

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL - UCS**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, INOVAÇÃO E DESENVOLVIMENTO**  
**TECNOLÓGICO**  
**COORDENADORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTU SENSU***  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS**  
**MATERIAIS**

**GABRIEL JUSTEN DAPPER**

**Desenvolvimento de um dispositivo inovador de simulação dinâmica do sistema respiratório para avaliação de um TNT revestido com filme de Cu**

**Caxias do Sul - RS**

**2022**

GABRIEL JUSTEN DAPPER

**Desenvolvimento de um dispositivo inovador de simulação dinâmica do sistema respiratório para avaliação de um TNT revestido com filme de Cu**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência dos Materiais, pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais da Universidade de Caxias do Sul - UCS

Orientador: Prof. Dr. Cesar Aguzzoli

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos A. Figueroa

Caxias do Sul - RS

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Universidade de Caxias do Sul  
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

D212d Dapper, Gabriel Justen

Desenvolvimento de um dispositivo inovador de simulação dinâmica do sistema respiratório para avaliação de um TNT revestido com filme de Cu [recurso eletrônico] / Gabriel Justen Dapper. – 2022.

Dados eletrônicos.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais, 2022.

Orientação: Cesar Aguzzoli.

Coorientação: Carlos Alejandro Figueroa.

Modo de acesso: World Wide Web

Disponível em: <https://repositorio.ucs.br>

1. Aparelho respiratório - Proteção. 2. Máscara. 3. Agentes anti-infecciosos. 4. Tecidos. 5. Cobre. I. Aguzzoli, Cesar, orient. II. Figueroa, Carlos Alejandro, coorient. III. Título.

CDU 2. ed.: 614.894

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)  
Carolina Machado Quadros - CRB 10/2236

GABRIEL JUSTEN DAPPER

---

**Desenvolvimento de um dispositivo inovador de simulação dinâmica do sistema respiratório para avaliação de um TNT revestido com filme de Cu**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência dos Materiais, pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais da Universidade de Caxias do Sul - UCS

---

**Banca Examinadora:**

Prof. Dr. Cesar Aguzzoli (Orientador)

Universidade de Caxias do Sul

Prof. Dr. Carlos A. Figueroa (Co-orientador)

Universidade de Caxias do Sul

Prof. Dr. Alexandre Fassini Michels

Universidade de Caxias do Sul

Prof. Dr. Everton Granemann Souza

Universidade Católica de Pelotas

Profa. Dra. Mariana Roesch Ely

Universidade de Caxias do Sul

Caxias do Sul - RS

2022

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por conceder a força, dedicação e o conhecimento necessários para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a minha namorada Ágatha por me apoiar, me dar forças e me incentivar constantemente ao longo desta jornada. Com certeza seu suporte foi de fundamental importância para construção e finalização deste trabalho.

Agradeço a meus pais, Marli e Clóvis, pelos sábios conselhos oferecidos a mim ao longo de toda minha trajetória pessoal, acadêmica e profissional até então. Vocês têm grande responsabilidade pelas minhas conquistas pois me ensinaram a nunca desistir e sempre correr atrás dos meus objetivos.

Agradeço ao Prof. Dr. Cesar Aguzzoli, meu orientador, pelo conhecimento, contribuição, confiança e impecável orientação oferecidos ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Carlos A. Figueroa, meu co-orientador, pelas importantes contribuições oferecidas para construção deste trabalho.

Um muito obrigado aos colaboradores deste trabalho, Dra. Mariana Roesch-Ely, Dra. Rafael Frassini, Wellington Vieira de Souza e Fábio Guimarães de Sousa. Agradeço a todos os professores e funcionários do PPGMAT que contribuíram direta ou indiretamente com a construção deste trabalho. Agradeço também a banca avaliadora pelas ricas contribuições oferecidas a este trabalho.

Agradeço as empresas Zegla Indústria de Máquinas para Bebidas e Robopac Brasil pela disponibilização de ferramentaria e maquinário para fabricação de peças e componentes utilizados. Agradeço também a empresa Non Woven Plastic LTDA pela doação do TNT utilizado como substrato neste trabalho.

*“Life is like riding a bicycle. To keep  
your balance, you must keep moving.”*

(Albert Einstein)

## RESUMO

Máscaras de proteção facial atuam como primeira linha de defesa contra patógenos existentes e que podem surgir com o passar do tempo, sendo sua importância comprovada durante a recente pandemia de COVID-19. É de fundamental importância o desenvolvimento e validação de materiais funcionais para aplicação nestes equipamentos que contribuem diretamente na redução do inóculo de agentes bacterianos e virais e conseqüentemente, na atenuação dos sintomas de inúmeras doenças. Desenvolveu-se neste trabalho um dispositivo de teste inovador para avaliação de tecidos de forma dinâmica, que permite análise de respirabilidade, avaliação de lixiviação de filmes, simulação de inoculação de bactérias e vírus através de aerossóis e simulação de respiração de um usuário. Também foi possível avaliar as propriedades morfológicas, físico-químicas e de desempenho biológico de um tecido não tecido (TNT) de polipropileno  $(C_3H_6)_n$  revestido com filme de cobre (Cu). Foram depositadas diferentes concentrações de Cu pelo processo de magnetron sputtering. Pelas técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV/FEG) e de espectroscopia de dispersão em energia (EDS) observou-se que o filme de Cu foi depositado de forma uniforme e, que a concentração é proporcional ao tempo de exposição ao alvo de deposição. Avaliou-se a atividade citotóxica do compósito obtido pelo método indireto de MTT frente aos fibroblastos de camundongo L929, para os quais, as amostras com baixa concentração de Cu não apresentaram efeito citotóxico. Uma vez que a concentração de Cu aumentou quatro vezes mais do que o menor tempo de exposição, as amostras mantiveram a viabilidade celular em níveis aceitáveis. Avaliou-se a atividade antimicrobiana do compósito obtido pelo procedimento AATCC TM 147 e pela técnica de resazurina para as cepas *Escherichia coli* AATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* AATCC 25923, para as quais, observou-se atividade antimicrobiana significativa para as espécies com concentrações elevadas de Cu. Por meio do dispositivo de teste construído, concluiu-se que: o coeficiente de permeabilidade do TNT equivale a  $71,4 \text{ Pa}\cdot\text{cm}^{-2}$  e não há lixiviação do Cu depositado do TNT. Também foi analisada a atividade antibacteriana do tecido com a concentração máxima de Cu frente a cepa *E. coli* em condições dinâmicas. A condição dinâmica adotada para o teste consiste em: pulsos alternados de pressão e alívio gerados pelo equipamento conduzem o aerossol bacteriano através do tecido em teste, simulando a inoculação por um usuário.

**Palavras-chave:** Avaliação dinâmica de tecidos funcionais. Deposição de cobre em não tecidos. Citotoxicidade. Atividade antimicrobiana. Dispositivo simulador de respiração.

## ABSTRACT

Protective face masks act as the first defense line against pathogens that already exist and those that may emerge over the time, their importance has been proven during the recent COVID-19 pandemic. The development and validation of functional materials for application in these equipment is very important, since they contribute directly to the bacterial and viral inoculum reduction, consequently, in the symptoms attenuation of numerous diseases. An innovative test equipment for dynamically evaluating fabrics was developed in this work, which allows breathability analysis, film leaching evaluation, bacteria and viruses inoculation simulation through aerosols and simulation of a user's breathing. It was also possible to evaluate the morphological, physical-chemical and biological performance properties of a polypropylene (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>)<sub>n</sub> nonwoven fabric coated with copper (Cu) film. Different concentrations of Cu were deposited by the magnetron sputtering process. By scanning electron microscopy (SEM/FEG) and energy dispersion spectroscopy (EDS) techniques, it was observed that the Cu film was uniformly deposited, and the concentration is directly proportional to the target exposure time. It was possible to evaluate the cytotoxic activity of the obtained composite by the MTT indirect method using the L929 mouse fibroblasts, which showed no cytotoxic effects at low Cu concentration. Once Cu concentration increased in a fold of four times higher than the lower exposition time, samples maintained cell viability at acceptable levels. The antimicrobial activity of the obtained composite was evaluated by AATCC TM 147 procedure and by the resazurin technique for strains *Escherichia coli* AATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* AATCC 25923, for which, results of expressive antimicrobial activity were obtained for samples with high Cu concentrations. Through the fabricated test equipment, it was concluded that: the TNT permeability coefficient is equivalent to 71,4 Pa.cm<sup>-2</sup> and there is no leaching of the deposited Cu film of the nonwoven. It was possible to evaluate the antimicrobial activity of the nonwoven with the maximum Cu concentration against the *E. coli* bacteria under dynamic conditions. The dynamic condition adopted for the test consists of: alternating pulses of pressure and relief generated by the test equipment conduct the bacterial aerosol through the nonwoven fabric under test, simulating the inoculation by a user.

**Keywords:** Dynamic functional fabric evaluation. Copper deposition on non-woven fabric. Cytotoxicity. Antimicrobial activity. Breathing simulator device.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do SARS-CoV-2. Adaptado de “Morphology, Genome Organization, Replication, and Pathogenesis of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)” [41].	19
Figura 2 - Máscaras reduzem a transmissão aérea de partículas infecciosas que podem ser liberadas durante a respiração e fala por indivíduos infectados assintomáticos. Nenhum mascaramento maximiza a exposição, enquanto mascaramento universal resulta em menor exposição. Adaptado de “Reducing transmission of SARS-CoV-2” [45].	20
Figura 3 - A concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS) pode induzir autofagia, apoptose e necrose nas células. Adaptado de “Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species” [70].	23
Figura 4 - Deposição de filme via PVD. Adaptado de “On the Physical Vapour Deposition (PVD): Evolution of Magnetron Sputtering Processes for Industrial Applications” [92].	29
Figura 5 - Diagrama macro de metodologia adotada.	33
Figura 6 - Representação esquemática do dispositivo simulador de respiração.	40
Figura 7 - Fixação das espécies nos porta amostras para processo de PVD.	44
Figura 8 - Porta amostras fixos na câmara de magnetron sputtering.	45
Figura 9 - Amostras de não tecido de polipropileno revestidas com filme de cobre via magnetron sputtering.	45
Figura 10 - Imagens de MEV/FEG com ampliação de 50x das amostras S <sub>000</sub> , S <sub>030</sub> , S <sub>060</sub> , S <sub>120</sub> , S <sub>240</sub> , S <sub>480</sub> e S <sub>960</sub> .	47
Figura 11 - Imagens de MEV/FEG com ampliação de 250x das amostras S <sub>000</sub> , S <sub>030</sub> , S <sub>060</sub> , S <sub>120</sub> , S <sub>240</sub> , S <sub>480</sub> e S <sub>960</sub> .	48
Figura 12 - Imagens de EDS com mapa de composição qualitativo das amostras S <sub>000</sub> , S <sub>030</sub> , S <sub>060</sub> , S <sub>120</sub> , S <sub>240</sub> , S <sub>480</sub> e S <sub>960</sub> .	50
Figura 13 - Concentração de Cu de S <sub>030</sub> , S <sub>060</sub> , S <sub>120</sub> , S <sub>240</sub> , S <sub>480</sub> e S <sub>960</sub> com erro percentual calculado para as amostras que foram quantificadas experimentalmente, e, a curva de tendência ajustada linearmente para todas.	51
Figura 14 - Imagens de MEV/FEG em ampliação de 50x, 125x e 250x da amostra S <sub>000</sub> após processo de esterilização por vapor em autoclave.	52

