINICIANO, Laura Cristina da Cruz. **Avaliação da oleuropeína e de sanitizantes químicos, isolados ou associados, para eliminação de biofilmes de *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* em superfícies inertes.** 2015. 96p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de zootecnia e engenharia de alimentos da Universidade de São Paulo. São Paulo. 2015.

EDUARDO, Carlos de Paula, *et al.* **A terapia fotodinâmica como benefício complementar na clínica odontológica.** Rev.odonto. São Paulo. v.69, n.3, 226-235. 2015.

ENKO, Barbara. *et al.* ***Singlet oxygen-induced photodegradation of the polymers and dyes in optical sensing materials and the effect of stabilizers on these processes.*** The Journal Physical Chemistry. n.117. p.8873-8882. 2013.

ERCOLE, Flavia Falci, *et al.* **Risco para infecção de sítio cirúrgico em pacientes submetidos a cirurgias ortopédicas.** Rev. Latino Americana de Enfermagem. Ribeirão Preto. v.19, n.6, nov. dez. 2011.

ESTHER, Lima Renteria Maria. PILAR, Novoa Paredes Cecilia Bethsabe Del. ***Eficacia del proceso de esterilization de ciclo flash em autoclave del instrumental biomédico.*** 2017. 29p. Trabalho de Conclusão de Curso. (Gestão em Saúde) – Universidade Wiener. Peru. 2017.

FERNANDES, Miguel de Castro, *et al.* **Fraturas expostas e a incidência de infecção no desbridamento cirúrgico 6hs após o trauma.** São Paulo. Acta ortopédica Bras. v.23, n. 1. p.38-42. 2015.

FERRARI, Ricardo Bulcão. **Caracterização de liga metálica a base de alumínio – magnésio obtido por método convencional após tratamentos termomecânicos visando estruturas microcristalinas.** 2008. 85p. Dissertação. (Tecnologia Nuclear de Materiais) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. São Paulo. 2008.

FILHO, Heilton Morais Rego Lima. **Análise de ataques químicos para revelação de microestrutura de soldas dissimilares de aços inoxidáveis austenítico e ferrítico.** 2013. 77p. Trabalho de Conclusão de Curso. (Engenharia Metalúrgica) – Universidade Federal do Ceará. Fortaleza.2013.

FILHO, Olmede Celestino dos Santos. **Caracterizações de propriedades microestruturais e mecânicas de ligas AA 1100 e AA 50 52 processadas pela técnica de laminação acumulativa.** 2009. 167p. Tese (Engenharia de Materiais) – Universidade de São Paulo. São Paulo.2009.

FOGAÇA, Jennifer Rocha Vargas. **Espectro eletromagnético dos elementos químicos.** Brasil Escola. Disponível em: <http://www.brasilecola.uol.com.br/quimica/espectro-eletromagnetico-dos-elementos-quimicos.htm> em: 17 junho 2017.

FREITAS, M.A. *et al.* **Terapia Fotodinâmica com azul de metileno sobre cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina.** Rev.Univap. São José dos Campos. v.22, n.40. p.1-6. 2017.

FRIEDRICZEWSKI, Anelise Bravo *et al.* **Formação de biofilme por *Staphylococcus aureus* isolados de queijo mussarela elaborado com leite de búfala e seu efeito sobre a sensibilidade a sanitizantes.** São Paulo, Acta Scientiae Veterinariae. v.46, n. 1528. pag.1-6. 2018.

GARCIA, Amauri. SPIN, Jaime Alvares. SANTOS, Carlos Alexandre. **Ensaio de Materiais.** 2.ed. Rio de Janeiro. 2012. 365p.

GARCIA, Roseli Martins. **Determinação de alumínio em arroz cozido em panela de alumínio e sua possível relação para à saúde.** 2014. 44p. Monografia (Farmácia). Faculdade de Pindamonhangaba. São Paulo. 2014.

GIGLIO, Pedro Nogueira. *et al.* **Avanços no tratamento das fraturas expostas.** Rev. Bras. Ortop. n.50, v.2, p.125-130. 2015.

GRAZIANO, Kazuko Uchikawa. SILVA, Arlete. PSALTIKIDIS, Eliane Molina. **Enfermagem em Centro de Material e Esterilização.** 1ª. reimpressão. São Paulo: Molina, 2014. 417 p.

GUEDES, Benedito; FIKAUSKAS Mario E. **O plástico.** São Paulo, 1997.p. 101-107.

HAMBLIN, Michael R. YIN. **Antimicrobial Photosensitizers: Drug discovery under the spotlight.** Current medicinal chemistry. Unidade States. v.22, n.18. p.2159-2185. 2015

HASHIMOTO, Massanori. IMAZATO, Satoshi. ***Cytotoxic and genotoxic characterization of aluminum and silicon oxide nanoparticles in macrophages.*** Dental Materials. v.31, n.5. 2015. p.556-564.

HENCH L. Larry, *et al.* **Biocompatibilidade, Bioatividade e Engenharia de Tecidos.** In: Orefice R.L. **Biomateriais Fundamentos & Aplicações.** Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2012. p.479-516.

HORI, Leda Yumi. **Susceptibilidade do *Staphylococcus aureus* à terapia fotodinâmica.** TCC. 61p. 2013. (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual Paulista. Araraquara, SP.

