



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Engenharia

Revestimentos à base de cobre e a sua influência no comportamento das bactérias

Ana Raquel Costa Assunção

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioengenharia
(2º Ciclo de estudos)

Orientador: Doutor Frederico Álvaro Sequeira Nogueira
Co-orientador: Prof. Doutor Isabel Cristina Aguiar de Sousa e Silva Gouveia

Covilhã, Outubro de 2018

Dedicatória

À minha família.

Agradecimentos

Tenho agradecer primeiramente ao Dr. Frederico Álvaro Sequeira Nogueira que me orientou e acompanhou neste projeto, pela partilha de conhecimento científico, grande disponibilidade, paciência e incentivo prestado ao longo de todo o processo.

Agradeço também à Professora Doutorada Isabel Cistina Aguiar de Sousa e Silva Gouveia pelos conhecimentos transmitidos durante o processo de elaboração desta dissertação.

À Eng^a Ana Paula Gomes, do Centro de Óptica, agradeço imenso toda a disponibilidade na recolha de imagens SEM e todo o conhecimento técnico transmitido que foi fundamental para complementar este estudo .

Agradeço também a Claudia Mouro e Lúcia Amorim, que me ajudaram em vários processos de laboratório e tornaram o ambiente de laboratório e pesquisa bastante agradável.

Por fim, mas não menos importante, agradeço à minha família que me deu todo o suporte e apoio para chegar a esta fase da minha vida.

Resumo

Em ambiente hospitalar a contaminação de superfícies, tais como os manipulados das portas e os carrinhos operacionais hospitalares, podem ocorrer por manuseamento, derramamento de soluções não estéreis ou através de aerossóis, sendo este um potencial modo de transmissão de infecções.

As infecções originadas por bactérias têm sido uma das principais preocupações de saúde ao longo da história humana. Após o desenvolvimento de antibióticos, surgiu a convicção de que o problema das infecções bacterianas teria os dias contados. Contudo, os agentes patogênicos evoluíram sofisticados mecanismos de resistência aos antibióticos. Essa resistência antimicrobiana é um dos desafios mais significativos para a saúde humana nos dias de hoje.

Com a escassez de novos antibióticos no mercado, a necessidade de medidas para evitar uma crise global na área da saúde é cada vez mais urgente. Dessa forma, os revestimentos antibacterianos tornaram-se um campo de pesquisa muito ativo e fortemente estimulado pela crescente urgência de identificar alternativas à administração tradicional de antibióticos.

Nesta dissertação o objetivo consistiu em adquirir um conhecimento abrangente sobre revestimentos antimicrobianos já existentes e uma posterior investigação de um revestimento inovador com propriedades antimicrobianas à base de nanopartículas de cobre imobilizado em nanofibras de policaprolactona (PCL) obtidas através da técnica de electrospinning.

Palavras-chave: Revestimentos antimicrobianos; Cobre; Electrospinning; *Staphylococcus aureus*; *Pseudomonas aeruginosa*

Abstract

In hospital environment, the contamination of surfaces, such as door handles and hospital operating trolleys, may occur through handling, spillage of non-sterile solutions or through aerosols, thus being a potential mode of transmission of infections.

Infections caused by bacteria have been a major health concern throughout human history. After the discovery of antibiotics, the conviction that the problem of bacterial infections would have their last days arose. However, pathogens have evolved sophisticated drug resistance mechanisms. This antimicrobial resistance is one of the most significant challenges to human health today.

With the shortage of new antibiotics on the market, the need for measures to prevent a global health crisis is increasingly urgent. Thus, antibacterial coatings have become a very active field of research and strongly stimulated by the increasing urgency of identifying alternatives to the traditional administration of antibiotics.

In this dissertation the objective was to acquire a comprehensive knowledge about existing antimicrobial coatings and a subsequent investigation of an innovative coating with antimicrobial properties based on nanoparticles immobilized on polycaprolactone nanofibres (PCL) obtained through the electrospinning technique.

Key words: Antimicrobial coatings; Copper; Electrospinning; *Staphylococcus aureus*; *Pseudomonas aeruginosa*.

Índice

Lista de Figuras	XIII
Lista de Tabelas	XV
Capítulo 1 - Abordagem inicial	1
1.1. Contextualização do estudo	2
1.2. Identificação do problema base	2
Capítulo 2 - Bactérias e a resistência a antibióticos	5
2. Bactérias	6
2.1. Bactérias Gram positivas e Gram negativas	7
2.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	8
2.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
2.4. Resistência bacteriana aos antibióticos	11
2.4.1. Inibição da síntese da parede celular	12
2.4.2. Inibidores da síntese de proteínas	13
Capítulo 3 - Cobre e as suas aplicações	15
3.1. Cobre	16
3.2. Mecanismo de ação dos agentes antimicrobianos à base de metal	17
3.3. Condições para a atividade antimicrobiana do cobre	18
3.3.1. Temperatura e humidade	18
3.3.2. Aplicação húmida ou seca	18
3.3.3. Concentração de cobre	18
3.3.4. Tamanho do elemento antimicrobiano	19
3.3.5. Tipo de contacto	19
3.3.6. Forma do cobre	19
3.3.7. Método de preparação	20
3.3.8. Ambiente químico	20
3.3.9. Conclusões	20
3.4. Usos propostos de cobre no hospital	20
Capítulo 4 - Revestimentos Antimicrobianos	23
4.1 Revestimentos à base de cobre	24
4.1.1 Quitosano	25
4.1.2 Celulose e Algodão	26
4.1.3 Polipropileno	26
4.1.4 Polietileno	27
4.2. Mecanismos de ação de nanocompósitos de polímero e cobre	27
4.2.1. Libertação dos iões de cobre	27

4.2.2. Libertação de nanopartículas de cobre	28
4.2.3. Inibição do biofilme	29
4.3. Aplicações de nanocompósitos de polímero-cobre.....	30
4.4. Risco ambiental dos nanocompósitos de cobre-polímero	31
Capítulo 5 - Técnica de electrospinning	33
5.1. Electrospinning	34
5.2.Noções básicas de processo eletrospinning	35
5.2.1. Parâmetros do processo eletrospinning	36
Parte experimental	37
Estudo de um revestimento à base de cobre e sua influência no comportamento das bactérias.	37
1. Materiais e Métodos	38
1.1. Materiais	38
1.2. Métodos	38
1.2.1. Produção das nanofibras de PCL com Cu^{2+}	38
1.2.2. Ensaio antimicrobianos	39
1.2.3. Porosidade	40
1.2.4. Perfil de libertação do cobre	40
1.2.5. Ângulo de contacto (θ)	40
1.2.6. Energia de Superfície	41
2. Resultados	42
2.1. Produção das nanofibras de PCL e Cu^{2+}	42
2.2. Ensaio antimicrobianos	43
2.4. Perfil de libertação do cobre	45
2.5. Ângulo de Contacto	45
2.6. Energia de superfície	46
2.7. Microscopia electrónica de varrimento (SEM).....	46
3. Discussão	48
Conclusão e perspectivas futuras	51
Referências.....	53

Lista de Figuras

Figura 1 - Fissão Binária de uma bactéria	6
Figura 2 - Esquematização a) Bactéria Gram-positiva b) Gram-negativa	7
Figura 3 - Exemplo da propagação de bactérias resistentes a antibióticos	11
Figura 4 - Máquina de electrospinning Nanospider	34
Figura 5 - Ilustração da técnica de electrospinning	35
Figura 6 - Controlo PCL	42
Figura 7 - Amostras de electrospinning a) PCL+300 mg/L Cu ²⁺ b) PCL+1000 mg/L Cu ²⁺	42
Figura 8 - Amostras de electrospinning a) 5% ; b) 10%	43
Figura 9 - Redução bacteriana das amostras de a) 5% e b) 10%	44
Figura 10 - Percentagem de porosidade no controlo e amostras de 5% e 10%	44
Figura 11 - Imagem de nanofibras observadas através de SEM a) Controlo; b) 5% e c) 10% ...	46

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Constituição das amostras controlo, 5% e 10% usadas na técnica de electrospinning 39

Tabela 2 - Perfil de libertação de Cu^{2+} 45

Tabela 3 - Energia de superfície das amostras controlo, 5% e 10% em *S. aureus* e *P. aeruginosa* 46

Capítulo 1 - Abordagem inicial

1.1. Contextualização do estudo

Há muito que se reconheceu que a contaminação de superfícies por microrganismos patogénicos pode comprometer a higiene geral do meio ambiente [1]. O potencial de superfícies de unidades de saúde contaminadas na transmissão de agentes patogénicos depende de uma série de fatores, incluindo a capacidade destes permanecerem viáveis numa variedade de superfícies ambientais secas, a frequência com que contaminam superfícies comuns manipuladas por pacientes e profissionais de saúde, e se os níveis de contaminação são ou não suficientes para causar uma infeção nos pacientes [2]. Em meio hospitalar, a contaminação de superfícies abertas e metálicas, como placas de porta, trilhos de cama e carrinhos operacionais, ocorre por contato com a mão, derramamento/salpicos de soluções não estéreis ou através de aerossóis [1].

O papel de transmissor de agentes patogénicos pelas superfícies contaminadas é fundamentada no facto de que a limpeza e desinfecção regular podem reduzir a incidência de colonização das mesmas [2] evitando assim uma posterior contaminação cruzada [1]. Mesmo nos dias de hoje as infeções adquiridas em âmbito hospitalar são uma temática controversa. A colonização bacteriana e a formação de biofilmes são reconhecidos como questões graves em áreas como medicina, alimentar, instrumentos cirúrgicos, entre outros [3].

A utilização de superfícies biocidas poderá ser uma das soluções importantes, sendo que já foi demonstrado em ensaios clínicos e laboratoriais que as ligas de cobre são eficazes a eliminar bactérias, fungos e vírus [4].

A incorporação de nanopartículas (NP) metálicas em matrizes poliméricas gera novos materiais chamados nanocompósitos. A combinação das diferentes propriedades desses componentes (polímero e nanopartículas) pode gerar um material com melhores propriedades óticas, eletrónicas, mecânicas e antimicrobianas. Os nanocompósitos com propriedades antibacterianas podem ser obtidos incorporando nanopartículas com atividade antibacteriana conhecida ou aumentando as propriedades antibacterianas que a matriz polimérica já possui [5].

1.2. Identificação do problema base

As infeções causadas por microorganismos resistentes a múltiplos fármacos (MDR) são uma preocupação crescente e, juntamente com a falta de novos antimicrobianos, significa que as opções para um tratamento antimicrobiano eficaz são limitadas [4]. Deste modo, prevenir a colonização bacteriana de superfícies biomédicas é a chave para limitar a propagação de infeções.

As infeções originadas por bactérias têm sido uma das principais causas de transtornos de saúde ao longo da história humana. Após o desenvolvimento de antibióticos, surgiu uma

crença geral que estaria resolvido o problema das infecções bacterianas. Contudo, os agentes patogênicos evoluíram sofisticados mecanismos de resistência aos antibióticos. Devido à sua elevada capacidade de adquirir resistência a antibióticos, torna-se cada vez mais difícil arranjar soluções que destruam as bactérias e neutralizem o problema das infecções na população humana. Como resultado, a resistência antimicrobiana emergiu como uma das mais graves ameaças à saúde, solicitando esforços generalizados para desenvolver novos antibacterianos [6].

Um problema de longa data no atendimento ao paciente é a capacidade das bactérias, incluindo *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), para formar biofilmes em dispositivos implantados e residentes. Estas infecções localizadas podem ser difíceis de detectar com a microbiologia clínica de rotina e, muitas vezes, não se conseguem resolver com antibioterapia agressiva [7]. A infecção hospitalar mais comum é causada por *P. aeruginosa* e ocorre através da contaminação de cateteres e ventiladores levando a infecções nosocomiais (como pneumonia), infecções do trato urinário, feridas de queimaduras infectadas e bacteremia, especialmente em pacientes com diabetes ou imunodeficiência [8].

Por outro lado, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), desde a sua descoberta pelo Dr. Alexander Ogston em 1880, tem sido reconhecida como um microorganismo versátil. *S. aureus* pode colonizar o corpo humano como parte da flora natural, sendo por outro lado também a principal causa de infecções bacterianas associadas ao meio hospitalar, relacionando-se com numerosas infecções leves de pele e tecidos moles, bem como pneumonia grave, bacteremia, osteomielite, endocardite, septicemia e síndrome de choque tóxico [9]. *Staphylococcus aureus* é portanto capaz de causar infecções, pela formação de biofilme, em superfícies naturais do corpo e dispositivos médicos [10]. A crescente prevalência de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e a sua capacidade para resistir a combinações múltiplas de antibióticos têm representado um sério desafio para o controlo dessas infecções [11].

Atualmente, as propriedades na massa (por exemplo, mecânicas) de materiais em aplicações de saúde estão bastante otimizadas. Adicionalmente, o revestimento de materiais com filmes finos confere funções desejadas de superfície sem afetar propriedades mecânicas do material. Desta forma, os revestimentos antibacterianos tornaram-se um campo de pesquisa muito ativo, fortemente estimulado pela crescente urgência de identificar alternativas à administração tradicional de antibióticos [12]. A avançada tecnologia de revestimento e a capacidade de produzir materiais projetados para implantes, adesivos, revestimentos, embalagens e sistemas de entrega de fármacos estão a criar uma ampla variedade de inovações importantes para uma série de aplicações biotecnológicas, como o revestimento antifúngico, mas também o revestimento antibacteriano [13].

1.3. Objetivo da dissertação

Nesta dissertação existem duas componentes exploradas. Uma componente teórica onde é abordado o estado da arte relativo aos revestimentos antimicrobianos e uma prática onde houve a otimização e produção de um revestimento com propriedades antimicrobianas à base de cobre imobilizado em nanofibras de policaprolactona (PCL). Este revestimento antimicrobiano foi obtido através da técnica de electrospinning. Após produzir o revestimento, são feitas várias análises relacionadas com a sua caracterização e com a avaliação da sua atividade antimicrobiana.

Capítulo 2 - Bactérias e a resistência a antibióticos

2. Bactérias

Os microrganismos tem uma grande capacidade de sobrevivência devido à sua estrutura simples. Uma bactéria é um organismo unicelular primitivo tendo a habilidade reproduzir tudo dentro de uma célula, crescer, usar energia e produzir resíduos. Relativamente à sua estrutura, as bactérias possuem uma parede celular dura composta por celulose capaz de fornecer suporte e proteção contra substâncias antibióticas. A sua parte externa, chamada cápsula, permite que as bactérias se coleem a outras bactérias.

Existem três formas básicas de bactérias: Coco (pequenas bolas redondas); bacilos (forma de vara); espirilo (forma espiraladas e encurvadas). Segundo as estimativas de cientistas podem existir um milhão de espécies de bactérias no mundo, contudo apenas uma pequena porção foi estudada. O seu arranjo pode ser de forma individual ou em grupo, formando pares que os cientistas denominam de diplo. Várias bactérias amarradas juntas em uma cadeia são chamadas de strepto e, quando as bactérias se aglutinam em grupos, elas são chamadas de staphylo.

O crescimento microbiano é normalmente definido como o crescimento de uma população de células de um determinado microrganismo ao longo do tempo. Este crescimento é normalmente quantificado em termos de aumento do número de células, densidade ótica da cultura ou massa celular (biomassa). A maioria das bactérias multiplica-se por fissão binária, dando uma célula origem a duas ao fim de um certo tempo [14].

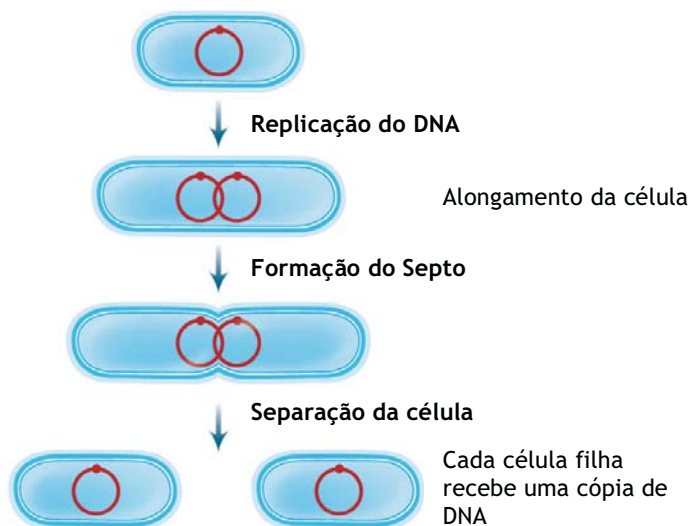


Figura 1 - Fissão Binária de uma bactéria. Adaptado de <https://knowledgeclass.blogspot.com/2015/07/amitotic-cell-division-in-prokaryotes.html>

No processo de fissão binária (Figura 1) ocorre a replicação do genoma da célula, para formar duas cópias de DNA iguais, seguindo-se o alongamento da célula. Por fim, as duas células iguais de DNA são separadas formando duas células-filha idênticas.