Figura 15 - Efeito citotóxico obtido pelo teste indireto MTT de acordo com a ISO 10993-05 [100] e 10993-12 [101] para a linhagem L929 de fibroblastos de camundongo.....	53
Figura 16 - MEV/FEG das amostras S <sub>000</sub> , S <sub>030</sub> e S <sub>960</sub> após 1 (1D), 2 (2D) e 7 (7D) dias.....	53
Figura 17 - Preparação dos poços para avaliação qualitativa de atividade antimicrobiana dos tecidos projetados S <sub>000</sub> , S <sub>030</sub> e S <sub>960</sub> conforme procedimento AATCC TM147 [103] utilizando a cepa <i>S.aureus</i> .....	54
Figura 18 - Preparação dos poços para avaliação qualitativa de atividade antimicrobiana dos tecidos projetados S <sub>000</sub> , S <sub>030</sub> e S <sub>960</sub> conforme procedimento AATCC TM147 [103] utilizando a cepa <i>E.coli</i> .....	55
Figura 19 - Técnica de fluorescência para avaliação qualitativa de atividade antimicrobiana dos tecidos projetados S <sub>000</sub> , S <sub>030</sub> após coração das colônias com LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability kit da cepa <i>S. aureus</i> .....	56
Figura 20 - Ensaio de resazurina de solução bacteriana da cepa <i>S. aureus</i> exposta ao tecido projetado nas concentrações S <sub>000</sub> , S <sub>030</sub> e S <sub>960</sub> mais controle positivo e negativo do meio. ....	57
Figura 21 - Ensaio de resazurina de solução bacteriana da cepa <i>E. coli</i> exposta ao tecido projetado nas concentrações S <sub>000</sub> , S <sub>030</sub> e S <sub>960</sub> mais controle positivo e negativo do meio. ....	58
Figura 22 - Análise de crescimento bacteriano das culturas <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> pela técnica de densidade ótica (OD <sub>600</sub> ) dos poços expostos as amostras S <sub>000</sub> , S <sub>030</sub> , S <sub>960</sub> mais controle positivo e negativo do meio.....	58
Figura 23 - Dispositivo simulador de respiração.....	60
Figura 24 - Montagem do dispositivo simulador de respiração e partes necessárias na cabine de segurança FILTERFLUX, modelo SBIB2 - 1266/4.....	63
Figura 25 - Plaqueamento da solução bacteriana para contagem de colônias com respectivas diluições. Solução bacteriana antes do ensaio: 1A: 1 x 10 <sup>5</sup> CFU.mL <sup>-1</sup> , 1B: 1 x 10 <sup>4</sup> CFU.mL <sup>-1</sup> , 1C: 1 x 10 <sup>3</sup> CFU.mL <sup>-1</sup> , e 1D: 1 x 10 <sup>2</sup> CFU.mL <sup>-1</sup> . Solução que passou pela amostra S <sub>000</sub> : 2A: 1 x 10 <sup>5</sup> CFU.mL <sup>-1</sup> , 2B: 1 x 10 <sup>4</sup> CFU.mL <sup>-1</sup> , 2C: 1 x 10 <sup>3</sup> CFU.mL <sup>-1</sup> , e 2D: 1 x 10 <sup>2</sup> CFU.mL <sup>-1</sup> . Solução que passou pela amostra S <sub>960</sub> : 3A: 1 x 10 <sup>5</sup> CFU.mL <sup>-1</sup> , 3B: 1 x 10 <sup>4</sup> CFU.mL <sup>-1</sup> , 3C: 1 x 10 <sup>3</sup> CFU.mL <sup>-1</sup> , e 3D: 1 x 10 <sup>2</sup> CFU.mL <sup>-1</sup> . ....	64

Figura 26 - Técnica de fluorescência da solução precipitada durante os ensaios dinâmicos para avaliação qualitativa de atividade antimicrobiana das amostras S <sub>000</sub> e S <sub>960</sub> após coloração das colônias com LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability kit com a cepa <i>E. coli</i> .....	65
Figura 27 - Contagem de colônias de <i>E. coli</i> da solução bacteriana coletada no ensaio dinâmico com as amostras S <sub>000</sub> e S <sub>960</sub> .....	65
Figura 28 - Diagrama eletrônico do dispositivo simulador de respiração .....	80
Figura 29 - Certificado do não tecido de polipropileno .....	81

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Identificação das amostras revestidas via magnetron sputtering de acordo com o tempo de exposição ao alvo de Cu. ....	34
Tabela 2 - Concentração de Cu obtida. O montante de Cu depositado nas amostras com * foi obtido matematicamente.....	51
Tabela 3 - Valores comparativos de respirabilidade entre diferentes materiais para fabricação de máscaras faciais. ....	61
Tabela 4 - Avaliação de lixiviação do filme de Cu por uso contínuo realizado com o dispositivo simulador de respiração. ....	61

## LISTA DE SIGLAS

AATCC	American Association of Textile Chemists and Colorists
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANOVA	Análise de Variância
ASTM	American Society for Testing and Materials
ATP	Adenosine TriPhosphate
BS	British Standards
CA	Corrente Alternada
CC	Corrente Contínua
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
5-CFDA, AM	Diacetato de 5-carboxifluoresceína, éster de acetoximetil
CVD	Chemical Vapor Deposition
DIU	Dispositivo intrauterino
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSR	Dispositivo simulador de respiração
EDS	Espectroscopia de Dispersão em Energia
EN	European Norm
ERO	Espécie reativa de oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FFR	Filtering Facepiece Respirator
HIV-1	Vírus da imunodeficiência humana tipo 1
ISO	International Organization for Standardization
LCMIC	Laboratório Central de Microscopia
LESTT I	Laboratório de Engenharia de Superfícies e Tratamentos Térmicos I
LDH	Lactato Desidrogenase
NAS	National Academy of Sciences
NBR	Norma Brasileira
NCCLS/CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
MB	Melt-blowing
MERS	Middle East Respiratory Syndrome

MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio
MTT	Brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio).
MEV/FEG	Microscopia Eletrônica de Alta Resolução
NIOSH	National Institute for Occupational Safety and Health
OMS	Organização Mundial de Saúde
PP	Polipropileno
PS	Penicilina/Estreptomicina
PVD	Physical Vapor Deposition
RF	Radio Frequência
RNA	Ácido Ribonucleico
SARS	Severe Acute Respiratory Syndrome
SB	Spun-bonding
SFB	Soro Fetal Bovino
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
PBS	Tampão Fosfato Salina
TNT	Tecido não tecido
TSB	Caldo Triptona Soja
UCS	Universidade de Caxias do Sul
XTT	Hidrato de ácido 3'-{1-[(fenilamino)-carbonil]-3,4-tetrazólio}bis(4-metoxi-6-nitro)benzenossulfônico

## SUMÁRIO

<b>Banca Examinadora:</b> .....	<b>2</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>1.1 Objetivos</b> .....	<b>16</b>
1.1.1 Objetivo Geral .....	16
1.1.2 Objetivos Específicos .....	17
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>18</b>
<b>2.1 Coronavírus Sars-Cov-2</b> .....	<b>18</b>
2.1.1 Desativação e contenção do Sars-Cov-2 .....	19
<b>2.2 Tecidos funcionais</b> .....	<b>21</b>
2.2.1 Cobre e suas ligas .....	22
2.2.2 Mecanismos de toxicidade do cobre .....	23
2.2.3 Impregnação de cobre em tecidos .....	24
<b>2.3 Considerações para elaboração de máscaras faciais</b> .....	<b>25</b>
2.3.1 Seleção de tecidos para máscaras faciais .....	26
<b>2.4 Máscaras faciais para redução da inoculação do Sars-Cov-2</b> .....	<b>27</b>
<b>2.5 Engenharia de superfícies</b> .....	<b>28</b>
2.5.1 Magnetron Sputtering .....	29
2.5.2 Ion plating .....	30
<b>2.6 Ensaios de viabilidade celular e citotoxicidade</b> .....	<b>31</b>
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	<b>33</b>
<b>3.1 Preparação do tecido</b> .....	<b>33</b>
<b>3.2 Deposição de cobre via magnetron sputtering</b> .....	<b>34</b>
<b>3.3 Caracterização do substrato e revestimento</b> .....	<b>35</b>
3.3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV/FEG) .....	35
3.3.2 Espectroscopia de dispersão em energia (EDS) .....	35
3.3.3 Determinação da concentração de Cu .....	35
<b>3.4 Ensaios biológicos</b> .....	<b>36</b>
3.4.1 Processo de esterilização .....	36
3.4.2 Análise de citotoxicidade e viabilidade celular com fibroblastos L929 .....	36
3.4.3 Avaliação de atividade antimicrobiana pelo procedimento AATCC TM147 .....	37
3.4.4 Avaliação de atividade antimicrobiana pela técnica de resazurina .....	39