HORTA, Daniel Miranda. JUNIOR, Jânes Landre. **Levantamento do estado limite de conformação do aço AISI 304 através das durezas.** Humanidades & Tecnologia em Revista. Minas Gerais, v.17. 2019

HU, Xiaoqing. *et al.* ***Antimicrobial Photodynamic Therapy to Control Clinically Relevant Biofilm Infections.*** Frontiers in microbiology. Germany, v.9. Pag. 1-24. 2018.

INOMATA, Katia Cilene Ayako. **Desenvolvimento de um protótipo de apoio para antisepsia de membro com fratura exposta.** 2016. 89p. Dissertação (Mestrado profissional em Enfermagem) – Centro Universitário São Camilo, São Paulo. 2016.

ISSA, Maria Claudia de Almeida. AZULAY, Monica Manela. **Terapia fotodinâmica: revisão da literatura e documentação iconográfica.** Anais Brasileiros de dermatologia. Rio de Janeiro, v.85, n.4. p. 501-511. 2010.

ISO 10993-5: 2009 **Avaliação biológica de dispositivos médicos - Parte 5: Testes para citotoxicidade: métodos in vitro,** 2009

ISO 11737-1:2016. ***Sterilization of health care products – Microbiological Methods.*** – Parte 1: *Determination of a population of microorganisms on product.* 2016.

JET, Bradley D. *et al.* ***Simplified agar plate method for quantifying viable bacteria.*** *Biotechniques.* London, v.23, n.4. p.648-650. 1997.

JUNIOR, Antônio Luiz Salgado de Abreu. PIMENTEL, Lucas de Souza. **Análise experimental do comportamento mecânico do polipropileno em ensaio de tração uniaxial**. 2016. 39p. Trabalho de Conclusão de Curso. (Engenharia Mecânica) – Universidade Federal Fluminense. Niterói, Rio de Janeiro. 2016.

JUNQUEIRA L.C. CARNEIRO, José. **Histologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 12^a.ed. 2013. 1188p.

KLOECKNERMETALS. **Manual técnico do aço inoxidável**. São Paulo, n.9, p.59-69, 2011.

LEAL, Antônio Miguel Gonçalves. **Caracterização de materiais para hélices de motoventiladores**. 2016. 145p. Dissertação de Mestrado (Engenharia Mecânica). Instituto Superior de Engenharia do Porto. Portugal. Porto. 2016.

LEITE, Matheus Rodrigues *et al.* **Ensaio de Tração mecânica e análise metalográfica do aço SAE 1045**. Revista Engenharia em Ação Uni Toledo. São Paulo, v.2, n.1. p.83-93. 2017.

LEMONS, Jose A. *et al.* **Protocols to study the physiology of oral biofilms**. Methods Mol Biol. v.666. p.87-102. 2010.

LIDA Itiro. **Ergonomia: projeto e produção**. 2^a.ed. São Paulo: Bluncher, 2005. 340p.

LISON L. **Histochemie et Cytochemie Animales - Principes et Methodes**. 3.ed. Gauthier Villars, Paris, France. 1960. p.285.

LOPES, Lilian Kelly de Oliveira. **Instrumental ortopédico de conformação complexa: avaliação do processamento, formação de biofilme e suas implicações**. 2016. 245p. tese (Doutorado em enfermagem) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 2016.

LTL Serviços. **Esterilização de H2O2**. Disponível em:<
http://ltservicos.com.br/hosp_esterilizacaoh2o2/>. Acesso em: 14 novembro 2018.

LUCAS, Thabata Coagilo. *et al.* **Identificação de deteriorações físicas e químicas nos instrumentais cirúrgicos após reprocessamentos**. Rev.Enf.do Centro-Oeste Mineiro. v.8. p.1-8. 2018.

LUQUETA, Gerson Roberto. SANTOS, Everton Diniz. PESSOA, Rodrigo Savio. **Wireless sensor network to monitoring na ozone sterilizer**. Revista IEEE América Latina, v.14, n.5. p.2167-2174. 2016.

MACHADO, Antônio Eduardo da Hora. **Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas**. Química nova. Minas Gerais. v.23, n.2, p.237-243. 2000.

MALMONGE, Sonia Maria. *et al.* **Avaliação da citotoxicidade de hidrogéis de polihema um estudo in vitro**. Revista Brasileira de Engenharia Biomédica. RJ, v.15, n. 1-2. Jan. ago. p. 49-54. 1999.

MANO, Eloisa Biasotto. **Polímeros como materiais de engenharia**. RJ. Ed: Edgard Blucher. 182p. 1990.

MAROTTI, Juliana. *et al.* **Descontamination of dental implant surfaces by means of photodynamic therapy**. Laser Med.Sci. Canada, v.28. p.303-309. 2013.

MAT Web. **Material property data**. Disponível em: <<<http://www.matweb.com/index.aspx>>>. em: 20 agosto 2019.

MAZZOLA, Priscila Gava. *et al.* **Choice of sterilizing/disinfecting agent – determination of the Decima Reduction Time (D-Value)**. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. v.45, n.4. p.701-708.

MELLO MLS. **Cytochemistry of DNA, RNA and nuclear proteins**. Brazilian Journal of Genetics. Ribeirão Preto, v.20, p.257-264, 1997.

MENDES, Natalia Helena. **Desenvolvimento de biofilme bacteriano em superfícies de metais puros**. 2015. 88f. Tese (Doutorado em Bioengenharia). Universidade de São Paulo, São Carlos. 2015.