Muitos são os organismos bacterianos que podem causar a morte dos seus hospedeiros, contudo a grande maioria das bactérias desempenha um papel vital no ecossistema da Terra. Existe apenas uma quantidade limitada de materiais capaz de sustentar todas as formas vivas, de tal maneira que esses elementos como o oxigénio, carbono, hidrogénio, azoto, fósforo, entre outros, precisam ser reciclados. Desta forma, estes microrganismos são os principais agentes capazes de reconstruir compostos químicos para uso animal e vegetal [14].

2.1. Bactérias Gram positivas e Gram negativas

A classificação das bactérias abrange uma variedade de diferentes funções. As bactérias podem ser agrupadas consoante sistemas de classificação que utilizam a morfologia bacteriana e propriedades de coloração do organismo, bem como através da necessidade de crescimento de O₂ das espécies combinado com uma variedade de testes bioquímicos [14].

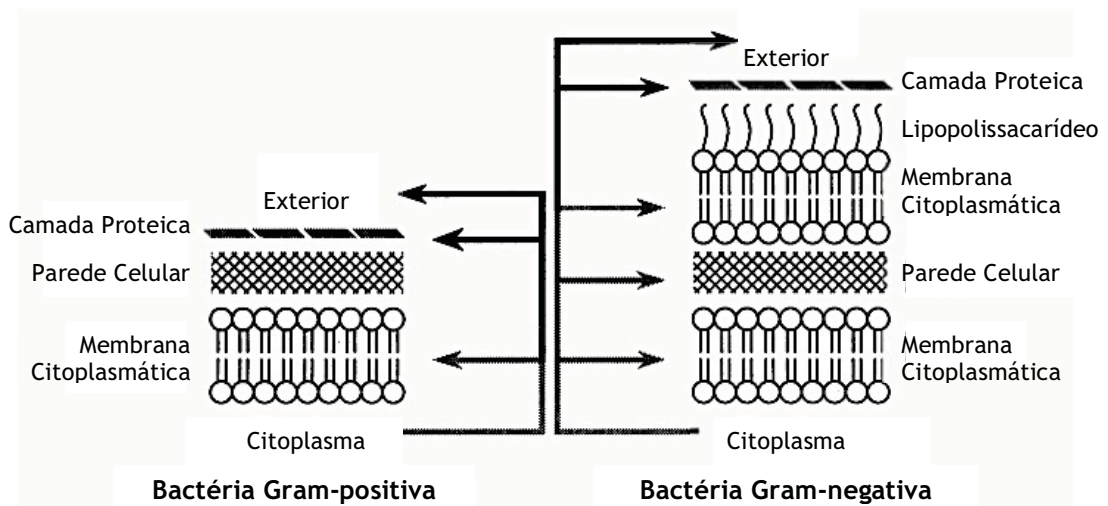


Figura 2 - Esquematização a) Bactéria Gram-positiva b) Gram-negativa. Adaptado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC372901/>

Em 1884, Hans Cristian Gram desenvolveu um método de coloração capaz de distinguir células com parede celular Gram-positivas das com parede celular Gram-negativas (Figura 2) com base na sua morfologia e propriedades de coloração diferenciais. Inicialmente, esta técnica de coloração usa os corantes violeta de cristal e o mordente no peptidoglicano.

Isso confere aos organismos gram-positivos uma cor violeta quando vistos sob um microscópio. O método de coloração utiliza ainda uma descoloração (álcool) que em seguida é contrastado com o corante Safranina de modo que os organismos Gram-negativos percam o violeta de cristal e corem de vermelho. Embora os organismos Gram-negativos tenham uma membrana externa, eles possuem uma camada de peptidoglicano mais fina que não retém o corante violeta de cristal, daí perderem a coloração azul durante o processo de descoloração [14].

As Gram negativas são constituídas por uma camada de peptidoglicanos pequena e uma membrana citoplasmática exterior. Esta membrana, exclusiva das Gram negativas, funciona como uma barreira de permeabilidade adicional e opera em mecanismos de transporte. Estas formam um grupo importante de agentes patogénicos que afetam uma ampla gama de hospedeiros. Devido à sua membrana lipídica externa, este grupo de bactérias torna-se um desafio especial ao sistema imunológico, pois a sua membrana lipídica externa torna estes patogénicos resistentes à ação das lisozimas. A dupla camada de peptidoglicanos internos (PGN) e os lipopolissacarídeos externos (LPS) permitem às bactérias Gram negativas protegerem-se contra ataques ambientais e do hospedeiro. A parede celular deste tipo de bactérias gera produtos de decomposição reconhecidos como padrões moleculares associados a microrganismos (MAMPs) que são detetados por receptores de reconhecimento de padrões por parte do hospedeiro (PRRs). Este reconhecimento provoca uma resposta imune. Contudo, certas bactérias desenvolveram mecanismos de evasão para se camuflarem [15].

2.2. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus são bactérias Gram-positivas que estão amplamente distribuídas no ambiente, podem residir na pele e nas superfícies mucosas de humanos e animais. O género *Staphylococcus* contém pelo menos 49 espécies, algumas das quais são importantes para a indústria alimentar, agricultura e economia [16]. Contudo, de todas as espécies *Staphylococcus*, a mais patogénica é *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), sendo considerada como uma das principais preocupações, tanto na área clínica como na comunidade [16-17].

A presença da bactéria *S. aureus* é frequente no corpo humano. Mesmo os indivíduos saudáveis são ocasionalmente colonizados por *S. aureus*, sendo os locais mais comuns a garganta e o nariz. Contudo, é também possível encontrar a bactéria, com menor frequência, em locais como o períneo, reto, axilas e genitais [17].

S. aureus é um agente patogénico oportunista excepcionalmente bem adaptável, que pode sobreviver sob diferentes condições, sem requisitos nutricionais ou ambientais específicos. Este microrganismo é capaz de suportar vários meses em itens e superfícies e é capaz de causar uma grande variedade de doenças em humanos e animais. Ao longo dos anos, as infeções derivadas a *S. aureus* aumentaram muito, sendo uma das principais causas de infeções bacterianas humanas em todo o mundo [16]. Após a introdução da penicilina no

mercado, a alta taxa de mortalidade da doença invasiva provocada por *S.aureus* diminuiu causando um grande impacto no tratamento destas infecções [17]. Contudo, logo após a introdução da penicilina e do seu amplo uso como agente terapêutico, *S. aureus* tornou-se resistente à mesma através da produção da β -lactamase (penicilinase, uma enzima que destrói o anel β -lactâmico da penicilina) [18]. A meticilina, uma penicilina semi-sintética, foi então introduzida em 1959 devido à crescente prevalência de estirpes produtoras de penicilinase de *S. aureus*. Em pouco tempo, surgiram estirpes de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) e tornaram-se importantes agentes etiológicos de infecção não só do ponto de vista interno (hospitalar) mas também fora dos cuidados de saúde (associado à comunidade) e até mesmo numa grande diversidade de animais [17-16]. A β -lactamase e a proteína de ligação à penicilina (PBP) são os principais motivadores da resistência aos antibióticos β -lactâmicos em *S. aureus* [17].

S. aureus possui várias características, entre as quais mecanismos de quorum sensing e fatores de virulência (Tabela 1), que permitem desencadear uma ampla gama de doenças. Esta bactéria produz uma vasta diversidade de exoproteínas (como hemolisinas, nucleases, proteases, lipases, hialuronidase e colagenase) que conferem a capacidade de colonizar tecidos hospedeiros e também produz outras exoproteínas que contribuem para a capacidade de causar doenças e inibir as respostas imunes do hospedeiro. Os genes que codificam esses fatores de virulência são regulados de maneira coordenada, revelando a estratégia deste agente patogénico em inicialmente se estabelecer no hospedeiro e, posteriormente, causar a doença [16]. O principal mecanismo de virulência de *S.aureus* detetado é o sistema regulador do gene acessório sensível a quórum (agr) que controla a expressão de modulinas solúveis em fenol (PSMs) contra as células imunes, como os queratinócitos (KCs) [19-20]. Após a ativação do loco agr é induzida a expressão de uma ampla gama de fatores de virulência, incluindo toxinas e enzimas que são importantes para a adaptação do patógeno ao meio ambiente [19].

Como resultado da sua virulência, a *S.aureus* é capaz de causar uma ampla gama de infecções em seres humanos, incluindo foliculite, furunculose, furúnculos, impetigo, celulite, septicemia, abscessos profundos, pneumonia necrosante, osteomielite, endocardite infecciosa, infecções do trato urinário, infecções do sistema nervoso central, síndrome de choque tóxico e até intoxicação alimentar [16].

2.3. *Pseudomonas aeruginosa*

O género *Pseudomonas* foi descrito no final do século XIX, quando as descrições dos géneros, aceite pelos taxonomistas microbianos, foram baseadas nas morfologias macro e microscópicas [20]. A *Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo Gram-negativo, não fermentador, conhecido como uma das principais causas de infecções nosocomiais, com morbidade e mortalidade severas [21]. O género *Pseudomonas*, é o melhor estudado e distinguido pela sua

capacidade de colonizar uma grande variedade de nichos de diversos habitats e pela grande capacidade metabólica [22].

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) é um dos patógenos humanos oportunistas mais preocupantes, listado em 2017 como primeira prioridade, de acordo com a World Health Organization (WHO), para a descoberta de tratamentos antibacterianos [23]. É também o agente causador de uma ampla gama de infecções graves, incluindo o trato respiratório em pacientes com fibrose cística, feridas por queimaduras ou diversas infecções em pacientes imunocomprometidos após cirurgia ou quimioterapia [24]. A patogênese de *P. aeruginosa* é caracterizada pela produção de uma ampla gama de fatores de virulência essenciais para a colonização inicial do hospedeiro e para o estabelecimento de uma infecção aguda. A resistência intrínseca a uma ampla variedade de antibióticos e a capacidade de adaptar-se a um ambiente em mudança permite que a *P. aeruginosa* estabeleça infecções agudas e crônicas [25].

Apesar do tratamento com antibióticos apropriados, a mortalidade permanece tão alta como nas infecções agudas, sendo relatados cada vez mais isolados resistentes a múltiplos antibióticos. *P. aeruginosa* tem um grande arsenal de fatores de virulência secretados que dependem de sistemas especializados de exportação, incluindo os tipos I, II, III, V e os sistemas de secreção tipo VI recentemente descobertos [25]. Estes fatores de virulência incluem enzimas, tais como proteases e elastases e pigmentos fenazinas, tais como piocianina e ramolipidos. Um sistema de secreção de bastante importância é o tipo III que permite a injeção de proteínas efetoras diretamente no citoplasma das células do hospedeiro [26]. Foram identificadas quatro proteínas efetoras: ExoS e ExoT, que são enzimas bifuncionais com atividades de proteína ativadora de GTPase e ADP ribosilase (que causam ruptura do citoesqueleto da célula hospedeira) e ExoU (uma citotoxina com atividade de fosfolipase) e ExoY (uma adenilato ciclase). As diferentes combinações destas proteínas têm efeitos profundos e muitas vezes devastadores na função da barreira epitelial e na cicatrização de feridas. Também se pensa que interferem no funcionamento dos macrófagos e neutrófilos [27].

P. aeruginosa é naturalmente resistente a vários tipos de antibióticos devido à barreira que apresenta para além da membrana celular - membrana externa (ME). *P. aeruginosa* possui uma grande facilidade em trocar material genético (ADN) entre estirpes da mesma espécie e mesmo entre espécies diferentes. Quando sofrem uma alteração genética como mutação ou adquirem material genético que lhes confere resistência a um antibiótico, posteriormente compartilham o seu ADN com outras estirpes de bactérias, sendo que a estirpe secundária pode tornar-se resistente ao mesmo antibiótico [28].

A capacidade de *P. aeruginosa* para formar biofilme é importante para persistir em nichos ambientais, como tubos e torneiras. Ao crescer como uma massa complexa de células ligadas a uma superfície, as células de *P. aeruginosa* podem ser significativamente mais resistentes a biocidas do que quando estão num estado planctónico (flutuante livre). Este facto deve ter consequências proeminentes para os regimes de limpeza hospitalar [28].

2.4. Resistência bacteriana aos antibióticos

Antes da descoberta do primeiro antibiótico o objetivo por parte de muitos cientistas seria encontrar uma maneira de matar uma célula bacteriana sem prejudicar as células humanas. Desta forma, em 1910, Paul Ehrlich, um cientista alemão, descobriu que um composto de arsénico matava uma bactéria em forma de espiral responsável pela sífilis. A sua descoberta foi inspirada no trabalho de Robert Koch que utilizou tintura de anilina para manchar as células bacterianas, tornando-as mais visíveis sob um microscópio [14].

Os antibióticos são produtos químicos que reagem com outros produtos químicos. As membranas das células são cobertas por receptores que permitem a esta reagir ou absorver outros produtos químicos. De forma geral, para um antibiótico funcionar, este deve ter a composição correta para ser compatível com os receptores da bactéria. Cada tipo de antibiótico ataca uma bactéria de maneira diferente impedindo a ligação do mesmo a outras células do corpo humano de forma a não provocar efeitos colaterais [14].

Atualmente, existe um uso excessivo e indevido de antibióticos, proveniente da falta de controlo nas vendas e fabricação. Para além de serem usados como medicação para humanos, são também amplamente usados na criação de animais (Figura 3). Consequentemente, muitos dos antibióticos são lançados involuntariamente no meio ambiente representando uma grande ameaça aos ecossistemas e à saúde humana [29].

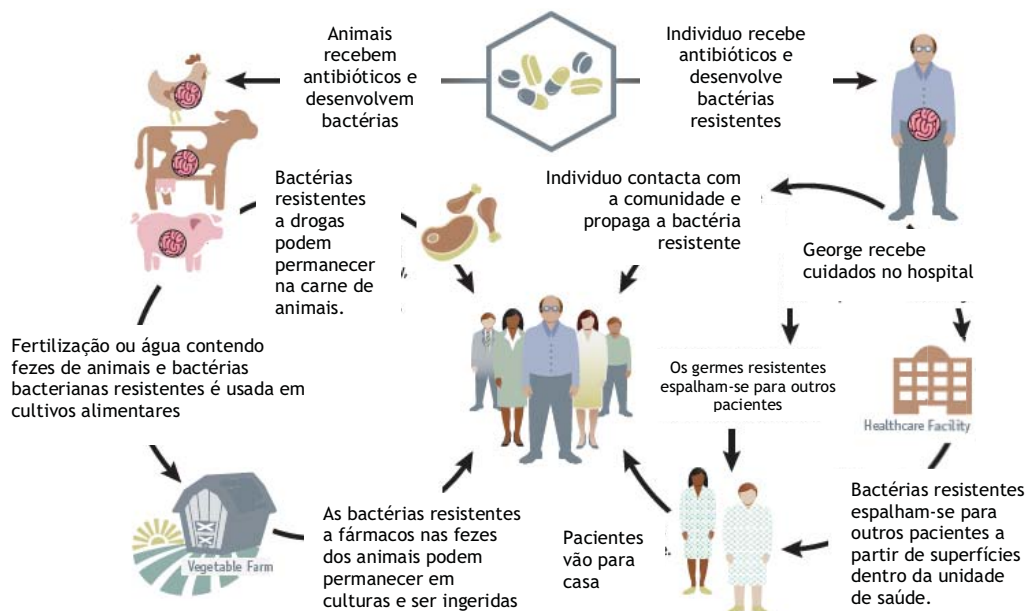


Figura 3 - Exemplo da propagação de bactérias resistentes a antibióticos. Adaptado de: Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013.