<b>3.5 Dispositivo simulador de respiração para ensaio dinâmico de citotoxicidade e viabilidade celular .....</b>	<b>39</b>
<b>3.6 Avaliação de respirabilidade .....</b>	<b>41</b>
<b>3.7 Avaliação de lixiviação por uso contínuo .....</b>	<b>42</b>
<b>3.8 Avaliação dinâmica de atividade antimicrobiana .....</b>	<b>42</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>44</b>
<b>4.1 Obtenção das amostras piloto e revestimento via magnetron sputtering ...</b>	<b>44</b>
<b>4.2 Caracterização do substrato e revestimento .....</b>	<b>46</b>
4.2.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV/FEG) .....	46
4.2.2 Espectroscopia de dispersão em energia (EDS).....	49
4.2.3 Determinação da concentração de Cu .....	49
<b>4.3 Ensaios biológicos.....</b>	<b>51</b>
4.3.1 Processo de esterilização.....	51
4.3.2 Análise de citotoxicidade e viabilidade celular com fibroblastos L929.....	52
4.3.3 Avaliação de atividade antimicrobiana pelo procedimento AATCC TM147.....	54
4.3.4 Avaliação de atividade antimicrobiana pela técnica de resazurina.....	57
<b>4.4 Fabricação do dispositivo simulador de respiração .....</b>	<b>59</b>
<b>4.5 Avaliação de respirabilidade .....</b>	<b>60</b>
<b>4.6 Lixiviação por uso contínuo.....</b>	<b>61</b>
<b>4.7 Avaliação dinâmica de atividade antimicrobiana .....</b>	<b>62</b>
<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>66</b>
<b>6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>68</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>69</b>
<b>APÊNDICE A - DIAGRAMA ELETRONICO DO DISPOSITIVO SIMULADOR DE RESPIRAÇÃO .....</b>	<b>80</b>
<b>ANEXO A - CERTIFICADO TECIDO NÃO TECIDO DE POLIPROPILENO .....</b>	<b>81</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O coronavírus SARS-CoV-2 causador da doença COVID-19 surgiu no final de 2019, na China, e se espalhou pelo mundo provocando um grande problema de saúde global, devido ao seu elevado potencial de contágio, e capacidade de provocar infecções graves do trato respiratório em humanos. Os sintomas provocados pela doença podem ser leves como febre, tosse seca, fadiga, falta de ar, calafrios, dor de garganta, dores musculares, perda de olfato e dores de cabeça, ou mais graves, podendo o indivíduo infectado apresentar danos permanentes ao pulmão, pneumonia, desoxigenação sanguínea e ocasionalmente, a morte [1]. Juntamente com a Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS) e a Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS), esse é o terceiro tipo de coronavírus humano patogênico que surgiu nas duas últimas décadas [2, 3].

O aparecimento de patógenos com capacidade de propagação elevada torna necessário o desenvolvimento de materiais funcionais para fabricação de máscaras faciais com propriedades otimizadas, que apresentam bons resultados como mecanismo auxiliar de combate à pandemia de COVID-19 [4], reduzindo a inoculação do SARS-CoV-2, e, conseqüentemente, a gravidade dos sintomas [5 - 7].

Os tecidos empregados para fabricação de máscaras devem atender requisitos mínimos referentes à capacidade de filtração e respirabilidade conforme normas já estabelecidas, dentre as principais estão: NIOSH [8], ABNT NBR 15052 [9], BS EN 14683 [10], ASTM D737 [11], ISO 9237 [12], ASTM F2299 [13], ASTM F2101 [14], entre outras. Diferentes técnicas podem ser empregadas para otimização de propriedades de filtração e neutralização de microrganismos em tecidos empregados para fabricação de máscaras faciais, como: revestimentos ou modificação de superfícies [15 - 20] e multicamadas [17, 21, 22]. O surgimento de tecidos projetados torna necessário a elaboração de novos procedimentos de teste, que possam avaliar equipamentos de proteção individual altamente funcionais de forma dinâmica, aproximando condições reais de uso [23].

O desempenho de máscaras faciais pode ser otimizado pela utilização de revestimentos metálicos que possuem propriedades antivirais e antibacterianas [24, 25]. Cobre e prata (Ag), por exemplo, vêm sendo utilizados ao longo de vários séculos para desinfecção de sólidos, líquidos e tecidos devido a suas propriedades antimicrobianas e antivirais [26 - 28]. Comparando-se o cobre com a prata por

exemplo, sua utilização torna-se mais vantajosa em aplicações onde procura-se características de toxicidade frente aos agentes bacterianos e virais, aliado ao baixo custo em relação aos demais. A utilização de Cu vem sendo registrada desde períodos A.C. para purificação de água pelos Gregos (400 A.C.), para produção de whisky em vasos de Cu pelos Celtas (800 D.C. até os dias atuais), para prevenção de disenteria por soldados japoneses na Segunda Guerra Mundial por meio da utilização de pedaços de liga de Cu em seus cantis, dentre outros [18]. Por ser um material de elevada versatilidade, o Cu é utilizado como purificador de água, fungicida, virucida, antibacteriano, antiincrustante, algicida e nematicida [18, 28 - 30]. Devido a elevada susceptibilidade de uma grande variedade de microrganismos em superfícies ricas em Cu, sua utilização vem se expandindo para diversas áreas, inclusive na desativação e diminuição da carga viral do coronavírus SARS-CoV-2 em superfícies, conforme comprovado por estudos recentes [31, 32].

É possível explorar as propriedades antibacterianas e antivirais do Cu aplicadas a máscaras de proteção individual, de forma a aumentar sua eficiência como mecanismo auxiliar de combate a diversos agentes nocivos à saúde existentes e que podem surgir com o passar dos anos. O tema do presente estudo trata sobre o desenvolvimento de um tecido projetado, que consiste em um material compósito, fabricado a partir de um TNT de polipropileno  $(C_3H_6)_n$  revestido com filme de Cu para obtenção de material com propriedades antivirais e antibacterianas. Apresenta-se a completa caracterização morfológica, físico-química e de desempenho biológico em relação a propriedades citotóxicas e antimicrobianas.

Desenvolve-se um equipamento inovador para teste de tecidos funcionais em condições dinâmicas que simula a respiração de um usuário. O mesmo foi projetado e construído com base em um sistema normativo de referência para avaliação de eficiência de tecidos empregados na fabricação de máscaras faciais.

## **1.1 Objetivos**

### **1.1.1 Objetivo Geral**

Desenvolver um tecido projetado a partir de um TNT de polipropileno revestido com Cu, buscando propriedades antivirais e antibacterianas. Desenvolver um dispositivo simulador de respiração para avaliação dinâmica de tecidos e membranas.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

A fim de atingir o objetivo geral deste trabalho, define-se os objetivos específicos:

- a) Obter concentrações distintas de Cu em diferentes amostras, a fim de verificar a composição ótima para desempenho de atividade antimicrobiana;
- b) Realizar caracterização morfológica e físico-química completa dos tecidos obtidos;
- c) Executar ensaios biológicos de viabilidade celular frente a linhagem celular de fibroblastos L929 e atividade antimicrobiana;
- d) Desenvolver um dispositivo simulador de respiração;
- e) Realizar teste de respirabilidade do tecido projetado no dispositivo simulador de respiração para obtenção de coeficiente de permeabilidade;
- f) Avaliar a lixiviação do filme de Cu depositado no tecido por meio do dispositivo simulador de respiração pelo período máximo de utilização conforme normas vigentes;
- g) Ensaiar o tecido projetado no dispositivo simulador de respiração para avaliação de atividade antimicrobiana de forma dinâmica.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Neste capítulo apresenta-se a fundamentação teórica necessária para o desenvolvimento do trabalho.

### 2.1 Coronavírus Sars-Cov-2

Sabe-se que a transmissão do SARS-CoV-2 acontece principalmente por meio de gotículas provenientes de tosse ou espirros de pacientes contaminados, assintomáticos ou pré-sintomáticos. Também pode acontecer pelo contato das mãos com superfícies contaminadas e posterior contato com as membranas mucosas do nariz, olhos e boca [3, 33, 34]. Dentre os principais sintomas da infecção de COVID-19 provocada pelo SARS-CoV-2 estão, febre, tosse seca, fadiga, falta de ar, calafrios, dor de garganta, dores musculares, perda de olfato e dores de cabeça [1].

O SARS-CoV-2 é um vírus envelopado com RNA de fita simples pertencente ao gênero betacoronavirus e à família *coronaviridae* [35], com genoma de aproximadamente 30.000 nucleotídeos, que, por sua vez, carregam informações de 3 classes de proteínas: pp1a e pp1ab, que são clivadas em outras 16 proteínas não estruturais necessárias para a síntese do RNA viral (e outras funções); quatro proteínas estruturais, a glicoproteína da espícula (proteína S), proteínas de envelope (E), proteína de membrana (M) e proteínas do nucleocapsídeo (N), que são fundamentais para a entrada e desenvolvimento do vírus nas células do hospedeiro, e outras nove proteínas auxiliares que são responsáveis por neutralizar a resposta imunológica do hospedeiro durante a infecção [36 - 39], a Figura 1 ilustra sua morfologia básica de forma resumida. A entrada do vírus é a primeira e mais importante etapa do ciclo de vida do vírus, que é executado pela proteína S, que reconhece o receptor da célula hospedeira e age de forma a garantir a fusão da membrana e posterior liberação do genoma viral no citoplasma da célula hospedeira [39, 40].

Além do seu mecanismo de entrada e neutralização da resposta imunológica do hospedeiro [36 - 39], seu elevado grau de risco e contaminação também pode ser associado à capacidade de preservar sua carga viral por períodos prolongados em superfícies inanimadas como alguns metais, vidro, tecidos e polímeros variados por até 9 dias [3]. Referências de pesquisa da estabilidade do vírus evidenciam um nível

detectável de carga viral ainda infecciosa em máscaras cirúrgicas descartáveis no 7º dia após o contato com o mesmo [1].