MICHELIN, Ana Flávia. **Perfil epidemiológico das infecções hospitalares na unidade de terapia intensiva de um hospital terciário**. Revista Nursing. v.21, n.236. p.2037 – 2041. 2018.

MIORI, Gelson Freitas. **Modelagem numérica e experimental da conformabilidade de chapas da liga de alumínio AA5083 O processadas por**

fricção e mistura linear. 2014.184f. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica). Universidade de São Paulo, São Paulo. 2014.

MIYABE, Michelle. *et al.* **Effect of photodynamic therapy on clinical isolates of *Staphylococcus Spp.*** Braz Oral Res. São Paulo, v.25, n.3. p. 230-234. 2011.

MODENESI, Paulo José. **Soldabilidade dos aços inoxidáveis**. São Paulo. Senai. 100p. 2001.

MÓDIS L. **Organization of the Extracellular Matrix: A polarization microscopy approach**. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. p.208-225. 1991.

MOGHANIZADEH, Abbas. FARZI, Abolfazl. **Effect of heat treatment on an Aisi 304 austenitic stainless steel evaluated by the ultrasonic attenuation coefficient**. Carl Hanser Verlag, Muchen Materials Testing. v.58, n.5. 2018. p.448-452.

MOLEY, James P. *et al.* **Reduction in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* biofilms from implant materials in a diffusion dominated environment**. Journal of Orthopaedic Research. p.1-23. junho. 2018.

MORAIS, Liliane Siqueira. GUIMARÃES, Serra Gláucio. ELIAS, Carlos Nelson. **Liberção de íons por biomateriais metálicos**. R. Dental Press Ortodon Ortop. Facial. São Paulo, v.12, n.6. 2007. p. 48-53.

MORIYA, Giovana Abrahão de Araujo. **Métodos de esterilização a baixa temperatura**. In: GRAZIANO, Kazuko Uchikawa. **Enfermagem em Centro de Material e Esterilização**. 1a.ed. São Paulo: Manole editora. 2011. p. 131-144.

MUHAMMAD, Nura Nuaz. *et.al.* **Effect of Heat Treatment Temperature on Mechanical Properties of the AISI 304 Stainless Steel**. International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology. England, v.3, n.2. p.9516-9520. 2014.

MURAKAMI, N. FUKUSHI, S, TAKEUCHI, K. *et al.* **Antagonistic regulation of cell migration by epidermal growth factor and glucocorticoid in human gastric carcinoma cells**. Journal of Cellular Physiology, v.176, n.1, p. 127-137, 1998.

MURRAY, Patrick R. ROSENTHAL, Ken S. PFALLER, Michael A. **Microbiologia Médica**. 5a.ed. Elsevier. Rio de Janeiro. 2006. p.221-223.

NADER, Sumaia Alves. **Effectiveness of antimicrobial photodynamic therapy using 660nm Laser and Methylene blue for inactivating Staphylococcus aureus Biofilms in compact and cancellous bones: An in vitro study**. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. v.12, n.2. p.276-281. 2015.

NAGAROTTO, Penna. **Desinfecção e esterilização**. São Paulo: Atheneu, 2006, 338p.

NIINOMI, Mitsuo. NARUSHIMA, Takayuki. NAKAI, Masaaki. **Advances in Metallic Biomaterials**. vol.3. London. Springer, 2015. p. 281.

NUNEZ, Silvia Cristina. **Estudo da dinâmica de fotodegradação e agregação das fenotiazinas azul de metileno e azul de orto-toluidina com relação a eficiência fotodinâmica**. 2007. 146p. Doutorado (Doutor em ciências na área de tecnologia nuclear- materiais). Instituto de pesquisas energéticas e nucleares. São Paulo. 2007.

NUNEZ, Silvia Cristina *et al.* **Urea enhances the photodynamic efficiency of methylene blue**. Journal of photochemistry and photobiology B: Biology. n.150. p.31-37. 2015.

OLIVEIRA, Alexandre Bosco *et al.* **Avaliação citoquímica durante a germinação de sementes de sorgo envelhecidas artificialmente e osmocondicionadas, sob salinidade**. Rev. Cienc. Agron. Fortaleza, v.42, n.1. p.11-14. 2014.

OLIVEIRA, Janaina da Costa Pereira Torres. PADILHA, Ângelo Fernando. **Caracterização microestrutural dos alumínios comerciais AA 1100, AA 1050 e AA 1070**. R. Esc. Minas. v.62, n.3. Jul.Set. p.373-378. 2009.

OTOMAR, Herber Pires. **Estudo comparativo da estampabilidade da liga de alumínio AA 1050 partindo de placas obtidas por vazamento direto e bobinas obtidas por vazamento**. 2010. 153p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais). Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. São Paulo. 2010.

PADOVEZE, Maria Clara. KAZUKO, Uchikawa Graziano. **Aspectos conceituais e microbiológicos relacionados ao processamento de materiais utilizados na assistência à saúde.** in: GRAZIANO, Uchikawa Kazuko. SILVA, Arlete. Enfermagem em Centro de Material e Esterilização. 1ª.ed. São Paulo Manole. 2011. p.22-61.

PADOVEZE, Maria Clara. QUELHAS, Maria Cristina Ferreira. NAKAMURA, Marlene Hitomi Yoshida. **Esterilização por métodos físicos.** In: GRAZIANO, Kazuko. 1ª. edição. Manole: São Paulo. 2011. p. 32-48.