Infelizmente, há uma grande facilidade nas formas de resistência a antibióticos cruzarem fronteiras internacionais e espalharem-se entre os continentes a uma velocidade notável [30], sendo este um problema crescente, responsável por mais de 700.000 mortes em todo o mundo. Todos estes consumos abusivos diminuem a eficácia dos antibióticos e por isso, existe uma imensa procura de novas combinações por parte das indústrias farmacêuticas e por isso, há uma necessidade urgente em adquirir conhecimento sobre os mecanismos subjacentes à origem da resistência para poder retardar a sua evolução [31].

Existe uma grande variedade de antibióticos com funções diferentes. Cada tipo de antibiótico ataca uma bactéria de maneira diferente. Alguns impedem que as bactérias formem uma parede celular (antibióticos β -lactâmicos), outros interferem na capacidade da bactéria produzir nutrientes essenciais (antibióticos aminoglicosídeos), como o ácido fólico e outras proteínas, enquanto outros param a replicação do DNA da bactéria [14]. Contudo, as bactérias têm uma capacidade incrível de desenvolver resistência aos antibióticos e, por isso, a Organização Mundial de Saúde (OMS) afirma que um dos maiores desafios para a saúde humana neste século é a resistência a antibióticos bacterianos, devido ao aumento das taxas de hospitalização e mortalidade de pacientes infetados com bactérias clinicamente resistentes a antibióticos em todo o mundo [32].

2.4.1. Inibição da síntese da parede celular

Os antibióticos que interferem na síntese da parede celular são classificados como β -lactâmicos e é o mecanismo mais comum e mais utilizado na atividade antibiótica no tratamento de doenças infecciosas. Estes antibióticos incluem carbapenêmicos, penicilina, monobactâmicos e cefalosporinas e todos eles têm uma estrutura de anel β -lactâmicos que inibe a função das enzimas responsável pela síntese da parede celular, a proteína de ligação à penicilina (PBP) [33].

As PBPs são enzimas necessárias para a síntese de peptidoglicanos (PG), componente essencial da parede celular. Os antibióticos β -lactâmicos ligam-se aos sítios ativos da PBP e inibe a atividade da sua transpeptidase, destruindo assim a integridade das paredes celulares, levando conseqüentemente à morte bacteriana [33].

Atualmente existem muitos mecanismos em bactérias que as tornam resistentes aos antibióticos. No caso das bactérias que produzem resistência aos antibióticos β -lactâmicos, há três mecanismos principais. O mecanismo mais comum é a produção de β lactamase, que degrada os antibióticos β -lactâmicos antes que atinjam os alvos. A degradação de β -lactâmicos pela enzima β -lactamase está amplamente presente em bactérias Gram-positivas e gram-negativas. O segundo mecanismo é modificar a proteína-alvo de ligação à PBP, levando à perda da afinidade entre os antibióticos β -lactâmicos e seus PBPs alvo. Esta é uma das principais razões que causam resistência a β -lactâmicos em bactérias Gram-positivas [33].

O terceiro mecanismo é impedir que o antibiótico β -lactâmico atinja o alvo alterando a permeabilidade da membrana externa ou aumentando a atividade da bomba de efluxo. [34]

Além disso, genes de resistência a antibióticos podem ser transmitidos entre diferentes espécies bacterianas através de transformação, transdução e conjugação. O que é mais assustador é que a disseminação do gene da β -lactamase é grandemente exacerbada pela sua integração em um elemento genético móvel, como plasmídeos ou transposon, que promove a rápida transferência de material genético entre microorganismos.

2.4.2. Inibidores da síntese de proteínas

Os aminoglicosídeos são outra classe de antibióticos clinicamente importantes para o tratamento de vários patógenos bacterianos. Estes antibióticos afetam a fidelidade da tradução na síntese de proteínas e podem também estimular a produção de radicais hidroxilo altamente deletérios. A estrutura química básica dos aminoglicosídeos é caracterizada pela presença de núcleos de um aminociclitol (estreptamina, 2-desoxistreptamina ou estreptidina) ligados a açúcares amino através de ligações glicosídicas. No entanto, outros compostos com estrutura básica diferente são também incluídos na família dos aminoglicosídeos, por exemplo, espectinomina, um aminociclitol não ligado a açúcares amino ou compostos contendo a fortamina de aminociclitol [35].

As três classes de aminoglicosídeos têm diferentes alvos de ligação no ribossoma, bem como diferentes mecanismos de ação. Os aminoglicosídeos têm como alvo a subunidade ribossômica 30S das bactérias e interferem na síntese de proteínas, enquanto que os macrolídeos, oxazolidinonas, lincosamidas e estreptograminas interferem na subunidade 50S [36].

Os aminoglicosídeos têm sido um componente importante no arsenal antibiótico devido à sua eficácia de baixo custo contra bactérias Gram-negativas e algumas bactérias Gram-positivas, à sua sinergia com outros antibióticos, bem como as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas [36]. Contudo, as bactérias desenvolveram numerosos mecanismos para resistir à ação dos aminoglicosídeos, aumentando os níveis de resistência. Entre eles está a mutação do RNAr 16S ou proteínas ribossômicas que modificam o sítio de ligação e reduzem a interação com a molécula de antibiótico, redução da permeabilidade à molécula antibiótica, ativação de bombas de efluxo e modificação enzimática do antibiótico que ocorre através da ação das enzimas fosforilases, adenilases e acetilases [35].

2.4.3. Inibição da síntese de ácidos nucleicos

Quando as quinolonas foram originalmente introduzidas, mostraram ter atividade contra um largo espectro de bactérias, incluindo tanto organismos gram negativos como gram positivos. Os alvos intracelulares das quinolonas são as topoisomerases de DNA girase e

topoisomerase IV que são necessárias para replicação, recombinação e reparo do DNA da bactéria. A girase tende a ser o alvo primário em bactérias gram-negativas, enquanto a topoisomerase IV é preferencialmente inibida pela maioria das quinolonas em organismos gram-positivos. Contudo, este tipo de antibióticos desenvolvem uma rápida resistência na medida em que a bactéria incrementa a expressão de bombas de efluxo que eliminam o antibiótico [37].

Existem quatro ações centrais que ajudarão a combater infecções mortais provocadas por bactérias, nomeadamente [80]:

- prevenir infecções e prevenir a propagação da resistência
- rastreamento de bactérias resistentes
- melhorar o uso dos antibióticos de hoje
- promover o desenvolvimento de novos antibióticos e desenvolver novos testes de diagnóstico para bactérias resistentes

De forma a melhorar a ação antimicrobiana do fármaco, estão a ser feitas pesquisas de forma a explorar o potencial de direcionamento da patogenicidade bacteriana, ou seja, a capacidade da uma bactéria causar uma infecção. A atenuação da virulência bacteriana tornará a bactéria menos capaz de estabelecer uma infecção bem-sucedida e, em consequência, será eliminada pela resposta imune do hospedeiro ou pelo antibiótico. Este tipo de fármacos ainda não chegaram a testes clínicos, mas parece ser uma estratégia promissora, uma vez que esses compostos criariam um cenário in vivo semelhante ao obtido pela vacinação com uma cepa viva atenuada. Excelentes revisões dos compostos identificados a partir de fontes naturais ou desenvolvidas sinteticamente para direcionar a virulência bacteriana foram publicados [34]

Capítulo 3 - Cobre e as suas aplicações

3.1. Cobre

O cobre (Cu) é um oligoelemento essencial na maioria dos organismos vivos e hoje são conhecidos mais de 30 tipos de proteínas contendo cobre. Exemplos proeminentes são a Lisil Oxidase, que está envolvida na ligação cruzada de colagénio e tirosinase, necessária para a síntese de melanina e dopamina β-hidroxiase, que funciona na via da catecolamina, citocromo c oxidase, o aceitador de eletrões terminal da cadeia respiratória, e o superóxido dismutase, exigido para a defesa contra danos oxidativos. Nestas enzimas, o cobre serve como doador/aceitador de eletrões alternando entre os estados redox Cu (I) e Cu (II). Outras proteínas de cobre, como a plastocianina ou azurina, atuam como transportadores de eletrões [38]. Deste modo, o cobre serve uma série de papéis importantes na saúde humana, incluindo a produção de energia em células e a manutenção de elementos essenciais e produtos químicos, como zinco, estrogénio e neurotransmissores [39].

O corpo humano tem muitos mecanismos centrados no metabolismo do cobre, que suportam papéis catalíticos e estruturais chave em proteínas e outras biomoléculas. Além disso, os mecanismos estão disponíveis para proteção contra a toxicidade do cobre nos níveis celular, tecidual e orgânico. De fato, os problemas de saúde humana relacionados ao cobre são tipicamente associados a uma deficiência em vez de toxicidade aguda ou crónica do cobre. Com respeito às propriedades antibacterianas do cobre, várias formas do metal demonstraram ser ativas contra uma série de diferentes estirpes bacterianas. O cobre zero-valente, o óxido de cobre, o cobre iónico e os complexos moleculares contendo cobre demonstraram algum grau de propriedades antibacterianas [39].

O cobre e os seus complexos foram amplamente utilizados como materiais efetivos para esterilizar líquidos, têxteis e também tecidos humanos durante séculos [40]. Algumas vantagens dos materiais de cobre, incluindo a sua atividade bactericida, eram bem conhecidas desde o tempo das civilizações antigas [41]. Desde a Era de Hipócritos (400 aC) até o presente momento, o cobre tem sido intensamente utilizado, como agente para causar a redução das populações microbianas. Estudos recentes mostraram que o cobre e as ligas de cobre têm atividade antibacteriana sobre as bactérias nocivas [3] e também inibem a adesão de bactérias, impedindo o desenvolvimento de biofilme [42].

O cobre tem a capacidade de eliminar bactérias e vírus quando usado como superfície antimicrobiana. De facto, quando o cobre entra em contato com microorganismos, este leva à distorção repentina da parede celular e destruição da membrana celular, pois os iões de Cu que têm uma forte redução podem extrair os eletrões das bactérias, fazendo com que o seu citoplasma esorra e o seu núcleo celular oxide, que mais tarde causa a morte desses organismos [43]. Para além disso, o cobre pode inibir a função das enzimas respiratórias próximas das membranas celulares, ligando-se aos seus grupos tiol [3].

Nos últimos anos, devido ao aumento da resistência das bactérias contra os antibióticos, a atividade antibacteriana de nano-estruturas e materiais ultra finos, como prata e cobre, tem assumido uma importância cada vez maior [3].

3.2. Mecanismo de ação dos agentes antimicrobianos à base de metal

O mecanismo de ação dos agentes antimicrobianos à base de metal são na maioria das vezes independentes do choque osmótico, dependendo da interferência seletiva nos processos celulares e das propriedades físico-químicas do metal e dos seus ligandos associados. Muitas descobertas nesta área sugerem que os agentes antimicrobianos à base de metal danificam e matam células microbianas induzindo stresse oxidativo, causando assim disfunção proteica ou danificando a membrana celular [44].

Os antimicrobianos à base de metal podem combinar múltiplos mecanismos de ação, que atuam em sinergia para representar um desafio potente para os microorganismos resistentes aos fármacos [44]. Por exemplo, os compostos organometálicos concebidos a partir de ciclopentadienil manganês tricarbonilo, dipicolil rênio tricarbonilo e ferroceno ou rutenoceno são potentemente activos contra *Staphylococcus aureus* Gram-positivo resistente à metilicilina (MRSA) e simultaneamente interferem com a biossíntese da parede celular, atinge a membrana citoplasmática, despolariza o potencial da membrana e induz o stresse oxidativo [45].

Vários estudos demonstraram que o cobre em nanoescala exhibe um amplo espectro de atividade antimicrobiana, inibindo o crescimento de bactérias, fungos, vírus e algas. Estudos iniciais relacionados com a ação antibacteriana das nanopartículas de cobre foram conduzidos em sistemas com nanopartículas suspensas (não incorporadas em matrizes) [5]. Esta ação tem sido associada a toxicidades múltiplas nas bactérias, como a geração de espécies reativas de oxigénio, a peroxidação lipídica, a oxidação proteica e a degradação do DNA nas células *E. coli* [46].

Contudo, as bactérias desenvolveram uma série de mecanismos para se protegerem dos efeitos tóxicos dos iões de cobre como: sequestro extracelular de iões de cobre; impermeabilidade relativa das membranas bacterianas externas e internas aos iões de cobre; proteínas de eliminação de cobre com metalotioneína no citoplasma e periplasma; e extrusão ativa de cobre pela célula. Este último parece ser o principal mecanismo de resistência ao cobre em bactérias e tem sido amplamente estudado em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas [47].

3.3. Condições para a atividade antimicrobiana do cobre

Alguns artigos recentes descrevem o cobre como um poderoso agente antimicrobiano. Os microorganismos sobrevivem apenas alguns minutos sobre superfícies de cobre. No entanto, várias condições devem ser consideradas para potenciar a propriedade antimicrobiana do cobre, nomeadamente, a temperatura e humidade, aplicação húmida ou seca, concentração de cobre, tamanho do elemento antimicrobiano, tipo de contacto, forma do cobre, método de preparação e ambiente químico [48].

3.3.1. Temperatura e humidade

Ojeil et al.[49] iniciaram testes para reconhecer a inadequação de um protocolo de teste de eficácia de superfícies antimicrobianas. Para este estudo, a atividade antimicrobiana de superfície de cobre foi testada em função da temperatura, humidade relativa e poluição ambiental, de acordo com um protocolo JIS Z 2801 modificado [49]. Este estudo mostrou que as ligas antimicrobianas de cobre foram mais eficazes a 37 ° C e a 100% de humidade relativa. É de realçar a eficácia do "contact killing" bacteriano em condições de alta temperatura e alta humidade.

3.3.2. Aplicação húmida ou seca

Elguindi et al.[50] mostraram que a bactéria *Cronobacter spp.* foi morta dentro de 10 minutos em ligas de cobre 99% em húmido, como em 1 minuto em ambiente seco [50].

Segundo outros estudos realizados, as condições secas têm uma eficácia antimicrobiana em alguns minutos, enquanto que as condições húmidas levam várias horas a atuar, o que levanta questões interessantes sobre o mecanismo de "contact killing". Estes dados são relevantes na prevenção de possíveis contaminações e na proteção do público uma vez que, as superfícies envolvidas no transporte de mão (por exemplo, alças de portas) são geralmente secas. No entanto, a maioria dos microorganismos como *Salmonella* não sobrevive ao processo de secagem, independentemente da superfície testada. Assim, é de evidenciar que a reprodutibilidade para demonstrar o mecanismo de contact killing em seco é difícil de demonstrar [48].

3.3.3. Concentração de cobre

Grande parte dos estudos mostram uma melhor eficácia antimicrobiana de cobre em condições de concentração superiores ou iguais a 55%. Sistemáticamente, os estudos usando cobre C11000 (99,9% Cu) mostram uma melhor ação antimicrobiana com uma inativação

completa dos microorganismos testados em alguns minutos. Deste modo, quanto maior a concentração de cobre, mais rápida e eficiente é a ação antimicrobiana [48].

3.3.4. Tamanho do elemento antimicrobiano

Thekkae Padil e Cernik [51] sintetizaram nanopartículas de CuO (CuO NPs) por um processo de síntese colóide-térmica para a obtenção de diferentes tamanhos de CuO NPs. O tamanho das nanopartículas de CuO revelaram um fator importante para a atividade antimicrobiana de cobre. Verificou-se que pequenas NPs de CuO (4,8 +/- 1,6 nm) apresentaram uma atividade antibacteriana significativamente melhor em estirpes bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas do que o tamanho maior de nanopartículas de CuO (7,8 +/- 2,3 nm) [51].

Applerot et al. [52], tiraram as mesmas conclusões e ressaltaram que as nanopartículas menores de CuO têm uma melhor atividade antimicrobiana devido à sua maior capacidade de penetrar nas células. No entanto, o seu tamanho nano é também responsável pela sua toxicidade [52]. O Comité Científico Europeu sobre Riscos de Saúde Emergentes e Recentemente Identificados destacou que o risco está associado principalmente à libertação de nanopartículas de CuO livres do dispositivo e à duração da sua exposição.