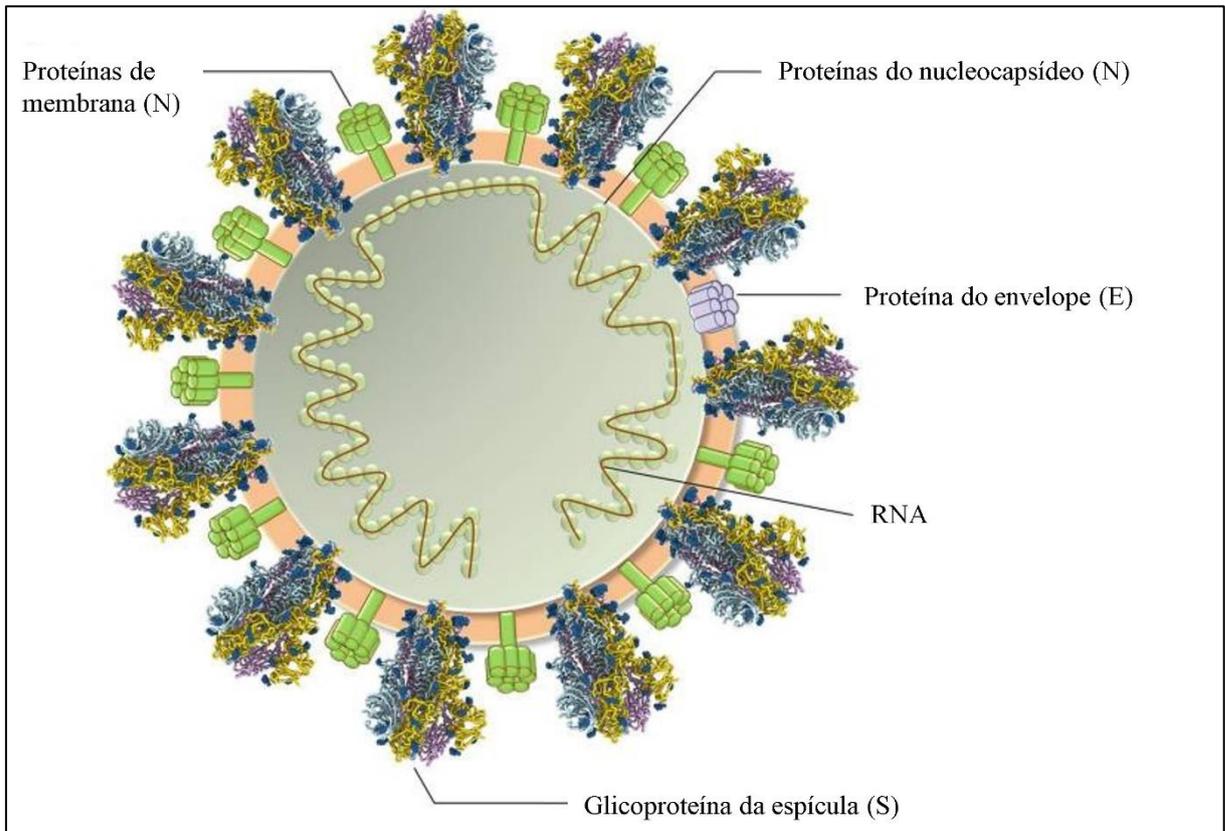


Figura 1 - Estrutura do SARS-CoV-2. Adaptado de “Morphology, Genome Organization, Replication, and Pathogenesis of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)” [41].

### 2.1.1 Desativação e contenção do Sars-Cov-2

Apenas 1 mL de secreções de um paciente contaminado pode possuir até  $10^8$  cópias ativas do vírus [42], tornando-se de fundamental importância a desinfecção de superfícies que estão constantemente em contato com um elevado número de pessoas a fim de diminuir a carga viral remanescente nas mesmas. Agentes desinfetantes que contêm hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogênio e etanol são eficientes na desativação do SARS-CoV-2 com poucos minutos de exposição [1, 3, 43]. Alguns estudos também comprovam a eficiência da radiação ultravioleta para desativação do novo coronavírus [44], etc.

Dados publicados demonstram que, além das gotículas, o SARS-CoV-2 pode ser transmitido por aerossóis a partir de pessoas contaminadas. Desta forma, a OMS recomenda a lavagem constante das mãos e distanciamento social mínimo de 6 pés,

ou 1,8 m [45], porém evidências sugerem que essa distância não é suficientemente eficiente em ambientes internos onde aerossóis podem permanecer no ar por horas e seguir fluxos de ar por distâncias maiores que 6 pés [46]. Assim, também é recomendada a utilização de máscaras faciais para proteção individual, que fornecem uma barreira fundamental, reduzindo a carga viral exalada no ar em caso de contaminação, especialmente em pessoas assintomáticas e com sintomas leves [47], conforme representado na Figura 2.

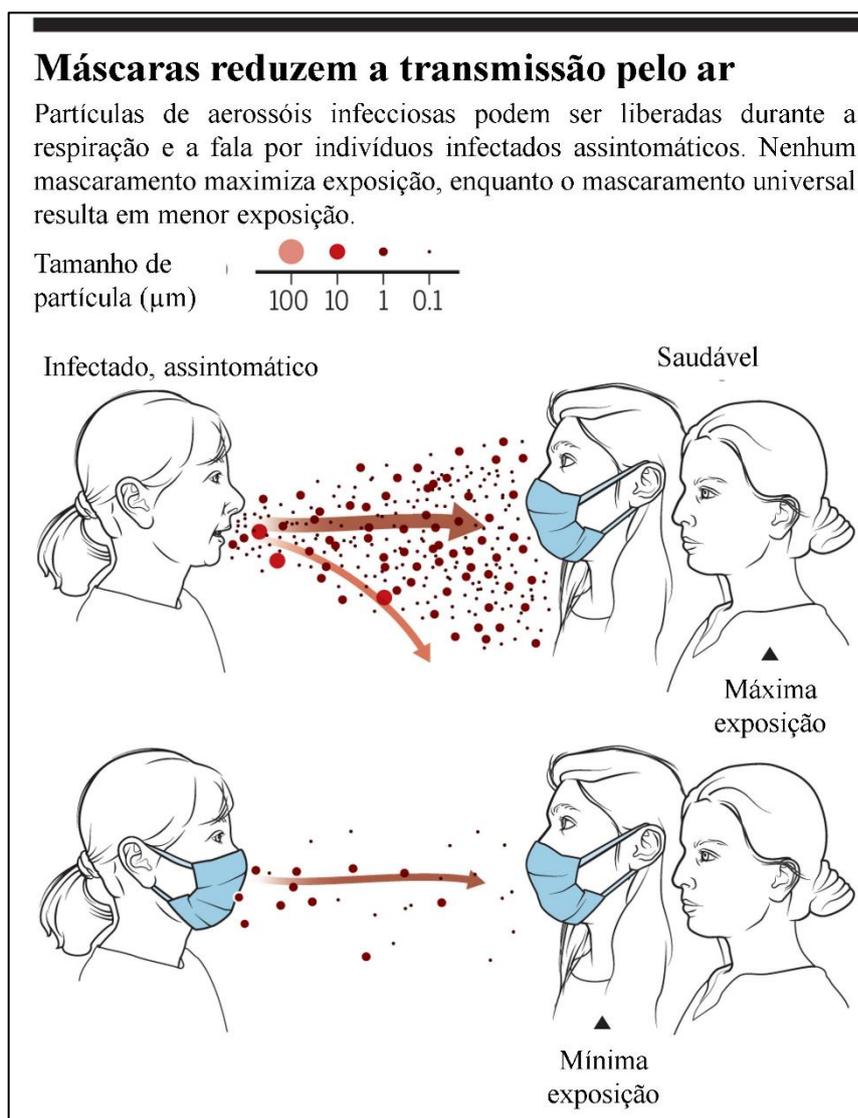


Figura 2 - Máscaras reduzem a transmissão aérea de partículas infecciosas que podem ser liberadas durante a respiração e fala por indivíduos infectados assintomáticos. Nenhum mascaramento maximiza a exposição, enquanto mascaramento universal resulta em menor exposição. Adaptado de “Reducing transmission of SARS-CoV-2” [45].

As máscaras faciais diminuem significativamente a concentração viral no ar e protegem os indivíduos não infectados dos aerossóis do SARS-CoV-2, sendo importante sua utilização em ambientes fechados que podem acumular altas

concentrações do vírus como restaurantes, hospitais, escritórios e outros lugares com ventilação reduzida [45, 47].

## 2.2 Tecidos funcionais

Desde o começo da pandemia de COVID-19, muitas empresas e grupos de pesquisa focaram no projeto e fabricação de máscaras faciais personalizadas, empregando uma gama de materiais para otimização de suas funcionalidades. Essas máscaras são projetadas de forma a aprimorar propriedades como: capacidade de filtração, respirabilidade, conferir propriedades antibacterianas e/ou antivirais, resistência mecânica para resistir a lavagens e utilização múltipla, secagem rápida e, até mesmo, máscaras ecologicamente corretas [48]. A seguir, apresenta-se alguns exemplos, que destacam o avanço técnico neste campo de pesquisa.

Uma equipe da Universidade Politécnica de Hong Kong desenvolveu uma máscara reutilizável que possui grafeno na superfície, capaz de se auto esteriliza. O revestimento de grafeno em TNT gera uma superfície super hidrofóbica, fazendo com que as gotículas aquosas que transportam vírus e bactérias sejam repelidas. A temperatura na superfície da máscara de grafeno pode atingir temperaturas próximas a 80 °C sob iluminação solar, tornando-se reutilizável após a esterilização fototérmica. Este revestimento também foi combinado com nanopartículas de Ag, podendo exercer não apenas descontaminação fototérmica, mas também propriedades antibacterianas e/ou antivirais conferidos pela Ag [17, 48 - 50].

Diversos centros de pesquisa buscaram combinar propriedades de tecidos altamente hidrofóbicos, capazes de repelir as partículas aquosas que transportam bactérias e vírus [48] com nanomateriais, como por exemplo, nanopartículas de cobre [18], prata [51 - 53], titânio/níquel [54], óxido de zinco [55], óxido/carboneto de tungstênio [56], peróxido de magnésio [53], e suas combinações, que são capazes de conferir propriedades antibacterianas e antivirais a membranas e tecidos utilizados na fabricação de máscaras faciais.

Em um estudo publicado, incorporou-se Microban® (composto baseado em Ag) e Viroksan® (monoperoxiftalato de magnésio) a um TNT de PP de forma a conferir propriedades antibacterianas. O Microban® e o Viroksan® foram incorporados às fibras do TNT durante o processo de formação das fibras para garantir uma boa distribuição. Conforme resultados apresentados pelo estudo, houve redução completa

da *E. coli* utilizada após 4 horas de teste com concentração de 1,0 % de Microban® m/m. Em complemento, com Viroksan® em concentração de 0,86% m/m houve completa inativação logo após a inoculação do agente no tecido testado [53].

Patentes concedidas apresentam um material antiviral baseado em óxido de tungstênio. O mesmo foi aplicado em forma de filme e combinado com fibras para utilização em máscaras faciais. Os resultados apresentados apontam para inativação dos vírus Influenza A, subtipo H9N2 e da Influenza aviária A H5N1 com R de 2 ou mais. Sendo  $R = \log C - \log A$ , onde C é o título viral TCID obtido após irradiar uma amostra não processada com luz visível por 24 h, e A é o título viral TCID50 obtido após tratamento com a micropartículas de óxido de tungstênio e irradiação com luz visível por 24 h [56].

Sabe-se que o SARS-CoV-2 possui um curto período de viabilidade quando exposto ao metal Cu e a superfícies com recobrimentos de Cu, que rapidamente oxida em óxido cúprico (CuO) ou cuproso (Cu<sub>2</sub>O) [31, 32]. O revestimento do poliuretano com óxido cuproso (Cu<sub>2</sub>O / Pu) demonstra comprovada eficiência na redução da carga viral do SARS-CoV-2, apresentando queda na contagem viral de 99,9% com 1 h de exposição [31].