PAOLI, Marco Aurélio. **Degradação e estabilização de polímeros.** 2ª versão online. 2008. p.228. Disponível em: <http://www.chemkeys.com/blog/wp-content/uploads/2008/09/polimeros.pdf>. Acesso em: 30 Agosto 2019.

PARASCA, Mihaela Antonina Calin. **Light sources for photodynamic inactivation of bacteria.** Lasers in Medical Science, v.24, n.3. p.453-460. 2009.

PEREIRA, Gulter Silva. **Manufatura e caracterização de compósito de matriz de alumínio reforçado com partículas de carvão de silício, obtido por laminação acumulativa.** 2016. 98p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais). Universidade de São Paulo. São Paulo. 2016.

PEREIRA, Silvio André de Lima. **Estudo da influência da deformação plástica na cinética de nitretação em aços inoxidáveis AISI 304 e 316.** 2012. 66p. Dissertação. (Mestrado em Tecnologia Nuclear – Materiais) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo. 2012.

PERUSI, Janice Rodrigues. **Inativação fotodinâmica de microrganismos.** Química Nova. São Paulo, v.30, n.4, p.988-994, 2007.

PETRELLIS, Maria Carla. **Avaliação dos Efeitos do Azul de Metileno Fotoativado no Modelo Experimental do Tumor de Walker 256.** 2014. 158p. Tese (Doutorado em Farmácia). Universidade de São Paulo, São Paulo. 2014.

PETRY, André. **Mercado brasileiro do polipropileno com ênfase no setor automobilístico.** 2011. 35f. TCC. (Engenharia Química). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2011.

PIRES, Ana Luiza R.; BIERHALZ, Andréia C.K.; MORAES, Ângela M. **Biomateriais: tipos, aplicações e mercado**. Química Nova. São Paulo, v.38, n.7, p.957-971, 2015.

PLÁSTICO EM REVISTA. **Plásticos no Brasil**. São Paulo: Editora Definição. n.17.2013.

POSSARI, José Francisco. **Centro de Material e Esterilização Planejamento, Organização e Gestão**. 4ª.ed. São Paulo: Erica, 2011.118p.

PRATAVIEIRA, Sebastiao, *et al.* **História da Terapia Fotodinâmica**. In: Vanderlei S. Bagnato. **Terapia Fotodinâmica em Dermatologia**. Programa TFD Brasil. São Carlos. 2015. p.23-38.

PSALTIKIDS, Eliane Molina. **Enfermagem em centro de material e esterilização**. Manole.1ª.ed. São Paulo: 2011. p.3-20.

RAMUSSEN, Karin. *et al.* **Real-time imaging of anti-biofilm effects using CP-OCT**. Biotechnology and Bioengineering. v.113, n.1. p. 198-205. 2015.

RIBEIRO, Marta. MONTEIRO, Fernando J. FERRAZ, Maria P. **Infection of orthopedic implants with emphasis on bacterial adhesion process and techniques used in studying bacterial-material interactions**. Biomater. v.2, n.4. p.176-194. 2012.

RIJEZA, Metalurgia. **Conheça mais sobre a dureza Vickers**. <<https://www.rijeza.com.br/dureza-vickers>> página visitada em: 22 de junho de 2019.

RISVI, Syed Husain Mustafa. *et al.* **Proteins in human neuroblastom SH-SY5Y Cells**. Springer Science. New York. p.1-12. 2015.

ROSA, Luciano Pereira, *et al.* **Antimicrobial photodynamic inactivation of Staphylococcus aureus biofilms in bone specimens using methylene blue, toluidine blue, ortho and malachite green: an in vitro study**. Oral Biology. v.60, n. 5. p.675-80. 2015.

ROSA, Sylmara Patrícia de Santana. **Adesão microbiana em superfícies utilizadas durante a cadeia produtiva do leite**. 2018. 38p. Dissertação

(Mestrado Profissional em Sistemas Agroindustriais). Universidade Federal de Campo Grande. RS. 2018.

RUTALA, A. Willian. **Disinfection and Sterilization**. Disponível em: <<https://vtwqt464m234djrhibie88e10-wpengine.netdna-ssl.com/wp-content/uploads/2018/04/DS-SHEAConfApr18final-002.pdf>>. Visitada em 07 novembro de 2019.

SABARA, Ely Wagner Ferreira. **Caracterização microestrutural e avaliação da resistência à corrosão de aços inoxidáveis austenítico utilizados em aplicações como biomateriais**. 2013. 158p. Dissertação. (Mestrado em Engenharia Mecânica) Universidade Federal de São João Del Rey. Minas Gerais. 2013.

SACCON, Vinicius Toledo. *et al.* **Caracterização microestrutural e comportamento mecânico das ligas de alumínio AA2139T3 e T8 soldadas por fricção rotativa com mistura**. Soldag. Insp. São Paulo, v.15, n.4. p.289-297. 2010.

SACHS, G. HORN, Van K.R. **Applied Metallurgy and the Industrial Processing of Ferrous and Nonferrous Metals and Alloys**. American Society for Metals. 1940. p.139.

SANAWAR, Huma. *et al.* **Enhanced biofilm solubilization by urea in reverse osmosis membrane systems**. Water Research X. v.1, n.1. 2018. p.1-10.