3.3.5. Tipo de contacto

Quando a superfície de cobre é coberta por uma camada de polímero inerte para evitar o contato direto entre a bactéria e o cobre, não existe redução na libertação de cobre iónico. Contudo, a morte bacteriana é menor. Da mesma forma, quando as bactérias são expostas a superfícies de ferro sólido, a perda de viabilidade celular é a mesma que no vidro. No entanto, a exposição dessas células ao ferro na presença de 4 mM de sulfato de cobre (CuSO₄) permitiu uma morte celular completa em 100 minutos. Estes resultados sugerem que o contato direto de bactérias com superfície de cobre causa danos significativos à membrana celular, tornando as células mais suscetíveis aos iões de cobre libertados [48].

3.3.6. Forma do cobre

Um grande número de estudos usaram cobre de várias formas para testar as potenciais melhorias das suas propriedades antimicrobianas [48]. Hans et al. [53], usando a bactéria *E. hirae*, demonstraram que as nanopartículas de CuO inibem significativamente o "contact killing" em comparação com o cobre puro. Contudo, sob condições de humidade saturada as Cu-NPs tiveram melhor atividade de "morte por contato" do que as CuO-NPs. Estes

estudos permitem afirmar que o efeito antimicrobiano do cobre está diretamente relacionado com as suas formas de oxidação. Quanto maior o estado de oxidação do cobre, maior é o seu potencial antimicrobiano [48].

3.3.7. Método de preparação

A superfície de cobre deve ser tão limpa quanto possível para evitar a criação de distúrbios dos íons de cobre libertados e para evitar potencialmente a agregação desses íons pelos contaminantes, reduzindo assim a sua eficiência antimicrobiana. Até à data, a maioria dos estudos apenas usa protocolos de acetona e etanol para limpar e desengordurar as superfícies. Deste modo, são necessários estudos adicionais para desenvolver um protocolo de limpeza sem diminuir a taxa de difusão iónica de modo a potencializar as propriedades antimicrobianas do cobre [48].

3.3.8. Ambiente químico

Os buffers (agentes tampão) desempenham um papel importante na libertação de íons de cobre no meio de cultura e, portanto, na atividade antimicrobiana de cobre. Molteni et al. [48] demonstrou, ao plaquear diluições seriadas em placas N, que a aplicação de bactérias a superfícies de cobre em tampões Tris-Cl melhorou a "morte por contato" através de uma maior liberação de íons de cobre em comparação com meio de cultura M17, água ou tampão fosfato. Deste modo, a qualidade do ambiente químico em aplicações líquidas, como a desinfecção de águas quentes para o controlo de bactérias como a *Legionella*, desempenha um papel importante [48].

3.3.9. Conclusões

Existem várias condições para promover as propriedades antimicrobianas do cobre. Assim, a alta temperatura, alta humidade, contacto de microorganismos nas superfícies, alta concentração de cobre, superfícies limpas sem diminuição da liberação iónica, cobre nano-dimensionado, contato direto entre os microorganismos e formas oxidadas de cobre, contribuem para aumentar a atividade antimicrobiana do cobre [48].

3.4. Usos propostos de cobre no hospital

Muitos são os autores que alegam que o uso de cobre como agente antimicrobiano poderia reduzir consideravelmente a biomassa ambiental e, assim, reduzir o risco de

infecções adquiridas em ambiente hospitalar. As superfícies de cobre são uma opção interessante para combater a contaminação bacteriana nos hospitais devido às suas propriedades biocidas na adesão bacteriana da maioria das estirpes bacterianas nosocomiais, em comparação com o aço inoxidável. Deste modo, uma aplicação eficaz do uso do cobre em meio hospitalar seria ao nível dos revestimentos de superfícies frequentemente manipuladas, por exemplo, alças de porta, placas de pressão, assentos de sanitários, alças de descarga, trilhos de pega, interruptores de luz, puxadores, soquetes, mesas, carrinhos de vestir, torneiras e acessórios de pia [48].

Capítulo 4 - Revestimientos Antimicrobianos

4.1 Revestimentos à base de cobre

À medida que o tamanho do material é reduzido de micrómetro para nanómetro, as propriedades resultantes podem mudar dramaticamente. Este fenómeno é observado no caso de veículos com libertação controlada de nanopartículas metálicas, que apresentam alta atividade bactericida, a qual não é observada para as mesmas partículas de tamanhos superiores. As nanopartículas metálicas podem ser combinadas com polímeros ou revestir superfícies, podendo estas aplicações ter efeitos bactericidas [43]. Na verdade, não só os agentes antimicrobianos - i. e., cobre e as suas formas têm importância, mas também a matriz polimérica desempenha um papel vital, daí ter havido a exploração de muitos polímeros como possíveis partes do nanocompósito. Geralmente, para este propósito, os polímeros devem ter as seguintes características: insolubilidade à água, tamanho de poro apropriado à aplicação específica, e não invasivo para células humanas de modo a apoiar a epitelização. Recentemente, têm sido utilizadas inúmeras metodologias para fabricação de aplicações futuristas [43].

A utilização de polímeros para desenvolver nanocompósitos com atividade antimicrobiana não fornece apenas uma função de suporte para nanopartículas, mas também pode melhorar o desempenho antibacteriano dos nanocompósitos. Esse comportamento está relacionado principalmente com três fenómenos: 1. Sinergia entre o polímero e nanopartículas de cobre que aumenta a capacidade antibacteriana do material (nanocompósito) em relação aos componentes separados [54]; 2. A capacidade dos polímeros para a libertação de iões a longo prazo, prolongando assim a atividade antibacteriana do nanocompósito [5]; 3. O efeito de aumentar a área superficial, associada à dispersão fina de nanopartículas de cobre no polímero, ao nível da atividade antibacteriana [55];

Bogdanovic *et al.* [56] relataram um efeito antibacteriano sinérgico entre o “nanomodificador” utilizado (CuNps) e o “hospedeiro” polianilina (PANI) num nanocompósito de cobre-polianilina (Cu-PANI) contra as bactérias *E. coli*, *S. aureus* e a levedura *C. Albicans*. Neste estudo, verificaram que o nanocompósito exibe maior atividade antimicrobiana do que qualquer um dos componentes separadamente [56]. Esta observação pode ser explicada pela seguinte forma: As interações físicas e os contatos eletrostáticos desempenham um papel importante na determinação da eficácia antimicrobiana do nanocompósito [5]; A PANI estabiliza a estrutura com um impedimento estérico e diminui a agregação potencial de nanopartículas de cobre entre si, garantindo uma área de contato de superfície altamente eficaz para interagir com as superfícies celulares [57]; A rede de nanofibras de PANI aumenta a área de interface entre o nanocompósito e os microorganismos patogénicos, concedendo uma interação entre as nanopartículas de cobre e os grupos funcionais das paredes celulares; E por fim, a oxidação lenta das nanopartículas de cobre resulta na libertação de iões Cu^{2+} a partir da superfície de CuO e na redução parcial desses iões Cu^+ [5].

O movimento dos iões de Cu^+ através da bicamada lipídica é favorecido energeticamente, causando danos nas células quando recolhidos [56]. Cioffi *et al.* [47] argumentou que os revestimentos poliméricos nano-estruturados são materiais extremamente

atrativos, pois são capazes de controlar a liberação de espécies de metais e possuem propriedades biostáticas que podem ser facilmente adaptadas [47].

Atualmente, existem numerosos artigos sobre o desenvolvimento de nanocompósitos de cobre. Entre as matrizes poliméricas mais utilizadas são os polímeros naturais, como celulose, quitosano e poliolefinas, como polietileno e polipropileno.

4.1.1 Quitosano

O quitosano é um derivado N-desacetilado de quitina, que é um polisacárido natural que forma os exoesqueletos de crustáceos e insetos. O quitosano tem propriedades biocompatíveis, biodegradáveis, não tóxicas, antioxidantes, antibacterianas, antifúngicas e adsorventes [5].

A presença de grupos OH e NH₂ na sua macromolécula pode formar várias ligações químicas com metais e complexos de quelatos que podem suportar a lavagem com solventes orgânicos. A capacidade do quitosano como agente quelante torna-o um material perfeito para a para constituir compósito com as nanopartículas metálicas [58].

As nanopartículas de cobre utilizadas sem quitosano mostraram extensa agregação e alto grau de polidispersão, enquanto a maior e mais estreita distribuição de tamanho de nanopartículas de cobre é obtida com quitosano. Os resultados antimicrobianos confirmam a inibição do crescimento, mesmo depois de 4 horas de contato [59]. Mallick *et al.* [60] sintetizaram nanopartículas de cobre usando iodo como agente estabilizador num polímero de quitosano. Estudos de microscopia eletrônica e citometria revelaram que o nanocompósito conseguiu ligar-se à parede celular bacteriana, causando danos irreversíveis à membrana [60].

Noutro trabalho, foram preparados filmes de compósito de nanopartículas de cobre/quitosano preparados pelo método de vazamento da solução, que mostraram atividade antimicrobiana efetiva contra *S. aureus*, demonstrando deformação e desintegração das suas paredes celulares [61]. Manikandan *et al.* [62] sintetizaram nanopartículas de cobre usando quitosano como agente de cobertura e redução. Os íões de cobre adsorvidos ao quitosano foram reduzidos recorrendo hidróxido de sódio a um pH específico para produzir um nanocompósito de CuO / quitosano aplicado em tecido de algodão pela técnica de dry cure. Este nanocompósito inibiu bactérias Gram negativas e Gram positivas, no entanto os testes de difusão de agar mostraram uma maior inibição de bactérias Gram negativas do que Gram positivas, sendo este resultado justificado pelas diferenças nas paredes celulares bacterianas [62].

4.1.2 Celulose e Algodão

A celulose é o componente esquelético mais importante da madeira. Os materiais à base de celulose são relativamente baratos, renováveis, abundantemente disponíveis em várias formas e possuem grupos hidroxilo acessíveis para modificações químicas. A celulose é amplamente utilizada em dispositivos biomédicos, têxteis e embalagens. No entanto, os materiais com base de celulose não possuem atividade antibacteriana. A preparação de compósitos híbridos à base de nanopartículas de cobre/celulose gerou um grande número de materiais com atividade antibacteriana [5].

As nanopartículas de cobre incorporadas em fibras de celulose ou de algodão já foram utilizadas para elaborar curativos para feridas. A atividade antibacteriana de celulose vegetal e bacteriana, baseada em nanocompósitos, também pode ser influenciada pela estrutura do polímero, por exemplo, a celulose vegetal apresenta maiores efeitos antibacterianos do que a celulose bacteriana. Esta última tem uma organização interna tridimensional que atua como uma gaiola de proteção para nanopartículas de cobre, o que limita a liberação de íons de cobre em comparação com a estrutura mais aberta de celulose vegetal [63].

Os hidroxilos da superfície das fibras de celulose podem ser activados quimicamente com grupos carboxílicos, obtendo-se de seguida uma ligação controlada por quelação de íons de cobre. Por fim, faz-se uma redução química com borohidreto de sódio, o que gera um revestimento nano-estruturado. Este material mostra excelentes propriedades antibacterianas contra patógenos bacterianos multirresistentes, como *Acinetobacter baumannii* [39].

Jia *et al.* [64] produziram filmes de celulose com nanopartículas de cobre incorporadas, sendo que encontraram uma atividade antibacteriana forte e eficiente contra *S.aureus* e *E.coli*, inibindo completamente a viabilidade das bactérias no espaço de 1 hora [64].

Noutro estudo realizado, S. Anita *et al.*, produziu nanopartículas de óxido de cobre microencapsuladas onde foram depositadas e distribuídas numa superfície de tecido de algodão. Os resultados mostraram que este tecido foi altamente eficaz na redução de bactérias *S. aureus* (99,99%) e *E.coli* (92,71%), demonstrando um uso potencial na fabricação de vestuário médico [65].

4.1.3 Polipropileno

O polipropileno (PP) é um polímero de poliolefina termoplástica de uso exclusivo, com aplicações em embalagens e têxteis devido à sua boa capacidade de processamento e propriedades físicas e térmicas. Essas propriedades são regidas pelo tipo e quantidade de regiões cristalinas e amorfas formadas a partir das cadeias do polímero [5].

Até à data, houve alguns estudos sobre a atividade antibacteriana dos nanocompósitos polipropileno/cobre. O foco principal desses estudos é a libertação de íons

de cobre para eliminar completamente o crescimento bacteriano em poucas horas. Quando os nanocompósitos de cobre e polipropileno foram tratados durante 3 horas por exposição com plasma de argônio e testados contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*, a atividade antibacteriana foi 400% maior do que a dos filmes não tratados [66]. Este aumento foi atribuído ao aumento do número de nanopartículas com superfícies expostas e ao aumento da rugosidade da superfície e da hidrofobicidade dos filmes. Portanto, a interação entre a superfície do nanocompósito e o patógeno promoveu efeito antibacteriano [67]. Para além disso, a atividade antibacteriana deste nanocompósito está associada à liberação de íons de cobre, que é facilitada pela incorporação de moléculas de água nas regiões amorfas do polipropileno [5].

4.1.4 Polietileno

Jeziórska *et al.* [44] prepararam sílica esférica contendo nanopartículas de cobre imobilizadas em polietileno de alta densidade. A atividade antibacteriana destes nanocompósitos contra *E. coli*, *S. aureus*, *S. typhimurium*, *P. fluorescens* e *B. cepacia* demonstraram bons níveis de atividade contra estas bactérias. Verificou-se uma redução significativa de ATP (50-90%) para os nanocompósitos com maior teor de cobre [68].

A atividade antibacteriana de nanopartículas de cobre incorporadas em matrizes de polietileno foram também avaliadas contra *L. monocytogenes*. Tamayo *et al.* [45] demonstrou que estas nanopartículas eram libertadas a partir da matriz polimérica [69].

4.2. Mecanismos de ação de nanocompósitos de polímero e cobre.

Existem várias etapas no mecanismo de ação dos nanocompósitos de polímero-cobre.

4.2.1. Libertação dos íons de cobre

De um modo geral, a eficácia antibacteriana dos nanocompósitos polímero-metal melhora com uma alta relação superfície / volume, o que aumenta o número de íons libertados das nanopartículas para o polímero. O mecanismo de corrosão de cobre em soluções aquosas e as espécies de cobre resultantes variam com o pH. Normalmente, são formadas duas espécies de cobre, Cu_2O e CuO , que se podem dissolver em íons de cobre [5]. As partículas de metal elementares requerem a presença de moléculas de água e oxigénio para libertar um pequeno número de íons, por isso, a água e o oxigénio retidos dentro do polímero são cruciais para a libertação de íons.

Algumas propriedades dos materiais como a cristalinidade e a polaridade da matriz, que constituem a barreira de difusão a moléculas de água e íons durante a sua propagação, podem também influenciar a taxa de libertação [70]. Damm et al. [71], argumenta que os íons libertados em compósitos de prata ocorrem nas margens do polímero amorfo e, portanto, diminuem com o aumento da cristalinidade. Por outro lado, a libertação de íons aumenta com a polaridade do polímero [71]. Deste modo, a natureza polar do polímero facilita a difusão de moléculas de água.

Outro fator importante é o relaxamento das cadeias do polímero que, devido à penetração de água, limita a velocidade no processo de transporte, indicando uma cinética de libertação de ordem zero se a água atuar como plasticizante para polímeros hidrofílicos, enquanto que a difusão governa a libertação de íons em polímeros hidrofóbicos. As experiências realizadas mostraram que o passo determinante da velocidade para a libertação de íons não é o controlo exercido pelos polímeros ou moléculas que penetram a água, mas sim a dissolução de íons da superfície da nanopartícula [5].

Através de uma análise de XPS (espectroscopia de fotoeletrões de raios-X) foi possível verificar que os íons de cobre libertados a partir de nanocompósitos causam a dissolução de CuO em Cu (II) solúvel, sendo que o CuO está presente na superfície de nanopartículas como um invólucro que cobre o núcleo das nanopartículas metálicas [5]. Tendo em conta que as paredes celulares das bactérias viáveis são geralmente carregadas negativamente devido à presença de um grupo funcional, como os carboxilatos presentes nas lipoproteínas, estas são primeiro atraídas pelas forças eletrostáticas exercidas pelos íons de cobre e depois imobilizadas na superfície das nanopartículas de óxido de cobre [72].

Contudo, os íons de cobre também podem dissociar-se e exercer diretamente o seu efeito antimicrobiano sobre as bactérias. Alguns íons de cobre podem entrar nas células bacterianas e ligarem-se com moléculas de DNA envolvendo-se na reticulação dentro e entre as cadeias dos ácidos nucleicos, resultando em estruturas helicoidais desorganizadas [72].