### 2.2.1 Cobre e suas ligas

Vírus e bactérias não apresentam mecanismos de defesa eficientes capazes de tolerar a exposição contínua a íons metálicos, tornando-os muito suscetíveis aos íons de cobre, [18, 29]. A desativação por íons de Cu de alguns tipos de vírus, como os envolvidos na bronquite infecciosa [57], poliovírus [58], vírus Junin [59], vírus simples da herpes [59], vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) [60], vírus da influenza A [61] e outros vírus de DNA ou RNA de fita simples ou dupla, envelopados ou não já foi observada [18, 29]. Estudos recentes comprovam a rápida inativação de alguns tipos de coronavírus, como o Coronavírus 229E em superfícies ricas em cobre (>70%) ou ligas de cobre-zinco [62].

Para os seres humanos, o cobre é considerado seguro em períodos de exposição prolongada conforme comprovado pelo uso contínuo de dispositivos intrauterinos (DIUs) por mulheres, que são fabricados em cobre [63, 64]. O risco de reações adversas devido ao contato da pele com cobre é considerado extremamente baixo, e pode ser considerado um elemento essencial para a saúde, envolvido em

vários processos fisiológicos e metabólicos humanos [29, 65], o *National Academy of Sciences Committee* (NAS) dos EUA estabelece uma dose diária recomendada de 0,9 mg de cobre para adultos normais (homens e mulheres) em uma dieta regular [66], considerando-o um elemento fundamental para saúde.

### 2.2.2 Mecanismos de toxicidade do cobre

Os metais vêm sendo utilizados como agentes antimicrobianos e antivirais desde a antiguidade, porém, seus princípios de funcionamento permanecem pouco compreendidos na maior parte da história. Estudos recentes demonstram que os metais possuem meios distintos de exercer sua toxicidade frente aos agentes virais e bacterianos, os principais efeitos biocidas são desencadeados por estresse oxidativo, disfunção de proteínas e mais recentemente, visualizou-se o efeito zumbi [24, 67, 68].

Uma importante característica dos metais é sua capacidade de participar das reações redox, desenvolvendo a tendência de adquirir elétrons de uma espécie química doadora de elétrons [67]. Os metais redox com potencial ativo podem atuar como cofatores catalíticos em uma ampla gama de enzimas celulares gerando espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs geradas têm a capacidade de induzir estresse oxidativo celular, podendo levar a necrose, apoptose ou autofagia celular [69], conforme representado pela Figura 3.

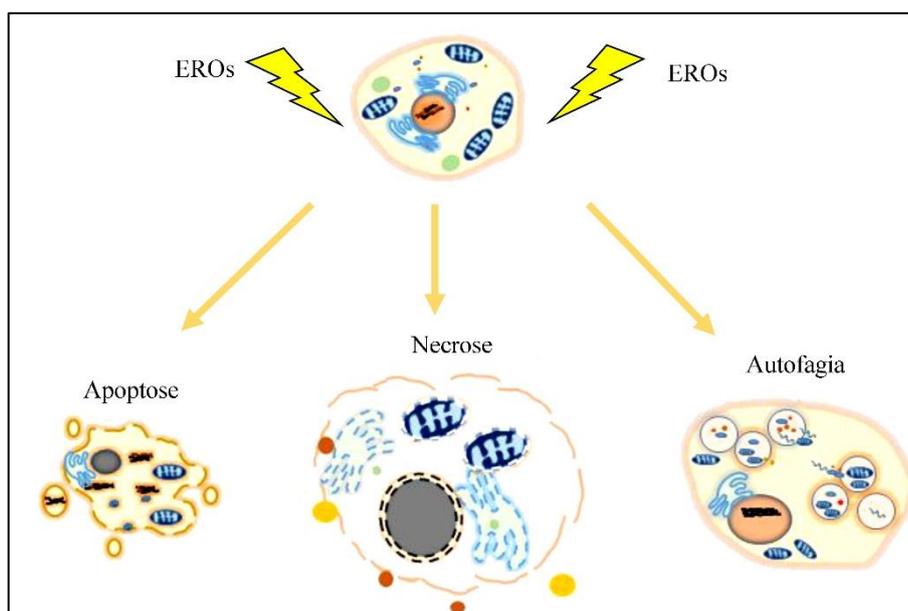


Figura 3 - A concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS) pode induzir autofagia, apoptose e necrose nas células. Adaptado de "Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species" [70].

A toxicidade induzida pelo cobre é baseada na formação de EROs a partir de íons livres de Cu. Os óxidos cúprico (CuO) e cuproso (Cu<sub>2</sub>O), na presença de superóxidos ou de outros agentes redutores sofrem redução, o Cu<sup>+2</sup> pode ser reduzido a Cu<sup>+</sup> que serve como catalisador para formação de radicais de hidroxila (OH<sup>•</sup>) a partir do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) via reações de Haber-Weiss [71]. A hidroxila é o radical oxidante mais poderoso que reage com praticamente todas as moléculas biológicas, caso seja produzida em uma superfície metálica próxima ao DNA microbiano, pode gerar modificações das bases purínicas e pirimidínicas ocasionando mutações ou até a inativação do DNA, pode também danificar enzimas, proteínas e lipídios das membranas celulares [72].

Outro mecanismo importante que desencadeia a atividade biocida dos metais é a disfunção de proteínas celulares. Os íons metálicos em geral possuem a capacidade de se ligar a átomos doadores de elétrons como: O, N e S, por meio de interações fortes e seletivas [67]. Esses íons metálicos externos e seus compostos podem vir a substituir os metais originais presentes em agentes microbianos, levando a disfunção celular [73] pelo fenômeno de mimetismo iônico ou mimetismo molecular, dependendo do composto ou elemento metálico envolvido [24]. Os íons de Cu<sup>+2</sup> tem a capacidade de formar compostos orgânicos com grupos funcionais contendo O, N e S que pode resultar em defeitos de estrutura conformacional de ácidos nucleicos e proteínas, além de alterações na fosforilação oxidativa e equilíbrio osmótico [24, 67].

Estudos recentes descrevem um novo mecanismo de toxicidade conhecido como “efeito zumbi” induzido por materiais metálicos, pelo qual bactérias mortas pela exposição aos íons metálicos têm a capacidade de contaminar uma população ainda ativa do mesmo agente. Esse efeito pode ser descrito em duas etapas, primeiramente, as espécies metálicas não são desativadas (consumidas) pelo mecanismo de morte por eles provocado, continuando ativos na bactéria morta e podendo apresentar seu efeito biocida de forma repetida. Em segundo lugar, as bactérias mortas servem como um “reservatório” para liberação dos íons metálicos letais para ação posterior contra outras bactérias vivas [68].

### 2.2.3 Impregnação de cobre em tecidos

A implantação de Cu em tecidos varia conforme a origem e métodos empregados para fabricação do mesmo. Pode-se utilizar como material base tecidos

naturais ou sintéticos, tecidos ou não tecidos. Em relação a implantação ou impregnação de metais em tecidos, variam conforme a sua origem, podendo ser adicionados como carga em sua matriz (sintéticos), deposição eletroquímica, revestimentos, banhos, etc.

A produção de um tecido projetado revestido, com propriedades antimicrobianas e antivirais pode se dar por deposição eletroquímica, um exemplo de processo pode ser desenvolvido basicamente em duas etapas. A primeira consiste na ativação do tecido pela nucleação de um metal nobre catalítico que pode ser desenvolvida expondo-se o tecido a uma solução oxidante catalítica de baixo potencial. Posteriormente realiza-se a impregnação de cátions de um metal nobre, preferencialmente o  $\text{Pd}^{+2}$  em uma solução de cloreto de paládio ( $\text{PdCl}_2$ ). A segunda etapa consiste na redução dos cátions metálicos a serem implantados em local próximo a superfície do tecido ativado, a redução é catalisada pelo metal nobre. Exemplos dos cátions implantados em tecidos por esse método são,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Ag}^{+1}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  e  $\text{Ni}^{+2}$  [74]. Outro processo passível de aplicação é desenvolvido via imersão do tecido em uma solução química com elevada concentração do composto ou elemento a ser implantado, posteriormente o compósito deve passar por processo de limpeza e acabamento [75].

Outras formas de obtenção de materiais com revestimentos antibacterianos e antivirais se dão via deposição física vapor por magnetron sputtering ou ion plating, ou por modificação da superfície via plasma immersion ion implantation [76]. Esses processos são mais atrativos em comparação aos de deposição eletroquímica pois não liberam agentes nocivos ao ambiente que precisam de tratamento posterior. Desta forma, torna-se interessante a implantação de Cu via processos de PVD a fim de explorar suas propriedades antibacterianas e antivirais [77, 78].

### **2.3 Considerações para elaboração de máscaras faciais**

Os tecidos empregados para confecção de máscaras faciais devem ser testados conforme padrões já estabelecidos, a fim de garantir a segurança dos seus usuários e a eficiência do material utilizado para sua confecção. Como principal característica, as máscaras de cobertura facial não devem impedir a respiração do usuário, para evitar a sensação de sufocamento. Para sua fabricação, deve-se avaliar o tecido ou o conjunto de tecidos quanto a sua resistência à respiração e eficiência de

filtração, usando-se de métodos de teste já estabelecidos. Dentre os testes principais, pode-se destacar o padrão estabelecido pela NIOSH, para avaliação da eficiência de filtração e a queda de pressão de materiais naturais ou sintéticos utilizados para fabricação de máscaras, medindo-se a resistência à inalação, exalação e a eficiência de filtração [79, 80]. Pode-se também utilizar os padrões estabelecidos pela ABNT NBR 15052 com vazão de  $100 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$  [9], EN 14683, com diferença máxima de pressão admissível de  $36,7 \text{ Pa}\cdot\text{cm}^{-2}$  [10], ASTM D737 com vazão mínima de ar de  $1,14 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  [11] ou a ISO 9237 com vazão mínima de  $0,91 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  [12].

O tecido empregado para fabricação da máscara deve possuir boa resistência de forma a garantir sua eficiência de filtração durante o tempo de uso. Recomenda-se que, caso sejam máscaras reutilizáveis, as lavagens sejam feitas mecanicamente e não manualmente, desta forma, diminui-se a probabilidade de possíveis contaminações. Deve-se realizar o teste de eficiência de filtração do tecido empregado conforme padrão estabelecido pela NIOSH, ASTM F2299 [13], ASTM 2101 [14] ou NBR 15052 [9], que deve indicar se o mesmo é adequado ou não para confecção da máscara facial [79, 80]. Outro possível teste para validação da eficiência de filtração pode ser desenvolvido por meio de microscopia para medição dos poros a fim de determinar a capacidade de filtração.