SANTOS, Alessandro Correa Prudente. **Avaliação histológica e molecular da reação inflamatória ao implante subcutâneo de tela de polipropileno em modelo experimental com ratos: Bases para a compreensão do conceito de biocompatibilidade de próteses empregadas em Urologia Feminina**. 2015. 115p. (Doutorado em Ciências Médicas). Faculdade de Ciências Médicas. Universidade Estadual de Campinas. Campinas. 2015.

SANTOS, DANIELA MOREIRA. *et al.* **Monitoração segura dos processos de esterilização**. Gep News. v.2, n.2. p.2-8. 2018.

SANTOS Jr, Arnaldo Rodrigues. WADA, Maria Lucia F. **Foetal calf serum and dexamethasone effects on vero cell growth and differentiation**. Cytobios, v.99. p.159-171. 1999.

SANTOS Jr. Arnaldo Rodrigues. WADA, Maria Lucia F. **Polímeros biorreabsorvíveis como substrato para cultura de células de engenharia tecidual**. Polímeros. São Carlos. p.308-317. 2007.

SCHWAAB, Gabriela, *et al.* **Sterilization of health products in public services**. *Journal of Nursing*, v.10, n. 12. p. 4591- 4598. 2016.

SCOPEL, Tiago. **Avaliação da estampabilidade do alumínio 1100 no processo de estampagem profunda**. 2014. 74p. TCC. (Graduação em Engenharia Mecânica). Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul. 2014.

SILGADO, Jimy Unfried. **Effects of shoulder geometry of tool on microstructure and mechanical properties of friction stir welded joints of AA1100 aluminum alloy**. rev. fac. Nac. Minas. v.84, n.200. p.11-18.

SILVA, A. **Organização do trabalho na unidade Centro de Material**. Rev. Esc. Enf. da USP, v.32, n.2. p.169-78. 1998.

SILVA, A. **Organização do centro de material e esterilização**. GRAZIANO, K.U. In: **Enfermagem em centro de material e esterilização**. 1ª.ed. Manole. São Paulo. 2011. p.1-21.

SILVA, Daniel Barbosa. **Implante intraperitoneal de tela de polipropileno revestida de hidrogel de poli (2-Hidroxiethyl Metacrilato) em cães- aspecto histológico**. 2010. 53p. Dissertação. (Mestrado Veterinária) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

SILVA, J.R.M.B. NUNES, L.S.A. RABELLO, M.S. **Fotodegradação do polipropileno contendo combinação de fotoestabilizantes**. Revista Eletrônica de Materiais e Processos, v.11, n.2. p.112-120. 2016.

SILVA, Patrick Leonardo Nogueira. **Relação de custo-benefício na prevenção e no controle das infecções relacionadas à assistência à saúde em uma unidade de terapia intensiva neonatal**. J.Health bio.Sci.v.5.,n.2. p.142-149. 2017.

SILVA, Rubian Messias. *et al.* **Utilização do óxido de etileno para esterilização de material médico – hospitalar**. Revista Utinga, n.4. p.109-122. 2005.

SILVEIRA, Marcos Roberto Torres. **Centro de Material e Esterilização**. 2014. 20p. Monografia (Pós-graduação em arquitetura de sistemas de saúde). Universidade Católica de Brasília. Brasília. 2014.

SIMÕES, Mauricio Silva. CASTRO, Ana Luiza Rezende. ANDRADE, Margareth Spangler. **Atrito interno em aços inoxidáveis austenítico contendo cobre**. REM., Ouro Preto, v.63, n.1, p. 51-55, 2010.

SIMPLICIO, Fernanda Ibanez. MAIONCHI, Florângela. HIOKA, Noboru. **Terapia fotodinâmica: Aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos**. Quim. Nova, São Paulo, v. 25, n. 5. p. 801-807. 2002

SKELLIE, Brian. **A brief history of sterilization**. Disponível em: <<https://brnskill.com/shares/a-brief-history-of-sterilization/>>. Acesso em: 13 jun. 2017.

SMITH, F. Willian. HASHEMI, Javad. **Fundamentos de Engenharia e Ciência dos Materiais**. 5ª.ed. Porto Alegre: AMGH, 2012. 707p.

SOUZA, Clecia M. CHINELLATO, Anne. MOURA, Esperidiana A. B. **Avaliação dos efeitos da radiação por feixes de elétrons nas propriedades mecânicas do polipropileno**. In: *International Nuclear Atlantic Conference*. 2009, Rio de Janeiro. p.1-7.

SOBECC. Sociedade Brasileira de Enfermeiros de Centro Cirúrgico. **Práticas recomendadas**. 7ª. Ed. São Paulo: SOBECC. 2017. 483p.

SONI, Aswathi. et al. **Bacillus Spores in the Food Industry: A Review on Resistance and Response to Novel Inactivation Technologies**. Reviews in food Science and Food Safety. V.15. p.1139-1148. 2016.

SOUZA, Fabricio Mendes. **O Alumínio e suas ligas**. São Paulo: Seven System. 2015. p. 17-52.

SOUZA, Sergio Augusto. **Ensaio mecânicos de materiais metálicos**. 5ª.ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2015. 283p.

SUN, Z. L.. WATAHA, J.C. HANKS, C.T. **Effects of metal ions on osteoblast-like cell metabolism and differentiation.** *Journal of Biomedical Materials Research*, v.34, p.29-37. 1997.

SUTHERLAND, D.G.J. **Photo-oxidation of electroluminescent polymers studied by core-level photoabsorption spectroscopy.** *Appl. Phys*, v.68, n.15. p.1-3.1996.