4.2.2. Libertação de nanopartículas de cobre

Os resultados mais substanciais em relação ao possível mecanismo antibacteriano associado aos nanocompósitos de cobre e polímero são relatados por Mallick et al. [60] onde foi feita uma avaliação citométrica de fluxo da viabilidade celular bacteriana em resposta a um efeito bactericida sendo revelado quatro estados de populações celulares [60]. O primeiro estado são células vivas, o segundo são células comprometidas e o terceiro e quarto estado são células mortas e lisadas. Os resultados sugerem que os nanocompósitos causam danos irreparáveis à membrana das células bacterianas. Este autor sugeriu que a carga superficial negativa das células bacterianas relacionada com a presença de grupos funcionais com cargas negativas, interage com o nanocompósito carregado positivamente, principalmente através de interações eletrostáticas. Um teste de retardamento de gel indicou a possibilidade de

ligação entre o DNA e o nanocompósito, sugerindo que os compósitos têm acesso ao ADN da célula bacteriana após a perfuração da parede celular, promovido por nanopartículas de cobre no nanocompósito [60].

Mallick et al. [60] sugeriu que as nanopartículas de Cu do compósito iodado aderem à parede celular causando vazamento de proteínas intracelulares e outras espécies, o que eventualmente causa a morte da bactéria [60].

Existem dois mecanismos de penetração de nanopartículas em células bacterianas: endocitose e difusão direta. As nanopartículas entre 10 e 100 nm geralmente atravessam a membrana por endocitose, que ocorre em três estágios: Primeiro, as partículas aderem à membrana, em seguida a membrana envolve as nanopartículas formando um complexo de partículas lipídicas e, finalmente, o complexo de partículas lipídicas separa-se da membrana. No caso das nanopartículas muito pequenas com diâmetros de apenas alguns nanômetros, a endocitose não é um meio eficaz de penetração devido à energia de adesão ser menor, que vem principalmente da interação ligando-receptor [73]. O aumento da energia de flexão e alongamento resultante da deformação da membrana não pode ser compensado e, neste caso, as nanopartículas podem ser agregadas para ser endocitadas [5].

As propriedades hidrófilicas e hidrofóbicas das nanopartículas são um fator importante para as interações com as membranas, devido à interação das nanopartículas - grupo com cabeça lipídica. Quando a interação é forte, a nanopartícula pode entrar na membrana, enquanto que as nanopartículas hidrofóbicas podem entrar na membrana, impulsionadas pela preferência da cauda hidrofóbica do lípido [5].

4.2.3. Inibição do biofilme

Entre os fatores que influenciam a adesão bacteriana da superfície e, portanto, a resposta antimicrobiana, encontramos: composição química, carga superficial, hidrofobicidade e rugosidade superficial. Dependendo da hidrofobicidade das bactérias e da superfície dos materiais, as bactérias aderem de forma diferente a substratos com propriedades superficiais modificadas [74].

A geração de um material onde os agentes ativos estão presentes na superfície de contato e não na profundidade da matriz polimérica melhora as propriedades anti-incrustantes do nanocompósito, desta forma as nanopartículas de cobre movem-se para a superfície do nanocompósito, tornando uma camada externa muito mais ativa [75].

Verificou-se ainda que a hidrofobicidade da superfície celular (CSH) desempenha um papel importante na ligação das células bacterianas à superfície. Alguns estudos avaliaram o efeito das nanopartículas de cobre na CSH de *P. aeruginosa* utilizando o teste de adesão bacteriana a hidrocarbonetos (BATH). Os resultados mostraram uma redução significativa de CSH para ~ 99%. Da mesma forma, as nanopartículas de cobre mostraram uma inibição significativa de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) que também desempenham um

papel na formação e na maturação do biofilme. Desta forma, concluiu-se que as nanopartículas de superfície reduzem significativamente a CSH, alterando a ligação das bactérias para além disso, as nanopartículas de superfície reduzem o EPS, o que também desempenha um papel na formação e maturação de um biofilme [76].

4.3. Aplicações de nanocompósitos de polímero-cobre

O grande número de polímeros utilizados para a preparação de nanocompósitos à base de cobre gera materiais com várias características que podem ser usados em várias aplicações. As propriedades antibacterianas dos nanocompósitos à base de cobre sugerem aplicações na fabricação de dispositivos médicos, indústria têxtil, embalagens de alimentos e descontaminação de águas [72].

Por exemplo, a atividade antimicrobiana das nanopartículas de CuO impregnadas em tecidos mostrou uma excelente resposta com bactérias Gram positivas e Gram negativas, demonstrando ser um uso potencial para fins nosocomiais [72]. Vários nanocompósitos baseados em tecidos de algodão e nanopartículas de cobre foram desenvolvidos para uso em vestuário médico, curativos para feridas, roupas de cama e ligaduras ativas. Um exemplo são as nanopartículas de cobre com fibras compostas de celulose de alginato-algodão que apresentaram resistência mecânica e propriedades antibacterianas adequadas sendo usadas como material de curativo [77]. Os revestimentos repelentes de água à base de nanopartículas de cobre foram testados contra bactérias Gram negativas e Gram positivas. Os revestimentos, produzidos por deposição de vapor químico assistido por aerossóis, mostraram atividade antibacteriana significativa contra ambos os tipos de bactérias após tempo de contacto de 15 a 60 min. Além disso, todos os exemplos de filmes resultam numa redução significativa na adesão celular bacteriana relacionada com a sua superhidrofobicidade [5].

Existem alguns produtos no mercado com base em materiais de cobre poliméricos. A empresa CUPRON® oferece uma variedade de produtos para aplicações médicas, industriais e militares. No campo da medicina, produtos como tecidos e não-tecidos ajudam a reduzir as infecções nosocomiais e a melhorar a cicatrização / qualidade de vida para grupos de pacientes específicos. Outros produtos, tais como lençóis para serviços hospitalares, materiais de construção, equipamentos de aquecimento e refrigeração (HVAC) e sistemas de filtração, têxteis e serviços de alimentação, uniformes industriais, roupas e calçados, embalagens, roupas militares e roupas alimentícias também estão disponíveis [5].

A Harvest SPF textile company Ltd. é especializada na fabricação de têxteis funcionais saudáveis, tem entre os seus produtos as calças antibacterianas Enerup® feitas por cobre nano e pó de prata uniformemente disposto na fibra de nylon ou poliéster, tendo uma taxa antibacteriana para *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans* que pode atingir os 99% [5].

A adição de nanopartículas de cobre em polímeros é uma maneira de lucrar com suas propriedades antimicrobianas e produzir novos materiais para aplicações em medicina, embalagens de alimentos e purificação de água, entre outros. Neste contexto, as nanopartículas de cobre emergem como uma alternativa barata para a produção de uma ampla gama de nanocompósitos de polímero com alta atividade antimicrobiana. Embora haja uma grande quantidade de investigação relacionada com o desenvolvimento de materiais misturados com nanopartículas de cobre, é necessária uma maior investigação no sentido de apoiar o desenvolvimento de novos materiais poliméricos bioativos. Estas aplicações são necessárias, particularmente para a produção de equipamentos hospitalares ou próteses que evitem, entre outras, infecções adquiridas em ambiente hospitalar [5].

4.4. Risco ambiental dos nanocompósitos de cobre-polímero

Embora os nanocompósitos à base de cobre tenham diversas aplicações, os íões de cobre e nanopartículas são também libertados para o meio ambiente. Por esta razão, é importante considerar os riscos e implicações para a Segurança Ambiental da Saúde (EHS). Alguns estudos relataram efeitos crónicos de longo prazo, bioacumulação e toxicidade em organismos não visados expostos a nanopartículas de cobre (exemplo: peixes, plantas, algas, linhas celulares de mamíferos, etc.) [5].

Segundo um estudo onde se recolheu os dados de nanoecotoxicidade das nanopartículas de CuO e ouro (Ag) para diferentes organismos, verificou-se que os valores medianos de LC50 de CuO NPs eram de 2 a 3 mg / L para crustáceos e algas e 10-100 mg / L para peixes e a maioria dos organismos estudados. Os íões de cobre resultaram em toxinas mais tóxicas do que CuO para todos os organismos (LC50: 0,024 mg / L para crustáceos e algas, 0,7 a 53 mg / L para os organismos estudados) [78].

Embora a toxicidade das nanopartículas de cobre tenha sido relatada, pouco se sabe da toxicidade de nanocompósitos à base de cobre. Em consequência, o ênfase deve ser colocado no estudo da ecotoxicidade de nanomateriais libertados a partir de nanocompósitos, com foco especial em rotas de absorção, bioacumulação, toxicidade, protocolos de teste e uma maior variedade de organismos dependendo das aplicações específicas.

Capítulo 5 - Técnica de electrospinning

5.1. Electrospinning

Na última década, a técnica de eletrospinning foi reconhecida como um método fácil para a preparação de nanofibras poliméricas na escala submicro sendo difícil de produzir usando técnicas de fibra mecânica padrão. O processo permite a fabricação de fibras de polímero contínuas a partir de uma massa fundida ou solução de polímero com diâmetro de fibra de tamanho nano a micro. A capacidade de aplicar a técnica de eletrospinning em polímeros naturais e sintéticos, misturas de polímeros, compósitos com partículas metálicas ou cerâmicas, nanocompósitos, além de obter uma maior área superficial, oferece uma ampla gama de fabricação de material e de aplicação (membranas de filtração, nanofibras catalíticas, sensores fibrosos) [15].



Figura 4 - Máquina de electrospinning Nanospider. Adaptado de: <http://www.tecnotech.it/en/nanotech.html>

O maior interesse pelo processo de eletrospinning foi mostrado no campo da engenharia de tecidos e na administração de fármacos, devido às propriedades dos polímeros naturais e biodegradáveis. Para imitar nanofibras de colagénio da matriz extracelular por biopolímeros biodegradáveis ou biocompósitos como substituto do tecido lesado, a técnica de electrospinning foi selecionada como o método de fabricação mais promissor. Muitos estudos nesse campo se concentraram na fabricação de scaffolds biocompósitos nanofibrosos com um tamanho de diâmetro de fibra uniformizados e com porosidade. Embora o eletrospinning seja um método barato e fácil para a formação de uma estrutura fibrosa, os parâmetros do processo dependem das propriedades do polímero sendo específicos para cada sistema, o que levou a inúmeras investigações nas últimas duas décadas [15].

5.2.Noções básicas de processo eletrospinning

Uma das características mais atraentes do processo de electrospinning é uma instalação simples e econômica de aparelhos que envolvem uma seringa (ponta de agulha) com bomba de alimentação, uma fonte de alimentação de alta tensão (campo elétrico) e um coletor de fibra aterrada, que geralmente é placa metálica ou mandril rotativo. A eletrocralização é conduzida à temperatura ambiente e pressão atmosférica, com configurações verticais ou horizontais [80].

O princípio básico da eletrospinning é aplicar alta tensão na solução de polímero ou massa fundida que superaria a tensão da superfície do polímero e induzir a formação do jato. O campo elétrico de ponta-coletor aplicado provoca repulsão da solução de superfície que deforma a queda esférica da solução de polímero viscoelástico na ponta da agulha em forma cônica (cone de Taylor). Quando as forças eletrostáticas da repulsão da carga superficial superam a tensão da superfície do polímero, o jato carregado ejeta do cone de Taylor e deforma-se uniaxialmente através do campo elétrico para o coletor aterrado. Simultaneamente, com o chicoteamento rápido do jato, a evaporação do solvente deixa as fibras secas para trás [80].

Acredita-se que o campo elétrico superior provoca o espalhamento do jato principal em numerosas fibras secundárias com menor diâmetro aproximadamente igual em relação ao jato principal. Devido à instabilidade do jato de polímero, a deformação depende da força do campo elétrico. Portanto, é necessário ajustar parâmetros eletrospinning para a fabricação uniforme de nanofibras [80].



Figura 5 - Ilustração da técnica de electrospinning. Adaptado de: https://www.researchgate.net/figure/Scheme-of-electrospinning-setup-Nanospider_fig6_258400484

A capacidade de aplicar a técnica de eletrospinning em polímeros naturais e sintéticos, misturas de polímeros, compósitos com partículas metálicas ou cerâmicas, nanocompósitos,

além de obter uma maior área superficial, oferece uma ampla gama de fabricação de material e de aplicação (membranas de filtração, nanofibras catalíticas, sensores fibrosos) [81].

5.2.1. Parâmetros do processo eletrospinning

O tamanho, a densidade e a morfologia das fibras electrospun dependem de vários parâmetros que podem ser classificados em [81]:

- (1) Parâmetros da solução (viscosidade, concentração, peso molecular, tensão superficial, condutividade, momento dipolo, força dielétrica).
- (2) Parâmetros de processamento (taxa de alimentação (fluxo), força do campo elétrico, distância da ponta ao coletor, forma da agulha (ponta), composição do coletor e geometria).
- (3) Parâmetros ambientais (temperatura, humidade, fluxo de ar).

Além dos parâmetros de processamento e ambiente que podem ser controlados, os parâmetros da solução são interdependentes e seu impacto na morfologia da fibra não pode ser separado individualmente [15].

Parte experimental

Estudo de um revestimento à base de cobre e sua influência no comportamento das bactérias.

1. Materiais e Métodos

1.1. Materiais

As nanofibras de policaprolactona (PCL), com massa molecular de 45000 (Sigma), foram desenvolvidas com nanopartículas de cobre de tamanho <425 µm, <75 µm e <45 µm através da técnica de electrospinning (Nanospider). A bactéria *S. aureus* foi cultivada em Nutriente Agar (NA) e Nutritive Broth (NB) a 37°C e 110 rpm, enquanto que a bactéria *P. aeruginosa* foi cultivada em agar infusão cérebro coração (BHI) e em meio líquido BHI (Sigma) a 30°C e 200 rpm.

1.2. Métodos

1.2.1. Produção das nanofibras de PCL com Cu²⁺

Foi produzido, pela técnica de electrospinning (Figuras 1 e 2), um controlo composto por uma estrutura de nanofibras de policaprolactona (PCL) e substratos de nanofibras de PCL incorporados com cobre a 0.3%, 1%, 5% e 10% (m/m) PCL-Cu-NPs. As amostras com 10% (m / m) PCL-Cu-NPs apresentaram uma coloração avermelhada mais evidente quando comparadas com 5% (m/m) PCL-Cu-NPs e controlos.

Na produção de nanofibras de PCL e cobre, foram testadas diferentes concentrações de cobre e solventes de forma a otimizar as quantidades adequadas ao objetivo pretendido. Foi otimizada uma solução polimérica de PCL, à qual foi adicionada etanol e clorofórmio. A amostra resultante desta solução serviu de controlo de maneira a ser possível a comparação de resultados.

Nas seguintes soluções, as nanofibras foram preparadas a partir de soluções poliméricas de PCL iguais à inicialmente preparada com a adição de uma quantidade variável de Cu²⁺ (Tabela 1).

No processo de electrospinning foi usada uma tensão de cerca de 82,1V e uma corrente de 0,005A.

1.2.2. Ensaio antimicrobianos

O efeito antimicrobiano das amostras têxteis funcionalizadas foi testado com base na Norma E2180 - 01 Método de Teste Padrão para Determinar a Actividade de Agente (s) Antimicrobiano Incorporado (s) em Materiais Poliméricos ou Hidrofóbicos. Este método é usado para testar quantitativamente a capacidade de redução bacteriana de um têxtil/polímero.

Neste ensaio, foram preparadas culturas puras de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* em meios de cultura sólido de Nutrient Agar e meios sólidos de agar de cérebro-coração (BHI), respetivamente. As culturas foram incubadas durante 24h a uma temperatura de 37°C, no caso da *S. aureus*, e 30°C, no caso da *P. aeruginosa*. Após o crescimento das bactérias em meio de cultura sólido, estas foram transferidas para um meio de cultura líquido sendo posteriormente postas a incubar com uma agitação de 110rpm (*S. aureus*) e 200 rpm (*P. aeruginosa*) no agitador orbital. Seguidamente, acertou se a concentração bacteriana resultante de cada meio de cultura líquido a 0,5 na escala Mc Farland, o que corresponde a 10^7 células/ml.