### 2.3.1 Seleção de tecidos para máscaras faciais

Para partículas transportadas pelo ar, incluindo aerossóis virais como o SARS-CoV-2, o Centers for Disease Control and Prevention (CDC) recomenda o uso de máscaras faciais com filtro N95 como proteção respiratória. A designação N95 FFR é determinada pelo NIOSH e indica uma eficiência de filtração de 95% para tamanhos de partícula  $0,022 - 0,259 \mu\text{m}$  (diâmetro médio de contagem de  $0,075 \pm 0,02 \mu\text{m}$ ), e como os aerossóis virais são maiores do que o próprio vírus  $\sim 0,120 \mu\text{m}$ , espera-se que os respiradores N95 forneçam proteção adequada [19, 81 - 83].

Os tecidos selecionados para fabricação de máscaras faciais devem possuir eficiência de filtração adequada para que sejam eficientes contra o aerossol e as gotículas que contenham o SARS-CoV-2, desta forma pode-se garantir que a filtração retenha boa parte da carga viral. Estudos comparativos demonstram tecidos de polipropileno, nylon, algodão e poliéster com eficiência relativamente satisfatória. Porém, quando comparados diversos estudos, encontram-se diferenças

consideráveis entre as medidas de eficiência de filtração e de queda de pressão entre os materiais, essa disparidade entre os dados provém de diferenças na instrumentação, método de teste e origem do material selecionado [19].

O TNT apresenta maior eficiência quando comparado aos tecidos de outros materiais como algodão, poliéster e nylon, tornando-se uma boa opção para confecção de máscaras faciais [19]. A estrutura do TNT é fibrosa e pode ser ordenada ou desordenada, sendo constituída de uma manta ou de fibras permitindo a diminuição da porosidade e aumentando a eficiência de filtração quando comparados aos demais materiais [20]. Pode ser fabricado a partir dos processos de spun-bonding (SB) e melt-blowing (MB) [84], sendo o diâmetro das fibras obtidas pelo processo SB maiores do que as do MB, estas são utilizadas normalmente como suporte mecânico para outras camadas. Já as fibras obtidas pelo processo MB têm maior área de superfície por massa ( $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ) quando comparas às obtidas por SB, o que lhes confere um papel importante na filtração de partículas. Além do elevado empacotamento das fibras obtidas pelo processo MB, um campo eletrostático é aplicado durante o processo de fabricação, que induz cargas nas fibras do TNT. Este campo fornece às fibras MB cargas dipolo em sua superfície, otimizando sua eficiência de filtração [85], [86]. Comumente, o TNT de PP é um material utilizado na camada filtrante em máscaras faciais N95 devido às suas propriedades [87], sendo que a densidade de empacotamento e a carga eletrostática induzida no processo de fabricação determinam sua eficiência de filtração [85].

## **2.4 Máscaras faciais para redução da inoculação do Sars-Cov-2**

Observa-se que o SARS-CoV-2 pode provocar diferentes graus de severidade de sintomas conforme o paciente e a carga viral inoculada, podendo variar de uma completa ausência de sintomas até pneumonia, síndrome respiratória aguda e morte em alguns casos [5]. Dados epidemiológicos publicados sugerem a hipótese de que a utilização de máscaras faciais proporciona a redução da gravidade dos sintomas provocados pelo vírus, sendo esta conjectura válida a partir da teorização de longa data da patogênese viral, de que a gravidade dos sintomas da doença é proporcional a inoculação do vírus recebida, quanto maior a quantidade, mais graves são os sintomas [5, 6].

Se a inoculação determina a severidade da infecção provocada pelo SARS-CoV-2, a utilização de máscaras contribui diretamente na redução do inóculo do vírus e, conseqüentemente, na atenuação do quadro clínico do paciente infectado, aumentando o número de pessoas com sintomas leves ou assintomáticas. O CDC estimou que a taxa de infecções assintomáticas é de aproximadamente 40% em julho de 2020, mas em lugares com a definição para utilização de máscaras para a população em geral, a taxa de infecções assintomáticas é superior a 80%, gerando-se evidências observacionais para esta hipótese [5, 7], o que vem a diminuir a mortalidade e a taxa de novas infecções provocadas pelo vírus.

Se as máscaras são capazes de filtrar o aerossol e as gotículas que contém o vírus ativo mantendo-o na superfície do tecido, torna-se possível a utilização de materiais compósitos contendo metais como cobre ou prata, que possuem propriedades antivirais capazes de diminuir a carga viral ativa em superfícies inanimadas [31, 67], como as máscaras, o que pode vir a reduzir a contagem viral ativa em sua superfície, e por conseqüência, diminuir inoculação do vírus a um nível mínimo, contribuindo diretamente na atenuação dos sintomas.

## **2.5 Engenharia de superfícies**

Os processos de modificação de superfície e de regiões próximas são aplicados em materiais de engenharia com o intuito de alterar suas propriedades superficiais, podendo melhorá-las quanto a resistência a corrosão, desgaste, abrasão, propriedades ópticas, elétricas, revestimentos protetivos, revestimentos biocidas, antivirais, entre outros [88, 89].

Os processos aplicados envolvem princípios de modificação da estrutura de superfície do material ou de deposição de um filme fino (revestimento) no substrato já existente [88]. Entende-se por substrato o material que se deseja revestir e alvo o material que deve servir de fonte para os átomos de deposição durante o processo de deposição de filme.

Tipicamente os métodos utilizados para deposição de filmes finos são: deposição física de vapor (PVD), deposição química de vapor (CVD) e a deposição por solvente químico incluindo deposição por sol - gel [90].

As principais categorias utilizadas para o processo de PVD consistem em: evaporação termal, deposição via magnetron sputtering e ion plating [88, 90]. O

processamento via PVD é desenvolvido em ambientes de vácuo ou plasma de um determinado gás, que pode ser inerte ou reativo, variando conforme o que objetiva-se depositar, compostos, ligas ou elementos. Os ambientes de vácuo são utilizados para garantir que não haja contaminação gasosa do substrato, as faixas de pressão utilizadas usualmente variam de alto vácuo ( $10^{-4}$  mbar) até vácuo muito alto ( $10^{-9}$  mbar) [88, 91].

De forma geral, para entender todos os processos de PVD, pode-se dividi-los em três etapas, que são: criação de uma fase de vapor do material alvo, tipicamente por sputtering ou evaporação térmica, transporte do vapor gerado para o substrato e a nucleação e crescimento do filme a partir da condensação do vapor formado [89]. Pode-se observar a Figura 4, que representa o esquema básico de deposição de filme via PVD.

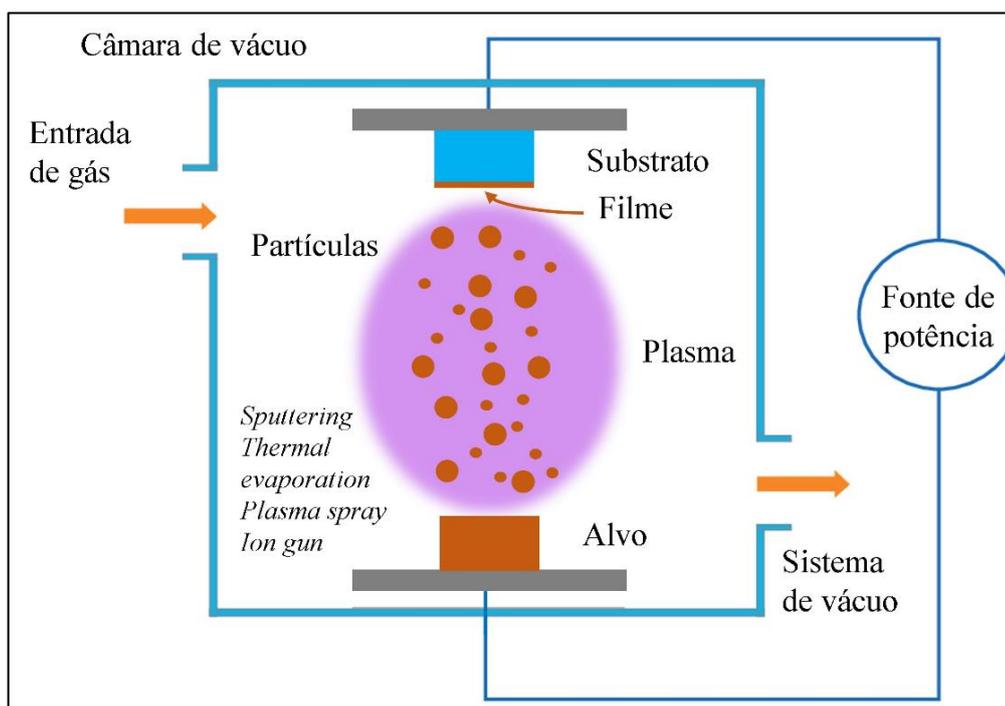


Figura 4 - Deposição de filme via PVD. Adaptado de “On the Physical Vapour Deposition (PVD): Evolution of Magnetron Sputtering Processes for Industrial Applications” [92].

### 2.5.1 Magnetron Sputtering

O processo de sputtering pode ser aplicado em configurações de corrente contínua (CC), corrente alternada (CA), sputtering de rádio frequência (RF) e magnetron sputtering, sendo o último mais amplamente utilizado na indústria [88, 93].

O magnetron sputtering consiste na deposição de partículas a partir de um alvo pelo processo de deposição física de vapor [88]. A forma mais comum de magnetron sputtering é baseada em plasma, onde o estado de algum gás (inerte ou reativo) está presente, e os íons do mesmo são acelerados até o alvo que deve estar em potencial elétrico negativo em relação ao plasma. Em baixas pressões os íons chegam à superfície do alvo com certa energia, provida pela diferença de potencial entre a superfície e o ponto onde o íon é formado. Em pressões maiores, os íons sofrem colisões físicas podendo mudar de carga e sofrer aquecimento, criando assim um espectro de energia dos íons que bombardeiam a superfície do alvo e aquecendo sua superfície. Quanto maior o potencial elétrico aplicado ao plasma, maior a energia com que os íons bombardeiam a superfície do alvo. Os íons carregados, ao colidirem com a superfície do alvo, por transferência de momento, são capazes de quebrar as ligações superficiais do material, fazendo com que átomos sejam ejetados da superfície [88 - 90]. A fim de aumentar a eficiência do processo, adota-se magnetos com o intuito de gerar um campo eletromagnético paralelo a superfície do alvo, fazendo com que os elétrons ejetados se desloquem em trajetória perpendicular ao campo e a superfície do alvo, em direção a superfície do substrato, tornando o alvo de deposição muito mais eficiente em comparação a processos tradicionais como o sputtering [93].