TALLEY, Anne D. *et al.* **Oxidation and degradation of polypropylene transvaginal mesh.** *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, v.28, n. 5. p.444-458. 2017.

TARDIVO, João Paulo. *et.al.* **Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications.** *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v.2, p.175-191.2005.

THEREZA, Christina Vessoni. **Desinfecção e Esterilização.** São Paulo: Editora Atheneu, 2000, p.37-89.

THOMPSON, Cynthia. **Avaliação da contração e do coeficiente de expansão térmico linear em copolímeros heterofásico.** 2009. 43p. TCC (Engenharia de materiais). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2009.

TIPPLE, Analcara Ferreira Veiga, *et al.* **O monitoramento de processo físicos de esterilização em hospitais do interior do estado de Goiás.** *Rev. Esc. Enferm. USP*. São Paulo, v.45, n.3, p. 751-757. 2011.

TOBOGA, S.R.; VILAMAIOR, P.S.L. **Citoquímica.** In: Carvalho, H.F.; Recco-Pimentel, S.M. (Ed.s) **A Célula**, 3a edição, 2013, São Paulo: Manole, p.60-68.

TONIATO, T.N. *et al.* **Influence of forward speed on corrosion of aluminum alloy AA6082-T6 welded by friction linear.** In: Congresso Nacional de Mecânica Experimental.10. p.1-22. 2016.

TRIPATHI, Devesh. **Practical guide to polypropylene.** United Kingdon: Rapra Technology Ltd, 2002, p.46-47.

TUKUR, S.A. *et al.* **Effect of heat treatment temperature on mechanical properties of the Aisi 304 stainless steel.** *Intl J. Innov Res Sci*, Nigeria. v.3, n.2. 2014.

UCHIKAWA Kazuko. SILVA, Arlete. PSALTIKIDS, Eliane Molina. **Enfermagem em centro de material e esterilização**. 1ª.ed. São Paulo: 2011. p.109-131.

VASCONCELOS, Anilson Cesar. **Processo inflamatório relacionado com a presença de biomateriais**. In:OREFICE, Rodrigo Lambert. **Biomateriais Fundamentos & Aplicações**. Rio de Janeiro. Cultura Médica, 2012.p.122-128.

VERMELHO, Alane Beatriz. BASTOS, Maria do Carmo de Freire. SÁ, Marta Helena Branquina. **Bacteriologia Geral**. Diagrama Ação. Rio de Janeiro. 2008.p.13-23.

VEIGA, M. *et al.* **Accumulation, elimination and effects of parenteral exposure to aluminum in newborn and adult rats**. Journal of Inorganic Biochemistry, n.128. p.215-20. 2013.

VILLA, Pablo Erick Alves, *et al.* **Avaliação clínica de pacientes com osteomielite crônica após fraturas expostas tratados no Hospital de Urgências de Goiânia, Goiás**. Rev. Bras.Ortop., v.48, n.1, p.22-28, 2013.

VOORT, George F. Vander. **ASM International Metallography principles and practice**. 1ed. New York: Mc Graw Hill, 1999. p.1-10

WANG, You-Xiong. *et al.* **Effects of the chemical structure and the surface properties of polymeric biomaterials on their biocompatibility**. Pharmaceutical Research, v.21, n.8. 2004. p.1362- 1373.

WILLIAMS, D.F. **The Willians dictionary of Biomaterials**. 1.ed. Liverpool: Liverpool University press. 1999. 343p.

WOEDTKE, Thomas. KRAMER, Axel. **The limits of sterility assurance**. GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär, v.3, n.3. 2008, p.1-10.

WU, Jiangtao. *et al.* **Evolution of material properties during free radical photopolymerization**. Journal of the Mechanics and Physics of Solids, n.112. p. 25-49. 2018.

WU, Songmei. *et al.* **Role of the Surface Nanoscale Roughness of Stainless Steel on Bacterial Adhesion and Microcolony Formation**. ACS Omega, v.3. p.6456-6464. 2018.

ZABEU, José Luis Amim, *et al.* **Perfil da vítima de acidente motociclísticos na emergência de um hospital universitário.** Rev.Bras.Ortop., v.48, n3, p.242-245, 2013.

10. ANEXOS

10.1 Formulário do teste químico e biológico realizado na autoclave.

Ficha de registo de resultados - no. De identificação da Autoclave:

Data	Temperatura Pressão	Tempo ciclo total c/ secagem	Cole aqui o indicador Químico Emulador ou Integrador	resultado	Assinatura operador
08/02/2018	121°C / 1 atm	6hs		ok	
08/02/2018	teste biológico				
14/02/2018	121°C / 1 atm	4hs		ok	
16/02/2018	121°C / 1 atm	8hs		ok	
17/02/2018	121°C / 1 atm	8hs		ok	
18/02/2018	121°C / 1 atm	4hs		ok	

Ficha de registro de resultados - no. De identificação da Autoclave:

Data	Temperatura Pressão	Tempo ciclo total c/ secagem	Cole aqui o Indicador Químico Emulador ou integrador	resultado	Assinatura operador
10/03/2018	121°C/ 1 atm	4hs	<p>Integrador Qui Integrador Químico Tipo 4 Integrador Type 4 - ISO 11140-1</p> <p>LOT : IQKT1216-500 FAB : 10/12/2016 VAL : 10/12/2018</p> <p>BIOMECK PRODUTOS MÉDICOS</p> <p>BIOMECK-CIENTIFICA</p> <p>Integrador Químico Tipo 5 Integrador Type 5 - ISO 11140-1</p> <p>121°C - 15min. 121°C - 3,5min.</p> <p>LOT: ITQ31610-500 FAB: 15/10/2016 VAL: 15/10/2018</p>	ok	
11/03/2018	121°C/ 1 atm	6hs	<p>Integrador Químico Tipo 4 Integrador Type 4 - ISO 11140-1</p> <p>LOT : IQKT1216-500 FAB : 10/12/2016 VAL : 10/12/2018</p> <p>BIOMECK PRODUTOS MÉDICOS</p> <p>BIOMECK-CIENTIFICA</p> <p>Integrador Químico Tipo 5 Integrador Type 5 - ISO 11140-1</p> <p>121°C - 15min. 121°C - 3,5min.</p> <p>LOT: ITQ31610-500 FAB: 15/10/2016 VAL: 15/10/2018</p>	ok	
12/03/2018	121°C/ 1 atm	8hs	<p>Integrador Químico Tipo 4 Integrador Type 4 - ISO 11140-1</p> <p>LOT : IQKT1216-500 FAB : 10/12/2016 VAL : 10/12/2018</p> <p>BIOMECK PRODUTOS MÉDICOS</p> <p>BIOMECK-CIENTIFICA</p> <p>Integrador Químico Tipo 5 Integrador Type 5 - ISO 11140-1</p> <p>121°C - 15min. 121°C - 3,5min.</p> <p>LOT: ITQ31610-500 FAB: 15/10/2016 VAL: 15/10/2018</p>	ok	
13/03/2018	121°C/ 1 atm	4hs	<p>Integrador Qui Integrador Químico Tipo 4 Integrador Type 4 - ISO 11140-1</p> <p>LOT : IQKT1216-500 FAB : 10/12/2016 VAL : 10/12/2018</p> <p>BIOMECK PRODUTOS MÉDICOS</p> <p>BIOMECK-CIENTIFICA</p> <p>Integrador Químico Tipo 5 Integrador Type 5 - ISO 11140-1</p> <p>121°C - 15min. 121°C - 3,5min.</p> <p>LOT: ITQ31610-500 FAB: 15/10/2016 VAL: 15/10/2018</p>	ok	
14/03/2018	121°C/ 1 atm	4hs	<p>Integrador Qui Integrador Químico Tipo 4 Integrador Type 4 - ISO 11140-1</p> <p>LOT : IQKT1216-500 FAB : 10/12/2016 VAL : 10/12/2018</p> <p>BIOMECK PRODUTOS MÉDICOS</p> <p>BIOMECK-CIENTIFICA</p> <p>Integrador Químico Tipo 5 Integrador Type 5 - ISO 11140-1</p> <p>121°C - 15min. 121°C - 3,5min.</p> <p>LOT: ITQ31610-500 FAB: 15/10/2016 VAL: 15/10/2018</p>	ok	
15/03/2018	121°C/ 1 atm	4hs	<p>Integrador Qui Integrador Químico Tipo 4 Integrador Type 4 - ISO 11140-1</p> <p>LOT : IQKT1216-500 FAB : 10/12/2016 VAL : 10/12/2018</p> <p>BIOMECK PRODUTOS MÉDICOS</p> <p>BIOMECK-CIENTIFICA</p> <p>Integrador Químico Tipo 5 Integrador Type 5 - ISO 11140-1</p> <p>121°C - 15min. 121°C - 3,5min.</p> <p>LOT: ITQ31610-500 FAB: 15/10/2016 VAL: 15/10/2018</p>	ok	

Ficha de registro de resultados - no. De identificação da Autoclave:

Data	Temperatura	Tempo ciclo total c/ secagem	Cole aqui o Indicador Químico Emulador ou Integrador	resultado	Assinatura operador
22/03/2018	121°C/ 1 atm	4hs	<p>Integrador Químico Tipo 4 Integrator Type 4 - ISO 11140-1</p> <p>LOT: IQKT1216-500 FAB: 10/12/2016 VAL: 10/12/2018</p> <p>Integrador Químico Tipo 4 Integrator Type 4 - ISO 11140-1</p> <p>LOT: IQKT1216-500 FAB: 10/12/2016 VAL: 10/12/2018</p> <p>Integrador Químico Tipo 4 Integrator Type 4 - ISO 11140-1</p> <p>LOT: IQKT1216-500 FAB: 10/12/2016 VAL: 10/12/2018</p> <p>Integrador Químico Tipo 4 Integrator Type 4 - ISO 11140-1</p> <p>LOT: IQKT1216-500 FAB: 10/12/2016 VAL: 10/12/2018</p>	ok	
23/03/2018	121°C/ 1 atm	4hs	<p>Integrador Químico Tipo 4 Integrator Type 4 - ISO 11140-1</p> <p>LOT: IQKT1216-500 FAB: 10/12/2016 VAL: 10/12/2018</p> <p>Integrador Químico Tipo 4 Integrator Type 4 - ISO 11140-1</p> <p>LOT: IQKT1216-500 FAB: 10/12/2016 VAL: 10/12/2018</p> <p>Integrador Químico Tipo 4 Integrator Type 4 - ISO 11140-1</p> <p>LOT: IQKT1216-500 FAB: 10/12/2016 VAL: 10/12/2018</p> <p>Integrador Químico Tipo 4 Integrator Type 4 - ISO 11140-1</p> <p>LOT: IQKT1216-500 FAB: 10/12/2016 VAL: 10/12/2018</p>	ok	
24/03/2018	121°C/ 1 atm	4hs	<p>Integrador Químico Tipo 4 Integrator Type 4 - ISO 11140-1</p> <p>LOT: IQKT1216-500 FAB: 10/12/2016 VAL: 10/12/2018</p> <p>Integrador Químico Tipo 4 Integrator Type 4 - ISO 11140-1</p> <p>LOT: IQKT1216-500 FAB: 10/12/2016 VAL: 10/12/2018</p> <p>Integrador Químico Tipo 4 Integrator Type 4 - ISO 11140-1</p> <p>LOT: IQKT1216-500 FAB: 10/12/2016 VAL: 10/12/2018</p> <p>Integrador Químico Tipo 4 Integrator Type 4 - ISO 11140-1</p> <p>LOT: IQKT1216-500 FAB: 10/12/2016 VAL: 10/12/2018</p>	ok	
24/03/2018	teste biológico		<p>BIOLOGICAL INDICATOR</p> <p>LOT: BK1000A REF: _____</p> <p>MAO Exp. 06/2018 DATA: _____</p>	ok	
25/03/2018	121°C/ 1 atm	8hs	<p>Integrador Químico Tipo 5 Integrator Type 5 - ISO 11140-1</p> <p>LOT: ITOS1610-500 FAB: 15/10/2016 VAL: 15/10/2018</p> <p>Integrador Químico Tipo 5 Integrator Type 5 - ISO 11140-1</p> <p>LOT: ITOS1610-500 FAB: 15/10/2016 VAL: 15/10/2018</p> <p>Integrador Químico Tipo 5 Integrator Type 5 - ISO 11140-1</p> <p>LOT: ITOS1610-500 FAB: 15/10/2016 VAL: 15/10/2018</p> <p>Integrador Químico Tipo 5 Integrator Type 5 - ISO 11140-1</p> <p>LOT: ITOS1610-500 FAB: 15/10/2016 VAL: 15/10/2018</p>	ok	
26/03/2018	121°C/ 1 atm	8hs	<p>Integrador Químico Tipo 5 Integrator Type 5 - ISO 11140-1</p> <p>LOT: ITOS1610-500 FAB: 15/10/2016 VAL: 15/10/2018</p> <p>Integrador Químico Tipo 5 Integrator Type 5 - ISO 11140-1</p> <p>LOT: ITOS1610-500 FAB: 15/10/2016 VAL: 15/10/2018</p> <p>Integrador Químico Tipo 5 Integrator Type 5 - ISO 11140-1</p> <p>LOT: ITOS1610-500 FAB: 15/10/2016 VAL: 15/10/2018</p> <p>Integrador Químico Tipo 5 Integrator Type 5 - ISO 11140-1</p> <p>LOT: ITOS1610-500 FAB: 15/10/2016 VAL: 15/10/2018</p>	ok	

Ficha de registro de resultados - no. De identificação da Autoclave:

Data	Temperatura Pressão	Tempo ciclo total c/ secagem	Cole aqui o Indicador Químico Emulador ou Integrador	resultado	Assinatura operador
27/03/2018	121 °C/ 1 atm	4hs		ok	
28/03/2018	121 °C/ 1 atm	4hs		ok	
29/03/2018	121 °C/ 1 atm	4hs		ok	
30/03/2018	121 °C/ 1 atm	4hs		ok	
31/03/2018	121 °C/ 1 atm	8hs		ok	
31/03/2018 teste biológico					

Ficha de registro de resultados - no. De identificação da Autoclave:

Data	Temperatura Pressão	Tempo ciclo total c/ secagem	Cole aqui o Indicador Químico Emulador ou Integrador	resultado	Assinatura operador
16/03/2018	121°C/ 1 atm	4hs		ok	
16/03/2018	teste biológico				
17/03/2018	121°C/ 1 atm	4hs		ok	
18/03/2018	121°C/ 1 atm	8hs		ok	
19/03/2018	121°C/ 1 atm	8hs		ok	
20/03/2018	121°C/ 1 atm	4hs		ok	

Ficha de registro de resultados - no. De identificação da Autoclave:

Data	Temperatura Pressão	Tempo ciclo total c/ secagem	Cole aqui o Indicador Químico Emulador ou Integrador	resultado	Assinatura operador
01/04/2018	121°C/ 1 atm	6hs	<p>Integrador Químico Tipo 4 Integrator Type 4 - ISO 11140-1</p> <p>Integrador Químico Tipo 5 Integrator Type 5 - ISO 11140-1</p> <p>Integrador Químico Tipo 4 Integrator Type 4 - ISO 11140-1</p> <p>Integrador Químico Tipo 5 Integrator Type 5 - ISO 11140-1</p>	ok	
02/04/2018	121°C/ 1 atm	4hs	<p>Integrador Químico Tipo 4 Integrator Type 4 - ISO 11140-1</p> <p>Integrador Químico Tipo 5 Integrator Type 5 - ISO 11140-1</p> <p>Integrador Químico Tipo 4 Integrator Type 4 - ISO 11140-1</p> <p>Integrador Químico Tipo 5 Integrator Type 5 - ISO 11140-1</p>	ok	