Tabela 1 - Constituição das amostras controlo, 5% e 10% usadas na técnica de electrospinning

Constituição	
Controlo	PCL
Amostra 1	PCL + 300mg/L Cu^{2+}
Amostra 2	PCL + 1000mg/L Cu^{2+}
Amostra 3 (5%)	PCL + 5000mg/L Cu^{2+}
Amostra 4 (10%)	PCL+10 000mg/L Cu^{2+}

No passo seguinte dos ensaios antimicrobianos foram preparadas duas lamas contendo 0,85g de cloreto de sódio; 0,3g de agar; 100ml de água destilada. Numa das lamas foi colocado 1 ml de inóculo contendo *S. aureus* e na outra 1 ml de inóculo contendo *P. aeruginosa*. Esta lama foi colocada em contacto com as amostras obtidas por electrospinning, em placas de petri. Estas amostras em contacto com a lama, foram transferidas para tubos de falcon, após 0 horas e 24 horas de contacto, contendo 20 ml de NaCl com surfactante sendo posteriormente agitados durante 20 segundos no vórtex, permitindo assim que as bactérias resistentes se destacassem da amostra. Em seguida, foram realizadas diluições 10^{-1} e 10^{-2} . No final, para cada estirpe, inocularam-se placas de petri contendo meio de cultura sólido

específico já referido para cada bactéria. As placas foram incubadas a 37°C por 24h, e o número de colónias foi contado visualmente.

1.2.3. Porosidade

A porosidade total das fibras obtidas em electrospinning foi medida usando um método de deslocamento de líquido, como descrito por Chitrattha *et al.* (2016). O etanol foi usado como líquido de deslocamento porque penetra facilmente nos poros das matrizes e não induz o encolhimento ou o inchaço das membranas. Neste procedimento, uma proveta contendo 10mL de etanol foi pesada (W1) bem como a amostra (Ws). Posteriormente, a amostra foi imersa no etanol e colocada num sonicador com água (Ultrasons-H, P-Selecta) durante 40 minutos a 30°C para auxiliar a penetração de etanol nos poros. O volume contido na proveta sonicada contendo a amostra impregnada com etanol foi reajustado para 10mL, tendo sido a proveta pesada novamente (W2). A amostra foi retirada da proveta e em seguida foi pesada a proveta sem a amostra (W3). Este processo foi feito separadamente para cada amostra sendo a porosidade (ϵ) das amostras determinada usando a seguinte equação (1):

$$\epsilon (\%) = (W2 - W3 - Ws)/(W1 - W3) \times 100\% \quad (1)$$

1.2.4. Perfil de libertação do cobre

O ensaio para obter o perfil de libertação do cobre foi realizado através da medição e comparação de uma solução de PBS (Tampão fosfato salino/meio biológico limpo) antes e após a imersão das amostras, após fazer uma recta de calibração com concentrações conhecidas de cobre. Para cada condição, as amostras foram incubadas a 37°C, com uma agitação de 110 rpm, tendo sido a absorvância lida a 570 nm.

1.2.5. Ângulo de contacto (θ)

Através da técnica do ângulo de contato foi possível averiguar a molhabilidade das superfícies das amostras e até que ponto a funcionalização com as nanopartículas de cobre influenciou o carácter hidrofóbico do PCL.

O equipamento utilizado (OCAH-200 da Dataphysics) está equipado com um sistema de vídeo de alta velocidade com câmara de vídeo CCD (res. 752x484), tendo sido a captação dos diversos ângulos de contato aos 10 segundos.

1.2.6. Energia de Superfície

A tensão superficial das amostras foi determinada utilizando o método do ângulo de contato da gota sésil à temperatura ambiente. Neste método foi utilizado um componente não polar (diiodometano) e dois solventes polares (água e etilenoglicol). Os componentes de tensão superficial são conhecidos na literatura, tendo sido a seguinte equação utilizada:

$$(1+\cos\theta) \gamma_{TOT} = 2 (\sqrt{\gamma_{sLW}} \sqrt{\gamma_{1LW}} + \sqrt{\gamma_{s+}} \sqrt{\gamma_{1-}} + \sqrt{\gamma_{s-}} \sqrt{\gamma_{1+}}) \quad (2)$$

onde θ é o ângulo de contato e $\gamma_{TOT} = \gamma_{LW} + \gamma_{AB}$. O parâmetro γ_{LW} corresponde ao componente Lifshitz-van der Waals da energia livre da superfície, e γ_{+} e γ_{-} os parâmetros do aceitador de elétrons e doador de elétrons, respectivamente, do componente ácido-base de Lewis γ_{AB} , sendo $\gamma_{AB} = 2 \sqrt{\gamma_{+} + \gamma_{-}}$.

As interações entre bactérias (2) e amostra (1) foram preditas em termos de energia de interação total $\Delta G_{Ades\tilde{a}o_{TOT}}$, que pode ser entendida como:

$$\Delta G_{Ades\tilde{a}o_{TOT}} = (\sqrt{\gamma_{2LW}} - \sqrt{\gamma_{1LW}})^2 - (\sqrt{\gamma_{2LW}} - \sqrt{\gamma_{WLW}})^2 - (\sqrt{\gamma_{1LW}} - \sqrt{\gamma_{WLW}})^2 + 2 [\sqrt{\gamma_{W+}} (\sqrt{\gamma_{2-}} + \sqrt{\gamma_{1-}} - \sqrt{\gamma_{W-}}) + \sqrt{\gamma_{W-}} (\sqrt{\gamma_{2+}} + \sqrt{\gamma_{1+}} - \sqrt{\gamma_{W+}}) - \sqrt{\gamma_{2-}} \sqrt{\gamma_{1+}} - \sqrt{\gamma_{2+}} \sqrt{\gamma_{1-}}] \quad (3)$$

Se $\Delta G_{Ades\tilde{a}o_{TOT}} < 0$, a adesão bacteriana será favorável. Por outro lado, a adesão não será favorável se $\Delta G_{Ades\tilde{a}o_{TOT}} > 0$.

2. Resultados

2.1. Produção das nanofibras de PCL e Cu^{2+}

No processo de electrospinning foram produzidas nanofibras de PCL (Figura 6) e PCL com partículas de cobre incorporado (PCL-Cu-NPs). Neste ensaio experimental, foram testadas, em separado, várias composições de cobre com diferentes tamanhos (<425 μm , <75 μm , <45 μm). Contudo, após o processo verificou-se que havia deposição das partículas de cobre de maior tamanho (<425 μm , <75 μm) no cilindro do electrospinning. Desta forma, foram abandonadas estas condições (partículas de maior tamanho), sendo apenas utilizadas as de <45 μm nos ensaios seguintes.

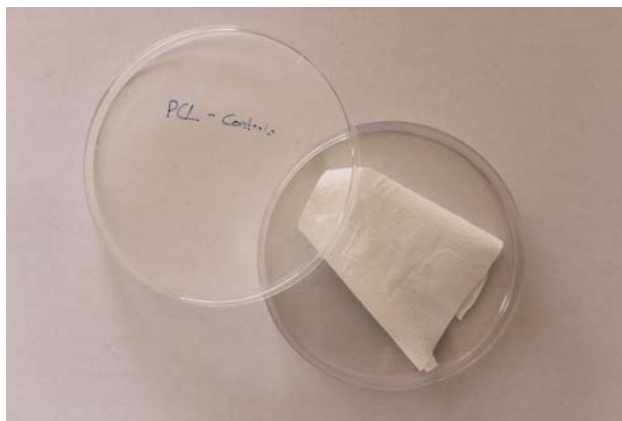


Figura 6 - Controlo PCL

Outra otimização feita neste processo foi a concentração de cobre. Inicialmente utilizou-se uma concentração de 300mg/L e 1000mg/L de Cu^{2+} (Figura 7).

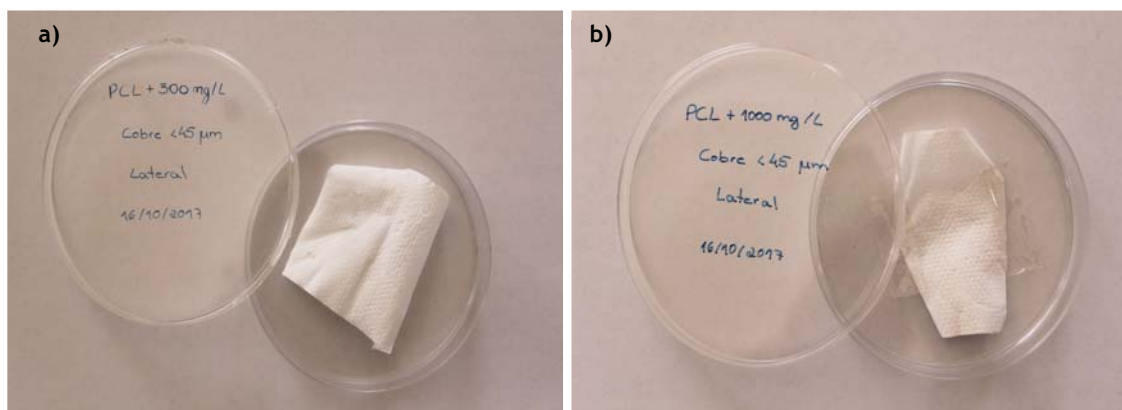


Figura 7 - Amostras de electrospinning a) PCL+300 mg/L Cu^{2+} b) PCL+1000 mg/L Cu^{2+}

Apesar das partículas não se depositarem no cilindro, a sua quantidade não era suficiente para o efeito antimicrobiano pretendido. Desta forma aumentamos a concentração de cobre para 5000mg/L e 10 000mg/L (Figura 8).

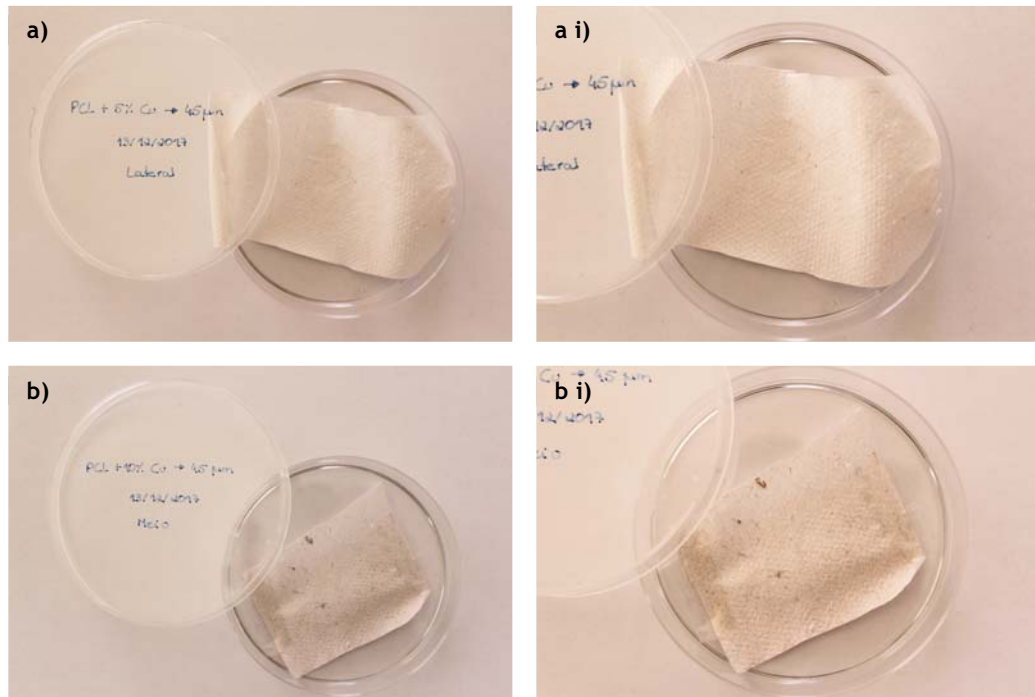


Figura 8 - Amostras de electrospinning a) 5% ; b) 10%

Através da figura 8, é possível visualizar a diferença na cor entre as amostras, sendo mais perceptível a coloração de cobre na amostra de PCL+10 000 mg/L Cu²⁺ (10%).

2.2. Ensaios antimicrobianos

Para uma avaliação quantitativa da eficácia antibacteriana de 5% e 10% de PCL-Cu-NPs, os ensaios bacterianos foram realizados em diferentes diluições e comparados com os resultados dos controlos (Figura 9). Inicialmente procedeu-se à contagem das colónias bacterianas em cada uma das diferentes diluições e no fim dos períodos de contacto de 0 horas e 24 horas foi calculada a redução bacteriana das mesmas.

A redução bacteriana para a Gram negativa *Pseudomona aeruginosa* às 0 horas foi de 44,16% e 74,21% em amostras de 5% e 10% de PCL-Cu-NPs, respectivamente. Às 24h, foram obtidas reduções de 53,85% e 94,23% para 5% e 10% PLC-Cu-Nps, respectivamente. No caso da Gram positiva *Staphylococcus aureus*, para as 0 horas foi obtida uma redução de 70,55% e 94,87% em 5% e 10% PLC-Cu-Nps, respectivamente. Às 24h obteve-se uma redução de 67% e 92,50% em 5% e 10% PLC-Cu-Nps, respectivamente.

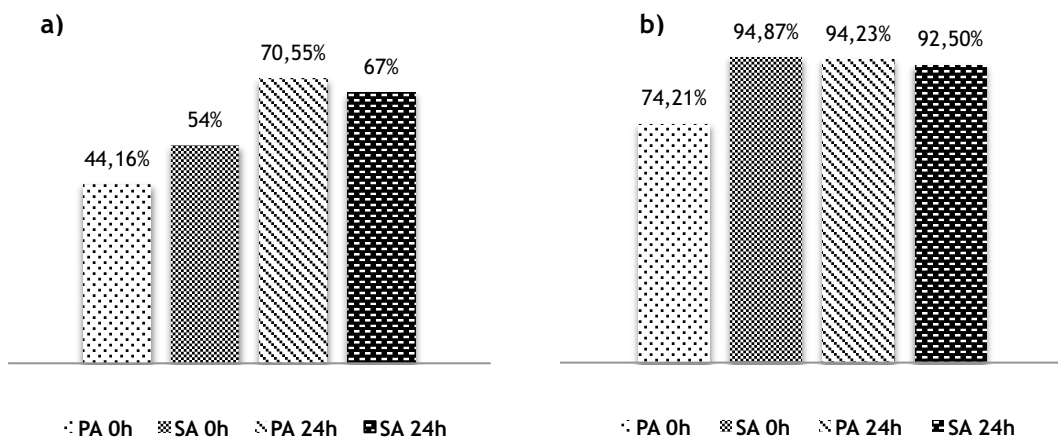


Figura 9 - Redução bacteriana das amostras de a) 5% e b) 10%

2.3. Porosidade

Seguindo a equação 1 dos métodos, obteve-se uma porosidade de 84,02% para as nanofibras controlo de PCL. No caso dos substratos com 5% e 10% de cobre, houve um aumento acentuado de 99,90% e 93,58%, respectivamente. Figura 10.

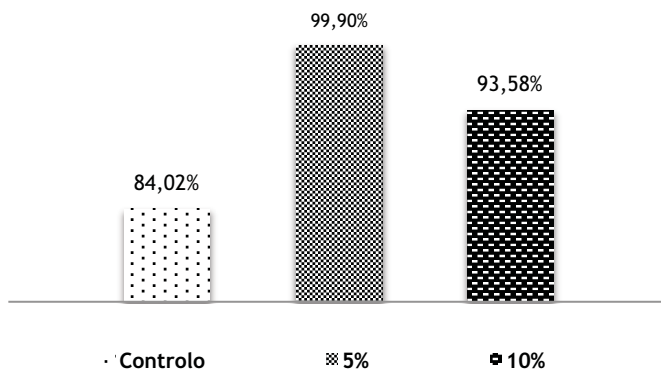


Figura 10 - Percentagem de porosidade no controlo e amostras de 5% e 10%

2.4. Perfil de libertação do cobre

Os resultados dos perfis de libertação do cobre em 5 e 10% de amostras de PCL-Cu-NPs são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Perfil de libertação do cobre

Tempo (h)	5% PCL-Cu-NPs (%)	10% PCL-Cu-NPs (%)
0	0,95	0,95
2	1,80	11,30
4	11,78	31,25
6	56,48	65,53
24	82,70	96,38
48	93,60	96,64

Verificou-se que a libertação do cobre foi óptima para a amostra 10% de PCL-Cu-NPs às 24 horas, ou seja, 96.38%, em comparação com 82.70% de 5% PCL-Cu-NPs. Para o tempo de contacto de 0 horas, tanto 5% de PCL-Cu-NPs como 10% de PCL-Cu-NPs apresentaram valores semelhantes de libertação - 0.95%.