Em sistemas baseados em vácuo, o feixe de íons ou plasma é gerado em uma fonte de ionização separada, que é acelerada e transferida a uma câmara que está em condições de vácuo. Neste processo a energia de bombardeamento é geralmente maior que nos sistemas baseados em plasma [88].

### 2.5.2 Ion plating

O processo de ion plating ou ion assisted deposition (deposição assistida por feixe de íons) utiliza uma fonte de íons externa que é direcionada à superfície do substrato durante o processo de deposição de filme. A fonte do material do filme a ser depositado pode ser obtido por processo de sputtering, evaporação termal, arco catódico, vapor químico, evaporação a laser e gases reativos [88, 93].

O processo de ion plating pode ser desenvolvido em ambiente de vácuo ou plasma de um gás. No processo baseado em plasma, o substrato com potencial elétrico negativo em contato com um plasma recebe íons acelerados e carregados

positivamente, a fonte do material de deposição normalmente é obtida por evaporação termal no interior da câmara [88]. Nos processos desenvolvidos a partir de um sistema de vácuo, a fonte do material de deposição e a fonte os íons energéticos para bombardeio podem ser separados, a fonte de íons energéticos provém tipicamente de um canhão de íons ou plasma e, a fonte de material de deposição é obtida a partir de algum dos processos supracitados [88, 93].

O bombardeio por íons energéticos durante o processo de deposição pode afetar as propriedades do filme formado de diferentes formas. Inicialmente, a superfície do substrato pode ser limpa (limpeza in situ) pela pulverização e posteriormente ativada na câmara de deposição, durante o estágio de nucleação do filme, o bombardeio pode aumentar os pontos de nucleação por difusão, fazendo com que o filme cresça de forma uniforme em diferentes pontos, durante a formação do filme, adiciona energia térmica a superfície do substrato, também podendo inserir defeitos na rede cristalina da superfície, já na etapa de crescimento de filme, pode adicionar energia térmica a superfície do substrato [88].

## **2.6 Ensaios de viabilidade celular e citotoxicidade**

Os ensaios de viabilidade desempenham um papel muito importante no estudo de culturas celulares. São amplamente empregados para verificação de comportamento, ou reações provocadas por agentes externos na saúde celular de uma amostra. Servem como bom indicador de viabilidade celular, uma vez que, ao final dos testes pode-se verificar quantas células viáveis restaram e quantas estão mortas [94, 95]. Pode-se classificar os ensaios de viabilidade celular de acordo com o tipo de reação sofrida pelas células, tais como, exclusão de corante, ensaios calorimétricos, ensaios fluorimétricos e ensaios luminescentes [95].

O método de ensaio realizado por meio da exclusão de corante baseia-se no princípio de que células viáveis excluem o corante reagente próprio para o ensaio, e células mortas não. Pode-se destacar os seguintes reagentes para esse tipo de ensaio: Azul Tripán, Vermelho Neutro, Eritrosina B, etc. [95].

Os ensaios calorimétricos são desenvolvidos avaliando-se um marcador bioquímico para mensurar a atividade metabólica das células. Os reagentes utilizados apresentam mudança de cor conforme a viabilidade celular, que pode ser mensurada

via espectrofotômetro, podendo-se avaliar também a citotoxicidade de materiais. Pode-se destacar o ensaio MTT, MTS, XTT e LDH dentre os mais utilizados [95, 96].

Pode-se destacar outro mecanismo para avaliação de viabilidade celular, que utiliza fluorescência para análise de marcadores celulares como o ensaio de alamarBlue, Iodeto de Propídeo, SYTO™ 9 e o 5-CFDA, AM. Para a performance do teste deve-se utilizar microscópios de fluorescência, fluorímetros, citômetros de fluxo, etc. [95].

Outro princípio importante para análise de viabilidade celular explora as características luminescentes obtidas a partir de reagentes expostos a culturas celulares para medição de viabilidade e citotoxicidade, como exemplo pode-se destacar o ensaio de ATP que avalia a principal fonte de energia celular [95, 97].

### 3 METODOLOGIA

Neste capítulo é apresentada a metodologia empregada para obtenção de um tecido projetado (compósito) fabricado a partir de um TNT de polipropileno revestido com filme de Cu para obtenção de material com propriedades antivirais e antibacterianas. Apresenta-se todos os ensaios adotados para caracterização morfológica, físico-química e de desempenho. Expõe-se os métodos adotados para projeto e fabricação do dispositivo simulador de respiração para avaliação dinâmica do tecido obtido.

De forma a facilitar o entendimento do roteiro e das técnicas adotadas, pode-se observar a Figura 5 que apresenta um diagrama macro da metodologia adotada neste trabalho.

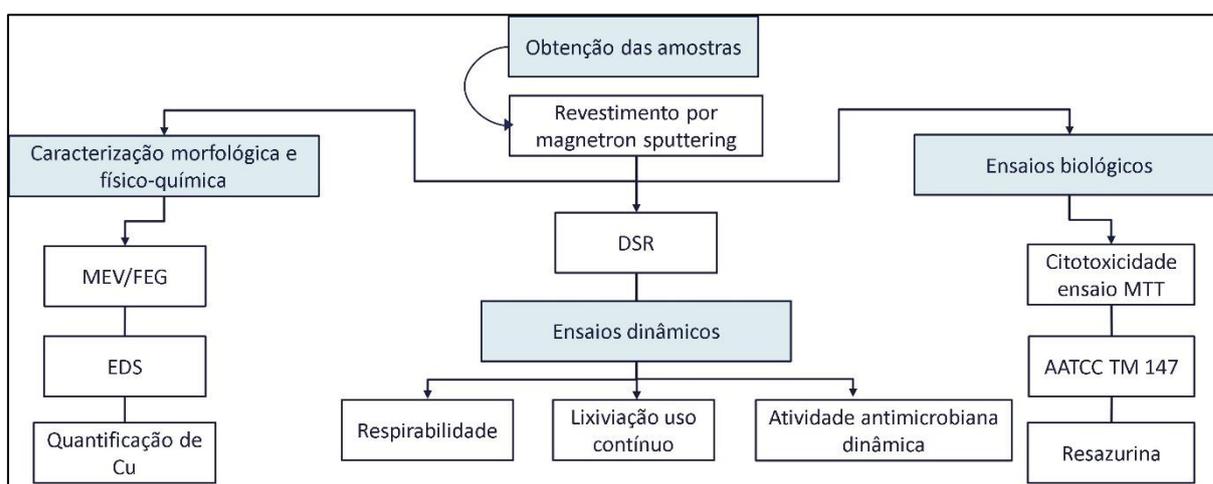


Figura 5 - Diagrama macro de metodologia adotada.

#### 3.1 Preparação do tecido

As amostras para o processo de PVD foram obtidas a partir de um TNT de polipropileno hidrofóbico  $(C_3H_6)_n$ , de gramatura  $148 \text{ g.m}^{-2}$  (dado pela empresa Non Woven Plastic de Cachoeirinha - RS) conforme certificado do tecido apresentado na Figura 29 do Anexo A. As amostras foram cortadas em seção quadrada de  $100 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$  para deposição de Cu no equipamento de magnetron sputtering. Após o processo de PVD, as amostras foram novamente cortadas em seção circular de  $28 \text{ mm}$  de diâmetro (diâmetro útil de  $25 \text{ mm}$ ) para que possam ser testadas conforme metodologia definida.

### 3.2 Deposição de cobre via magnetron sputtering

As amostras de TNT de polipropileno foram submetidas ao processo de PVD via magnetron sputtering no Laboratório de Engenharia de Superfícies e Tratamentos Térmicos I (LESTT I) da UCS para deposição do filme de cobre. Os parâmetros a serem controlados no processo consistem em: pressão de base, pressão de trabalho, vazão de gás na câmara, potência elétrica, temperatura de processo e tempo de exposição ao alvo de cobre.

A fim de obter diferentes concentrações de cobre no substrato, manteve-se constante todos os parâmetros de processo, com exceção do tempo de exposição ao alvo de cobre. Com o estudo de bibliografias de referência, verificou-se que as concentrações de cobre utilizadas em revestimentos para obtenção de propriedades antivirais e antibacterianas crescentes variam entre 2 e 10% em peso [18, 31, 76, 77, 98].

As amostras foram inseridas separadamente no equipamento de magnetron sputtering com 24 h de antecedência ao processo de revestimento para formação de vácuo. Como fonte para o material de deposição, utilizou-se um alvo com 99,95% de Cu. Os parâmetros adotados para o processo foram definidos conforme segue: pressão de base  $1,3 \times 10^{-6}$  mbar, vazão de gás argônio (pureza de 99,9992%) na câmara de 9 SCCM, pressão de trabalho  $5,0 \times 10^{-3}$  mbar e a potência elétrica utilizada de 50 W. Para obter diferentes concentrações de Cu no tecido, variou-se o tempo de exposição conforme definido na Tabela 1. S<sub>000</sub> corresponde à amostra de controle, sem deposição de cobre.

<b>Identificação da amostra</b>	<b>Tempo de exposição (s)</b>
S <sub>000</sub>	0
S <sub>030</sub>	30
S <sub>060</sub>	60
S <sub>120</sub>	120
S <sub>240</sub>	240
S <sub>480</sub>	480
S <sub>960</sub>	960

Tabela 1 - Identificação das amostras revestidas via magnetron sputtering de acordo com o tempo de exposição ao alvo de Cu.

### 3.3 Caracterização do substrato e revestimento

Apresenta-se neste subcapítulo a caracterização adotada para verificação das propriedades morfológicas e físico-químicas do material (substrato e revestimento).

#### 3.3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV/FEG)

Para verificação da morfologia das amostras de polipropileno/cobre obtidas bem como das amostras de controle quanto a macroestrutura das fibras do substrato e do filme nelas depositado, utilizou-se da técnica de microscopia eletrônica de varredura por meio do microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo (MEV/FEG) TESCAN, Mira 3, do Laboratório Central de Microscopia (LCMIC) da UCS.

#### 3.3.2 Espectroscopia de dispersão em energia (EDS)

Junto ao ensaio de microscopia MEV/FEG realizou-se a análise química elementar qualitativa e de distribuição elementar das amostras utilizando-se a espectroscopia de dispersão em energia (EDS) do LCMIC.

#### 3.3.3 Determinação da concentração de Cu

Para mensurar a quantidade de cobre depositada nas amostras, avaliou-se a diferença de massa das mesmas antes e depois do processo de deposição do filme. O procedimento de pesagem foi executado utilizando-se de uma balança de precisão SHIMADZU modelo AUW220D. Para o processo foram adotados os seguintes passos: As amostras foram cortadas conforme definido no item 3.2 e mantidas no dessecador por 24 h para remoção da umidade residual, após a secagem, as amostras foram pesadas e submetidas ao processo de magnetron sputtering para deposição de Cu. Após a deposição, as amostras foram pesadas novamente, registrando-se a diferença de massa antes e depois do processo de deposição, assim obtendo a quantidade de Cu depositada.