2.5. Ângulo de Contacto

A molhabilidade dos substratos foi avaliada medindo o ângulo de contato entre a superfície e a água aos 10 segundos. A incorporação de nanopartículas de Cu a 5% influenciou o carácter hidrofóbico do PCL, que tornou a superfície hidrofílica com um ângulo de contato de $28,63^\circ \pm 2,1$. No caso de 10% de PCL-Cu-NPs 10% Cu, obteve-se uma superfície intermediária com maior ângulo de contato de $64,06 \pm 13,82^\circ$.

2.6. Energia de superfície

Os resultados da energia livre de adesão em 5 e 10% de amostras de PCL-Cu-NPs para bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa* são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Energia de superfície das amostras controlo, 5% e 10% em *S. aureus* e *P. aeruginosa*

	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	$\Delta G_{\text{Adesão}}^{\text{TOT}}$	$\Delta G_{\text{Adesão}}^{\text{TOT}}$
Controlo	19,994	23,769
5% PCL-Cu-NPs	29,194	42,022
10% PCL-Cu-NPs	17,266	-0,876

Através da resolução da equação 3, verifica-se que há maior tendência para adesão entre *P. aeruginosa* e 10% PCL-Cu-NPs (-0.876) e *S. aureus* e 10% PCL-Cu-NPs (17.266), pois apresenta um valor negativo e o valor mais próximo de zero respectivamente. Verifica-se que existe menor tendência de adesão entre *P. aeruginosa* e 5% PCL-Cu-NPs (42,002) pois apresenta um valor positivo bastante distante de zero.

2.7. Microscopia electrónica de varrimento (SEM)

A Figura 11 mostra imagens representativas de nanofibras do controlo, 5% e 10% de PCL-Cu-NPs. O controlo apresenta nanofibras homogéneas e lisas. Na amostra de 5% de PCL-Cu-NPs observam-se algumas nanofibras agregadas, com presença pouco visível de nanopartículas de cobre. Na amostra de 10%, é possível observar nitidamente as nanopartículas de cobre parcialmente incorporadas nas nanofibras.

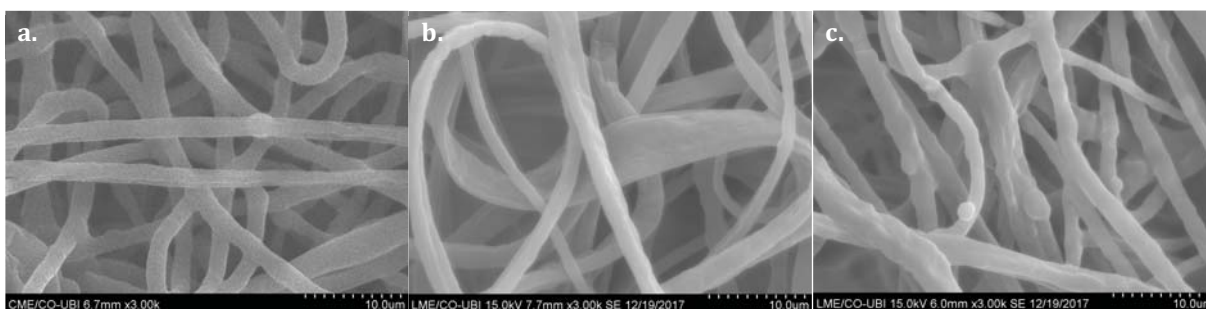


Figura 11 - Imagem de nanofibras observadas através de SEM a) Controlo; b) 5% e c) 10%

Segundo [82], as nanopartículas com diâmetro superior ao da secção transversal das nanofibras não se incorporam totalmente no interior das mesmas, ficando alguma da sua superfície exposta. Por outro lado, as nanopartículas com tamanho inferior ao da secção transversal das nanofibras, tendem a ficar encapsuladas no seu interior.

3. Discussão

Das diferentes bactérias adquiridas em ambiente hospitalar, *S. aureus* e *P. aeruginosa* destacam-se como altamente perigosas para os pacientes, sendo as principais responsáveis pela transmissão de infecções. O surgimento da resistência bacteriana aos antibióticos é desde há uns anos um problema crescente, responsável por mais de 700.000 mortes em todo o mundo [82] agravando ainda mais o problema da contracção de infecções hospitalares.

Neste trabalho, foi desenvolvida uma estratégia de incorporação “na massa” de nanopartículas de cobre com vários diâmetros em nanofibras de polycaprolactona (PCL) produzidas pelo processo de electrospinning.

Os ensaios antimicrobianos mostraram uma evidente redução microbiana para ambas as bactérias. Observou-se maior efeito antibacteriano quando se utilizou a concentração mais alta de cobre (10%), ou seja, reduções bacterianas de 94,23% e 92,50% para *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente às 0h e 24h. Ao analisarmos os valores dos ensaios antimicrobianos verificamos que na concentração de 5% há maior redução bacteriana nas 24h (70,55% e 67%) comparado às 0h (44,16% e 54%) evidenciando o efeito antimicrobiano ao longo do tempo. No entanto, em 10% a percentagem de redução bacteriana isso não acontece uma vez que ao comparar as 24h (94,23% e 92,50%) com as 0h (74,21% e 94,87%) verificamos que o efeito antimicrobiano em *S.aureus* é o contrário. As nanofibras de PCL não só serviram suporte para as nanopartículas de cobre, mas também melhoraram o desempenho antibacteriano dos nanocompósitos, de tal forma que houve uma libertação sustentada e controlada de cobre ao longo do tempo, estendendo a atividade antibacteriana por quase 48 horas (93,60 para 5% e 96,64 para 10%). Verificou-se que a libertação do cobre foi óptima para a amostra 10% de PCL-Cu-NPs às 24 horas, ou seja, 96.38%, em comparação com 82.70% de 5% PCL-Cu-NPs. Para o tempo de contacto de 0 horas, tanto 5% de PCL-Cu-NPs como 10% de PCL-Cu-NPs apresentaram valores semelhantes de libertação - 0.95%. O mecanismo pelo qual a morte microbiana ocorre em superfícies de cobre é chamado de morte por contacto. Existem diferenças entre a exposição de bactérias a concentrações sub-óptimas de iões de cobre e a exposição através do contacto com superfícies metálicas de cobre. Verifica-se que durante o crescimento, em meios contendo iões de cobre, há exposição crónica que não promove a eliminação de bactérias. Por outro lado, quando há exposição bacteriana a iões de cobre altamente concentrados, as bactérias são efetivamente eliminadas [83] Para além disso, a porosidade alcançada na amostra de 10%, PCL-Cu-NPs - 93,58% - quando comparada a de controlo - 84,02% - permite que ~10% de área de superfície seja maior que a de 5% PCL-Cu-NPs, o que exhibe uma maior exposição de iões de cobre que estão disponíveis para ligar e eliminar as bactérias.

As nanofibras produzidas pelo processo de electrospinning, proporcionaram uma maior área de contacto para a exposição de agentes antimicrobianos. Através de imagens de

SEM (Figura 10) pode-se observar que as amostras obtidas consistem em nanofibras bem definidas, cujo diâmetro não foi afetado pelo aumento da percentagem de cobre. Particularmente na de 10% (m / m) foram observadas nanopartículas de cobre PCL-Cu-NPs, cujo diâmetro foi maior que o diâmetro médio das nanofibras, tornando-se parcialmente incorporadas na estrutura nanofibrosa, o que é vantajoso para o contato de cobre-bactéria.

A energia livre de superfície, que está relacionada com molhabilidade da mesma, é uma medida útil que tem influência e permite prever a interação biológica superfície-superfície [84]. Está descrito que superfícies antibacterianas hidrofílicas apresentam melhor comportamento antibacteriano [85], uma vez que são fundamentais para a adsorção de proteínas e, conseqüentemente, para a adesão bacteriana. Pelo contrário, superfícies com baixa molhabilidade retardam as interações primárias com o biosistema aquoso. No presente trabalho, a estratégia utilizada aumentou a hidrofiliçidade das nanofibras de PCL, de $109,9 \pm 5,0$ para $28,63 \pm 2,1$ no caso de 5% PCL-Cu-NPs e para $64,06 \pm 13,82$ ° para 10% PCL-Cu-NPs. A energia livre de superfície forneceu uma previsão teórica de maior ligação bacteriana às nanofibras quando a superfície apresenta nanopartículas de cobre expostas, maior afinidade nas amostras de 10% de de PCL-Cu-NPs e em bactérias gram-negativas do que com bactérias gram-positivas. Alguns autores sugeriram que o cobre apresenta maior efeito antibacteriano em bactérias gram-negativas do que em bactérias gram-positivas, como consequência das interações entre a membrana externa gram-negativa e a interface de nanopartículas metálicas [86]. Essas interações promovem a formação de poros irregulares, devido à interação direta das nanopartículas libertadas ou dos iões metálicos com a membrana externa, ou seja, grupos sulfidrílo, amino e hidroxilo, alterando assim a sua permeabilidade e causando a libertação de conteúdo celular, o que resulta na morte bacteriana [84]. Estes valores contribuíram para a compreensão e interpretação dos fenómenos interfaciais influenciados pelos componentes de Lifshitz-van der Waals da energia livre de superfície, incluindo adesão e forças de superfície, e pode explicar o facto da quantidade de adesão de *S. aureus* e *P. aeruginosa* ao filme de NP-Cu-PC ser maior, mas levar a uma maior mortalidade devido aos efeitos bactericidas do cobre.

Conclusão e perspectivas futuras

As superfícies de cobre são uma ferramenta adicional promissora a par de outras medidas higiénicas para reduzir o número e a gravidade das infecções adquiridas em ambiente hospitalar. São, portanto, essenciais estudos adicionais para determinar a maneira mais económica de oferecer proteção máxima nos hospitais.

Nesta dissertação torna-se notório que o cobre tem a capacidade de eliminar bactérias quando usado como superfície antimicrobiana. Quando entra em contato com os microorganismos, leva à distorção repentina da parede celular e destruição da membrana celular, pois os iões de cobre têm uma forte redução e podem extrair os eletrões das bactérias, fazendo com que o seu citoplasma se comprometa e o seu núcleo oxide, o que mais tarde causa a morte desses organismos. Para além disso, pode inibir a função das enzimas respiratórias próximas nas membranas celulares, ligando-se aos seus grupos tiol.

Neste projeto verificou-se que as nanopartículas de cobre incorporadas “na massa” do polímero de policaprolactona antes de ser electrofiada, eram maiores que o diâmetro médio das nanofibras, contudo, tornaram-se parcialmente incorporados na própria nanofibra. Após a sua aplicação, o cobre disseminou-se ao longo da superfície. A maior concentração de cobre 10% (m / m) PCL-Cu-NPs exerceu um efeito antimicrobiano rápido e melhor sobre *S. aureus* e *P. aeruginosa* do que uma concentração sub-ótima de 5% (m / m) PCL-Cu-NPs. Para além disso, a sua libertação controlada atingiu um pico ótimo no período de 24 horas de atividade bactericida.

As diferentes ligas de cobre devem ser testadas não só pela sua eficácia, mas também pelo seu apelo estético. As propriedades antimicrobianas das superfícies de cobre devem ser integradas com outros métodos de desinfecção. Medidas adicionais, como a adição de agentes eliminantes de esporos a soluções de limpeza, também merecem uma investigação mais aprofundada.

Em suma, as superfícies à base de cobre são ferramentas promissoras, na medida em que podem revestir móveis e dispositivos em uso para uma unidade de saúde, conferindo-lhes as funções antimicrobianas desejadas, juntamente com outras medidas higiénicas para reduzir o número e a gravidade das infecções hospitalares.

Referências

- [1] P. Airey, J. Verran. Potential use of copper as a hygienic surface; problems associated with cumulative soiling and cleaning. *Journal of Hospital Infection* **67** (2007), 271-277.
- [2] John M. Boycea. Environmental contamination makes an important contribution to hospital infection. *Journal of Hospital Infection*, **65(S2)**, (2007), 50-54
- [3] O. Sharifahmadian, H.R. Salimijazi, M.H. Fathi, J. Mostaghimi, L. Pershin. Relationship between surface properties and antibacterial behavior of wire arc spray copper coatings. *Surface & Coatings Technology*. **233**, (2013), 74-79.
- [4] S. L. Warnes, V. Caves, C. W. Keevil. Mechanism of copper surface toxicity in *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* involves immediate membrane depolarization followed by slower rate of DNA destruction which differs from that observed for Gram-positive bacteria. *Environmental Microbiology*, **14(7)**, (2012), 1730-1743.
- [5] Laura Tamayo, Manuel Azócar, Marcelo Kogan, Ana Riveros, Maritza Páez. Copper-polymer nanocomposites: An excellent and cost-effective biocide for use on antibacterial surfaces. *Materials Science and Engineering C*, **69** (2016), 1391-1409.
- [6] Kaźmierczak , Z., Górski, A. and Dąbrowska K., Facing Antibiotic Resistance: Staphylococcus aureus Phages as a Medical Tool, Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences, 2014.
- [7] Lawrence R. Mulcahy & Vincent M. Isabella & Kim Lewis. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms in Disease. *Microb Ecol* (2013)
- [8] Karumidze, N., Thomas, J. A., Kvatadze, N., Goderdzishvili M., Hakala, K. W., Weintraub, S. T., Alavidze, Z. and Hardies, S.C., Characterization of lytic *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages via biological properties and genomic sequences, Institute of Bacteriophages, Microbiology and Virology, Tbilisi, Georgia, 2012.
- [9] Qing Rao, Weilong Shang, Xiaomei Hu and Xiancai Rao. *Staphylococcus aureus* ST121: a globally disseminated hypervirulent clone. *Journal of Medical Microbiology*. **64** (2015): 1462-1473

- [10] Marta Michalska-Sionkowska, Maciej Walczak, Alina Sionkowska. Antimicrobial activity of collagen material with thymol addition for potential application as wound dressing. *Polymer Testing* **63** (2017): 360-366.
- [11] Chasin M, Langer R. Biodegradable polymers as drug delivery systems. *Drugs and the pharmaceutical sciences*. New York: Marcel Dekker; **45** (1990): 71-120.
- [12] M. Cloutier, D. Mantovani, F. Rosei. Antibacterial Coatings: Challenges, Perspectives, and Opportunities. *Trends in Biotechnology*, **33** (2015), 11.
- [13] Nicola Cioffi, Luisa Torsi, Nicoletta Ditaranto, Giuseppina Tantillo, Lina Ghibelli, Luigia Sabbatini, Teresa Bleve-Zacheo, Maria D'Alessio, P. Giorgio Zambonin, Enrico Traversa. Copper Nanoparticle/Polymer Composites with Antifungal and Bacteriostatic Properties. *Chem. Mater.* **17** (2005), 5255-5262.
- [14] Peggy Thomas. *Bacteria and Viruses*. 2004 by Lucent Books ®. Lucent Books ® is an imprint of Thomson Gale, a part of the Thomson Corporation.
- [15] Gonzalez M.R., Ducret V., Leoni S., Perron K. *Pseudomonas aeruginosa* zinc homeostasis: Key issues for an opportunistic pathogen. *BBA - Gene Regulatory Mechanisms* (2018).
- [16] Baptista I, Rocha S.M, Cunha A., Saraiva J. A., Almeida A. Inactivation of *Staphylococcus aureus* by high pressure processing: An overview. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **36** (2016): 128-149
- [17] Li Y., Yang L., Fu J., Yan M., Chen D., Zhang L. Microbial pathogenicity and virulence mediated by integrons on Gram-positive microorganisms. *Microbial Pathogenesis*, **111** (2017): 481-486
- [18] G. Yu, W. Wen, B. M. Peters, J. Liu, C. Ye, Y. Che, J. Liu, K. Cao, Ph.D, Z. Xu, Ph.D, M. E. Shirtliff, First report of novel genetic array *aacA4-bla(IMP-25)-oxa30-catB3* and identification of novel metallo-beta-lactamase gene *bla(IMP25)*: a Retrospective Study of antibiotic resistance surveillance on *Pseudomonas aeruginosa* in Guangzhou of South China, 2003-2007, *Microbial Pathogenesis*. **95** (2016): 62-67.
- [19] Nakagawa S., Matsumoto M., Katayama Y., Oguma R., Wakabayashi S., Nygaard T., Saijo S., Inohara N. *Staphylococcus aureus* virulent PSM α peptides induce keratinocyte alarmin release to orchestrate IL-17-dependent skin inflammation. *Cell Host Microbe* **22** (2017): 667-677.
- [20] Peixa A., Ramírez-Bahenac M., Velázquez E. The current status on the taxonomy of

Pseudomonas revisited: An update *Infection. Genetics and Evolution* **57** (2018): 106-116.

[21] He J., Jia X., Yang S., Xu X., Sun K., Li C., Yang T., Zhang L. Heteroresistance to carbapenems in invasive *Pseudomonas aeruginosa* infections *International Journal of Antimicrobial Agents*. **51** (2018): 413-421.

[22] Chevaliera S., Bouffartiguesa E., Bazireb A., Tahriouia A., Duchesnea R., Tortuela D., Maillota O., Clamensa T., Orangea N., Feuilloleya M.G.J., Lesouhaitiera O., Dufourb A., Cornelisa P. Extracytoplasmic function sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *BBA - Gene Regulatory Mechanisms* (2018).

[23] WHO-Publication-list, Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics, http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25FebET_NM_WHO.pdf?ua=1 , (2017).

[24] K.G. Kerr , A.M. Snelling. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *Journal of Hospital Infection* **73** (2009), 338-344.

[25] Gonzalez M.R., Ducret V., Leoni S., Perron K. *Pseudomonas aeruginosa* zinc homeostasis: Key issues for an opportunistic pathogen. *BBA - Gene Regulatory Mechanisms* (2018).

[26] Kerr K.G., Snelling A.M.. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *Journal of Hospital Infection* **73** (2009): 338-344

[27] Tart AH, Wozniak DJ. Shifting paradigms in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm research. *Curr Top Microbiol Immunol*, **322** (2008):193-206.

[28]Smith K, Hunter IS. Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates. *J Med Microbiol*, **57** (2008): 966-973.

[29] U.S.Department of Health and Human Service. Antibiotic resistance threats in the United States. Centers for Disease Control and Prevention (2013). Acesso a 30/09/2018 : <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>

[30] Bos J., Austin R. H. A bacterial antibiotic resistance accelerator and applications. *Methods in Cell Biology*, **147** (2018): 41-57.

[31] Zhanga J, Lia W., Chena J., Qia W., Wanga F., Zhoua Y. Impact of biofilm formation and detachment on the transmission of bacterial antibiotic resistance in drinking water

distribution systems. *Chemosphere*, **203** (2018): 268-380.

[32] Yanga Y., Songc W., Lind H., Wanga W., Due L., Xinga W. Antibiotics and antibiotic resistance genes in global lakes: A review and meta-analysis. *Environment International* **116** (2018): 60-73.

[33] Lia L., Gea H., Gua D., Menga H., Lia Y., Jiaa M., Zhenga C., Zhoua X. The role of two-component regulatory system in β -lactam antibiotics resistance. *Microbiological Research*, **215** (2018): 126-129.

[34] González-Bello. Antibiotic adjuvants - A strategy to unlock bacterial resistance to antibiotics. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **27** (2017): 4221-4228.

[35] Ramirez M.S. , Nikolaidis N., Tolmasky M.E. Rise and dissemination of aminoglycoside resistance: the aac(6')-Ib paradigma. *Frontiers in Microbiology | Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy*, **4** (2013), Article121.

[36] KunShi, Caldwell S.J., Fong D, Berghuis A., Prospects for circumventing aminoglycosidekinase mediated antibiotic resistance. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **3** (2013).

[37] Drlica K., Malik M., Kerns R.J., Zhao X., Quinolone-Mediated Bacterial Death. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **52** (2008) 385-392.

[38] N. Cioffi, L. Torsi, N. Ditaranto, L. Sabbatini, P.G. Zambonin, G. Tantillo, L. Ghibelli, Antifungal activity of polymer based copper nanocomposites coatings, *Applied Physics Letters*, **85** (2004) 2417-2419

[39] N.C. Cady, J.L. Behnke, A.D. Strickland, Copper-based nanostructured coatings on natural cellulose: nanocomposites exhibiting rapid and efficient inhibition of a multi-drug resistant wound pathogen, *A. baumannii*, and mammalian cell biocompatibility in vitro, *Adv. Funct. Mater.* **21** (2011) 2506-2514.

[40] Gadi Borkow, Jeffrey Gabbay Putting copper into action: copper-impregnated products with potent biocidal activities. *The FASEB Journal*. **3** (2009), 272.

[41] O. Akhavan, E. Ghaderi. Cu and CuO nanoparticles immobilized by silica thin films as antibacterial materials and photocatalysts. *Surface & Coatings Technology*, **205** (2010), 219-223.

- [42] Limei Chen, Lin Zheng, Yaohui Lv, Hong Liu, Guancong Wang, Na Ren, Duo Liu, Jiyang Wang, Robert I. Boughton. Chemical assembly of silver nanoparticles on stainless steel for antimicrobial applications. *Surface & Coatings Technology*. **204** (2010), 3871-3875.
- [43] Faheem A. Sheikha, Muzafar A. Kanjwalb, Saurabh Saranc, Wook-Jin Chungc, Hern Kim. Polyurethane nanofibers containing copper nanoparticles as future materials. *Applied Surface Science* **257** (2011): 3020-3026.
- [44] Alaa S. Abd-El-Aziz, Christian Agatemor, Nola Etkin. Antimicrobial Resistance Challenged with Metal-based Antimicrobial Macromolecules. *Biomaterials* **118** (2017): 27-50.
- [45] Gregor Grass, Christopher Rensing, Marc Solioz. Metallic Copper as an Antimicrobial Surface. *Applied and Environmental Microbiology*, **77** (2011): 1541-1547.
- [46] A.K. Chatterjee, R. Chakraborty, T. Basu, Mechanism of bacterial activity of copper nanoparticles, *Nanotechnology* **25** (2014) (135101-13513).
- [47] M. Wenzel, M. Patra, C.H.R. Senges, I. Ott, J.J. Stepanek, A. Pinto, P. Prochnow, C. Vuong, S. Langklotz, N. Metzler-Nolte, J.E. Bandow, Analysis of the mechanism of action of potent antibacterial hetero-tri-organometallic compounds: a structurally new class of antibiotics. *ACS Chem. Biol.* **8** (2013): 1442-1450.
- [48] M. Vincent, P. Hartemann, M.E. Deutsch, Antimicrobial applications of copper. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, **219** (2016) 585-591
- [49] Ojeil, M., Jermann, C., Holah, J., et al., 2013. Evaluation of new in vitro efficacy test for antimicrobial surface activity reflecting UK hospital conditions. *J. Hosp. Infect.* **85** (4), 274-281.
- [50] Elguindi, J., Alwathnani, H.A., Rensing, C., 2012. Rapid inactivation of *Cronobacter sakazakii* on copper alloys following periods of desiccation stress. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **28** (4), 1837-1841.
- [51] Thekkae Padil, V.V., Cernik, M., 2013. Green synthesis of copper oxide nanoparticles using gum karaya as a biotemplate and their antibacterial application. *Int. J. Nanomed.* **8**, 889-898.
- [52] Applerot, G., Lellouche, J., Lipovsky, A., et al., 2012. Understanding the antibacterial mechanism of CuO nanoparticles: revealing the route of induced oxidative stress. *Small* **8** (21), 3326-3337.

- [53] Hans, M., Erbe, A., Mathews, S., et al., 2013. Role of copper oxides in contact killing of bacteria. *Langmuir* **29** (52), 16160-16166.
- [54] U. Bogdanovic, V. Vodnik, M. Mitric, S. Dimitrijevic, S.D. Skapin, V. Zunic, M. Budimir, M. Stoiljkovic, Nanomaterial with high antimicrobial efficacy-copper/ polyaniline nanocomposite, *Appl. Mater. Interfaces* **7** (2015) 1955-1966.
- [55] D.N. Bikiaris, K.S. Triantafyllidis, HDPE/Cu-nanofiber nanocomposites with enhanced antibacterial and oxygen barrier properties appropriate for food packaging applications, *Mater. Lett.* **93** (2013) 1-4.
- [56] U. Bogdanovic, V. Vodnik, M. Mitric, S. Dimitrijevic, S.D. Skapin, V. Zunic, M. Budimir, M. Stoiljkovic, Nanomaterial with high antimicrobial efficacy-copper/ polyaniline nanocomposite. *Applied Materials Interfaces* **7** (2015): 1955-1966.
- [57] A. Kramer, I. Schwebke, G. Kampf, How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review, *BMC Infect. Dis.* **6** (2006) 130
- [58] R.A.A. Muzarelli, Potential of chitin/chitosan-bearing materials for uranium recovery: an interdisciplinary review, *Carbohydrate Polymers*, **84** (2011) 53-63.
- [59] A. Ancona, M.C. Sportelli, A. Trapani, R.A. Picca, C. Palazzo, E. Bonerba, F.P. Mezzapesa, G. Tantillo, G. Trapani, N. Cioffi, Synthesis and Characterization of hybrid copper-chitosan nano-antimicrobials by femtosecond laser ablation in liquids, *Mater. Lett.* **136** (2014) 397-400.
- [60] S. Mallick, S. Sharma, M. Banerjee, S.S. Ghosh, A. Chattopadhyay, A. Paul, Iodine-stabilized Cu nanoparticle chitosan composite for antibacterial applications, *Appl. Mater. Interfaces* **4** (2012) 1313-1323.
- [61] G. Cárdenas, J. Diaz, M.F. Meléndrez, C. Cruzat, A. García, Colloidal Cu nanoparticles/ chitosan composite film obtained by microwave heating for food package applications, *Polym. Bull.* **62** (2009) 511-524.
- [62] A. Manikandan, M. Sathiyabama, Green synthesis of copper chitosan nanoparticles and study of its antibacterial activity, *Nanomed. Nanotechnol.* **6** (2015) 1-5.
- [63] R.J.B. Pinto, S. Daina, P. Sadocco, C.P. Neto, T. Trindade, Antibacterial activity of nanocomposites of copper and cellulose. *Biomed Research International*, *Biomed. Res. Int.*

(2013) 1-6.

[64] B. Jia, Y. Mei, L. Cheng, J. Zhou, L. Zhang, Preparation of copper nanoparticles coated cellulose films with antibacterial properties through one step reduction, *Appl. Mater. Interfaces* **4** (2012) 2897-2902.

[65] S. Anita, T. Ramachandran, R. Rajendran, C.V. Koushik, M. Mahalakshmi, A study of the antimicrobial property of encapsulated copper oxide nanoparticles on cotton fabric, *Text. Res. Jl.* **81** (2011) 1081-1088.

[66] B.L. España-Sanchez, C.A. Avila-Orta, F. Padilla-Vaca, M.G. Neira-Velazquez, P. Gonzalez-Morones, J.A. Rodriguez-Gonzalez, E. Hernandez-Hernandez, A. Rangel- Serrano, E.D. Barriga-C, L. Yate, R.F. Ziolo, Enhanced antibacterial activity of melt processed polypropylene Ag and Cu nanocomposites by argon plasma treatment, *Plasma Process. Polym.* **11** (2014) 353-365.

[67] K. Delgado, R. Quijada, R. Palma, H. Palza, Polypropylene with embedded copper metal or copper oxide nanoparticles as a novel plastic antimicrobial agent, *Lett. Appl. Microbiol.* **53** (2011) 50-54.

[68] R. Jeziorska, M. Zielecka, B. Gutarowska, Z. Zakowska, High density polyethylene composites filled with nanosilica containing immobilized nanosilver or nanocopper: thermal, mechanical, and bactericidal properties and morphology and interphase characterization, *Int. J. Polym. Sci.* (2014) 1-13.

[69] L.A. Tamayo, P.A. Zapata, N.D. Vejar, M.I. Azócar, M.A. Gulppi, X. Zhou, G.E. Thompson, F.M. Rabagliati, M.A. Pérez, Release of silver and copper nanoparticles from polyethylene nanocomposites and their penetration into *Listeria monocytogenes*, *Mater. Sci. Eng. C* **40** (2014) 24-31.

[70] H. Palza, R. Quijada, K. Delgado, Antimicrobial polymer composite with copper micro- and nanoparticles: effect of particle size and polymer matrix, *J. Bioact. Compat. Polym.* **30** (2015) 366-380.

[71] C. Damm, H. Munstedt, A. Rosch, The antimicrobial efficacy of polyamide 6/silvernano- and microcomposites, *Mater. Chem. Phys.* **108** (2008) 61-66.

[72] V.V. Anusha Thampi, S. Thanka Rajan, K. Anupriya, B. Subramanian, Functionalization of fabrics with PES/CuO nanoparticles by precipitation route for anti-bacterial applications, *J. Nanopart. Res.* **17** (2015) 57.

- [73] H.Y. An, R.J. Friedman, Concise review of mechanism of bacterial adhesion to biomaterials surface, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **43** (1998) 338-348.
- [74] I. Armentano, C.R. Arciola, E. Fortunati, D. Ferrari, S. Mattioli, C.F. Amoroso, J. Rizzo, J.M. Kenny, M. Imbriani, L. Visai, The interaction of bacteria with engineered nanostructured polymeric materials: a review, *Sci. World J.* **1** (2014), ID 410423.
- [75] J. Chapman, L. Le Nor, R. Brown, E. Kitteringham, S. Russell, T. Sullivan, F. Regan, Antifouling performance of macro to micro to nano-copper materials for the inhibition of biofouling in its early stages, *J. Mater. Chem. B*, **1** (2013) 6194-6200.
- [76] F. LewisOscar, D. MubarakAli, C. Nithya, R. Priyanka, V. Gopinath, N.S. Alharbi, N. Thajuddin, One pot synthesis and anti-biofilm potential of copper nanoparticles (CuNPs) against clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *Biofouling* **31** (2015) 379-391.
- [77] G. Mary, N. Chand, S.K. Bajpai, Copper alginate-cotton cellulose (CACC) fibers with excellent antibacterial properties, *J. Eng. Fibers Fabr.* **4** (2009) 24-35.
- [78] K. Juganson, A. Ivask, K. Kasemets, M. Mortimer, A. Kahru, Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: a critical review Olesja Bondarenko. *Arch Toxicol* **87** (2013): 1181-1200.
- [79] Jasovsky, D., Littmann, J., Zorzet, A., Cars, O. Antimicrobial resistance—A threat to the world's sustainable development. *Upsala Journal of Medical Sciences* **121** (3) (2016): 159-164.
- [80] Tong, H. W., Wang, M., Li, Z. Y., and Lu, W. W. Electrospinning, characterization and in vitro biological evaluation of nanocomposite fibers containing carbonated hydroxyapatite nanoparticles, *Biomed Mater*, **5** (2010) 054111.
- [81] Anamarija Rogina. Electrospinning process: Versatile preparation method for biodegradable and natural polymers and biocomposite systems applied in tissue engineering and drug delivery. *Applied Surface Science*. **296** (2014) 221-230.
- [82] Maria Ann Woodruff, Dietmar Werner Hutmacher. The return of a forgotten polymer Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science* **35** (2010) 1217-1256.
- [83] Turner R.J. Metal - based antimicrobial strategies. *Microbial Biotechnology*. **2017**;10(5):1062-1065.

[84] Y. Dong, X. Li, L. Tian, T. Bell, R.L. Sammons, H. Dong, *Acta Biomater.* Towards long-lasting antibacterial stainless steel surfaces by combining double glow plasma silvering with active screen plasma nitriding. *Acta Biomaterialia* 7 (2011) 447-457.

[85] Nogueira F and Gouveia I. Amino Acid-Based Material for the Complementary Therapy of Decubitus Ulcers *J. Microbiol. Biotechnol.* (2017), 27(4), 747-758.

[86] Ricardo J. B. Pinto, Sara Daina, Patrizia Sadocco, Carlos Pascoal Neto, Tito Trindade. Antibacterial Activity of Nanocomposites of Copper and Cellulose. *BioMed Research International*. 2013, Article ID 280512, 6 pages