Mantendo-se os parâmetros do processo de magnetron sputtering constantes, a taxa de deposição é constante ao longo do tempo [88 - 90], assim para determinar a quantidade de cobre depositada, somente as amostras S<sub>030</sub>, S<sub>240</sub> e S<sub>960</sub> foram

submetidas ao procedimento de pesagem para obtenção da taxa de deposição. A concentração de Cu das amostras S<sub>060</sub>, S<sub>120</sub> e S<sub>480</sub> foi determinada matematicamente.

### 3.4 Ensaios biológicos

Diferentes ensaios biológicos foram realizados para avaliar a eficiência do tecido projetado, dentre eles estão: citotoxicidade e viabilidade utilizando fibroblastos de camundongo L929, avaliação de atividade antimicrobiana frente aos agentes *Escherichia coli* AATCC 25922 do grupo gram-negativo e *Staphylococcus aureus* AATCC 25923 do grupo gram-positivo.

#### 3.4.1 Processo de esterilização

O processo de esterilização adotado para todas as amostras utilizadas nesta seção foi a esterilização por vapor em autoclave (30 min a 121 °C e 110 kPa) conforme procedimento padrão de Diretriz para Desinfecção e Esterilização em Instalações de Saúde do CDC [99].

Para verificação da integridade morfológica do tecido projetado após o processo de esterilização, utilizou-se da técnica de microscopia eletrônica de varredura por meio do microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo (MEV/FEG) TESCAN, Mira 3, do Laboratório Central de Microscopia (LCMIC) da UCS.

#### 3.4.2 Análise de citotoxicidade e viabilidade celular com fibroblastos L929

Para determinar a citotoxicidade das amostras do tecido projetado, foram aplicados métodos padronizados de acordo com a ISO 10993-05 [100] e ISO 10993-12 [101] utilizando-se fibroblastos de camundongo L929. As amostras de tecido utilizadas neste ensaio foram respectivamente: S<sub>000</sub> (controle), S<sub>030</sub>, S<sub>240</sub> e S<sub>960</sub>.

Para obter uma solução de extração, o meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de penicilina/estreptomicina (PS) foi colocado em contato com as amostras: S<sub>000</sub>, S<sub>030</sub>, S<sub>240</sub>, e S<sub>960</sub> durante 24 h a temperatura de 37°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

A citotoxicidade foi avaliada por meio do método indireto MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). Este ensaio baseia-se na redução do MTT

pela enzima mitocondrial desidrogenase de células viáveis, resultando na formação de cristais insolúveis de formazan, processo que não é desenvolvido por células não viáveis [94 - 96].

As células L929 foram plaqueadas em densidade de  $5 \times 10^4$  células.mL<sup>-1</sup> em 100 µL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% FBS e 1% de PS. Após 24 h, tratou-se as células com a solução de extração por 24h. Para comparação, no controle negativo utilizou-se meio de cultura DMEM suplementado com 10% de FBS e 1% de PS e para o controle positivo utilizou-se de DMSO (dimetilsulfóxido) 5% a temperatura de 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após o período de tratamento, o meio foi removido e 1 mg.mL<sup>-1</sup> de MTT foi adicionado aos poços. As placas foram incubadas a 37°C pelo período de 2 h em atmosfera. Em seguida, a solução de MTT foi retirada e os cristais de formazan foram dissolvidos em 100 µL de DMSO. A leitura dos resultados foi realizada no equipamento Espectra Max m2<sup>e</sup>, Molecular Devices e os resultados foram registrados em percentual de viabilidade. A absorbância do controle negativo apresentou 100% de viabilidade e os valores das células tratadas foram calculados a partir do controle. As alterações de viabilidade foram registradas após o período de 24 h.

Para análise da adesão e morfologia, as células L929 foram plaqueadas em densidade  $1 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup> diretamente sob a superfície das amostras de tecido por 24 h. Após, as células foram fixadas com 3% de glutaraldeído em PBS (v/v) por 15 min com subsequente desidratação com 30, 50, 70, 90 e 100% de etanol (v/v) por 10 min. O material foi mantido em dessecador até a análise por MEV/FEG.

### 3.4.3 Avaliação de atividade antimicrobiana pelo procedimento AATCC TM147

A metodologia adotada para avaliação da atividade antimicrobiana do tecido projetado foi baseada nos procedimentos estabelecidos pelas normas NCCLS/CLSI M7 [102] e AATCC TM147 [103] que estão aptas a mensurar de forma qualitativa, a susceptibilidade de agentes bacterianos em suspensão expostas ao mesmo.

Os testes foram executados utilizando amostras do tecido projetado de PP/Cu com diferentes concentrações de Cu, dentre elas, a amostra com maior tempo de exposição S<sub>960</sub>, a com menor tempo de exposição S<sub>030</sub> e o tecido de controle S<sub>000</sub>.

Para preparação da cultura, as cepas de *S. aureus* AATCC 25923 e *E. coli* AATCC 25922 foram descongeladas e cultivadas em meio de cultura PBS líquido e

incubado por 24 h à 37 °C. Posteriormente, as bactérias foram transferidas para placas de petri contendo meio TSB sólido 2% e, incubadas novamente nas mesmas condições.

Como primeiro procedimento para avaliação de atividade antimicrobiana, utilizou-se procedimento padronizado AATCC TM147 [103] conforme segue: foram cultivadas 3 colônias dos respectivos agentes bacterianos (*E. coli* e *S. aureus*) em meio de cultura TSB líquido, que foram incubados a temperatura de 37 °C overnight. Para realização do ensaio, 1 mL do pré inoculo foi transferido para 9 mL de solução PBS, em que se obteve aproximadamente  $10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup>, OD<sub>600</sub> 0,1 lida no equipamento Spectra Max m2<sup>e</sup>, Molecular Devices. Para o ensaio foram utilizadas placas de petri contendo meio TSB 2%, cada placa utilizada recebeu cinco “estrias” na direção horizontal e sentido da esquerda para a direita, que foram feitas com o auxílio de alça embebida na solução bacteriana previamente obtida. Posteriormente, as amostras S<sub>000</sub>, S<sub>030</sub> e S<sub>960</sub> previamente esterilizadas foram acomodadas nas placas, as amostras S<sub>030</sub> e S<sub>960</sub> foram dispostas com o lado revestido com filme de Cu virado para baixo, em contato com o Agar e a bactéria inoculada. Em seguida, as placas foram inseridas em estufa para crescimento bacteriano por 24 h a 37 °C.

Para avaliação de viabilidade das bactérias *E. coli* e *S. aureus* quando expostas ao tecido projetado, utilizou-se de ensaio de fluorescência em solução por meio do kit LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability (invitrogen by Thermo Fisher Scientific), que utiliza Iodeto de Propídeo 3,8-diamino-5-[3-(diethylmethylammonio)propyl]-6-phenyl-, diiodide e SYTO™ 9 Stain como marcadores que monitoram a viabilidade celular de colônias bacterianas em função da integridade da membrana da celular. As células com membrana comprometida que são consideradas mortas ou em processo de morte, apresentam coloração vermelha em microscópio de fluorescência, flourímetros, citômetros de fluxo ou leitor de microplacas, e células com a membrana intacta apresentam coloração verde [95].

Para coloração das bactérias misturou-se uma quantidade igual de iodeto de propídeo e SYTO™ 9 em tubo de microcentrífuga, adicionou-se 3 µL.mL<sup>-1</sup> para corar a solução bacteriana previamente incubada por 24 h sob o material testado, posteriormente foi feita a incubação da solução por 15 min no escuro. Colocou-se 5 µL da suspensão bacteriana corada de cada amostra em lâmina de microscopia para aquisição dos resultados em microscópio de fluorescência Olympus BX43.

#### 3.4.4 Avaliação de atividade antimicrobiana pela técnica de resazurina

Como segundo procedimento para avaliação de atividade antimicrobiana utilizou-se de ensaio de viabilidade com resazurina. A resazurina indica a viabilidade celular mudando de azul para rosa após redução química resultante da respiração aeróbica devido ao crescimento celular. O procedimento foi baseado na literatura atual [104] com adaptações para este trabalho, conforme segue: Em meio de cultura LB líquido (0,05% Triton x-100) foram diluídas colônias das cepas *S. aureus* e *E. coli* para obter  $1 \times 10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup> (OD<sub>600</sub> 0,1), posteriormente realizou-se diluição seriada até obter concentração de aproximadamente de  $1 \times 10^5$  CFU.mL<sup>-1</sup>. Em uma placa de 12 poços foram adicionadas as amostras S<sub>000</sub>, S<sub>030</sub> e S<sub>960</sub>, cada uma recebeu 2 mL da solução bacteriana, juntamente com o controle negativo e controle positivo do meio, em seguida realizou-se a incubação por 24 h a 37 °C. No dia seguinte, 200 µL de cada amostra foram coletadas em uma placa de 96 poços, então mediu-se a turbidez em leitor de microplacas para determinar o crescimento bacteriano de cada poço. Posteriormente, a cada um dos poços foi adicionado 40 µL de resazurina, então os poços contendo a solução bacteriana com marcador foram incubados por 30 min a 37 °C.

#### 3.5 Dispositivo simulador de respiração para ensaio dinâmico de citotoxicidade e viabilidade celular

É necessário elaborar e definir novos procedimentos de teste que possam avaliar máscaras faciais altamente funcionais (com propriedades otimizadas) de forma dinâmica, avaliando o material em condições semelhantes a condição real de uso [23]. Desta forma, um dispositivo simulador de respiração foi projetado com o intuito de avaliar a eficiência do tecido projetado sob condições dinâmicas. O projeto é baseado na norma ASTM F2299 [13], ASTM F2101 [14], NBR 15052 [9] e no projeto INSPIRE da Universidade de São Paulo (USP).

Desenvolveu-se um sistema mecânico capaz de realizar pulsações em um ressuscitador manual que, durante sua compressão, gera um gradiente de pressão positivo no sistema. O ressuscitador manual é conectado em paralelo a jusante a um compressor nebulizador capaz de abastecer o sistema com aerossol viral ou bacteriano, ou apenas aerossol de água para gerar umidade para o sistema,

simulando a respiração humana. Também a jante do ressuscitador, o simulador respiratório possui um porta amostras com área de passagem de  $4,91 \text{ cm}^2$  para teste de tecido.

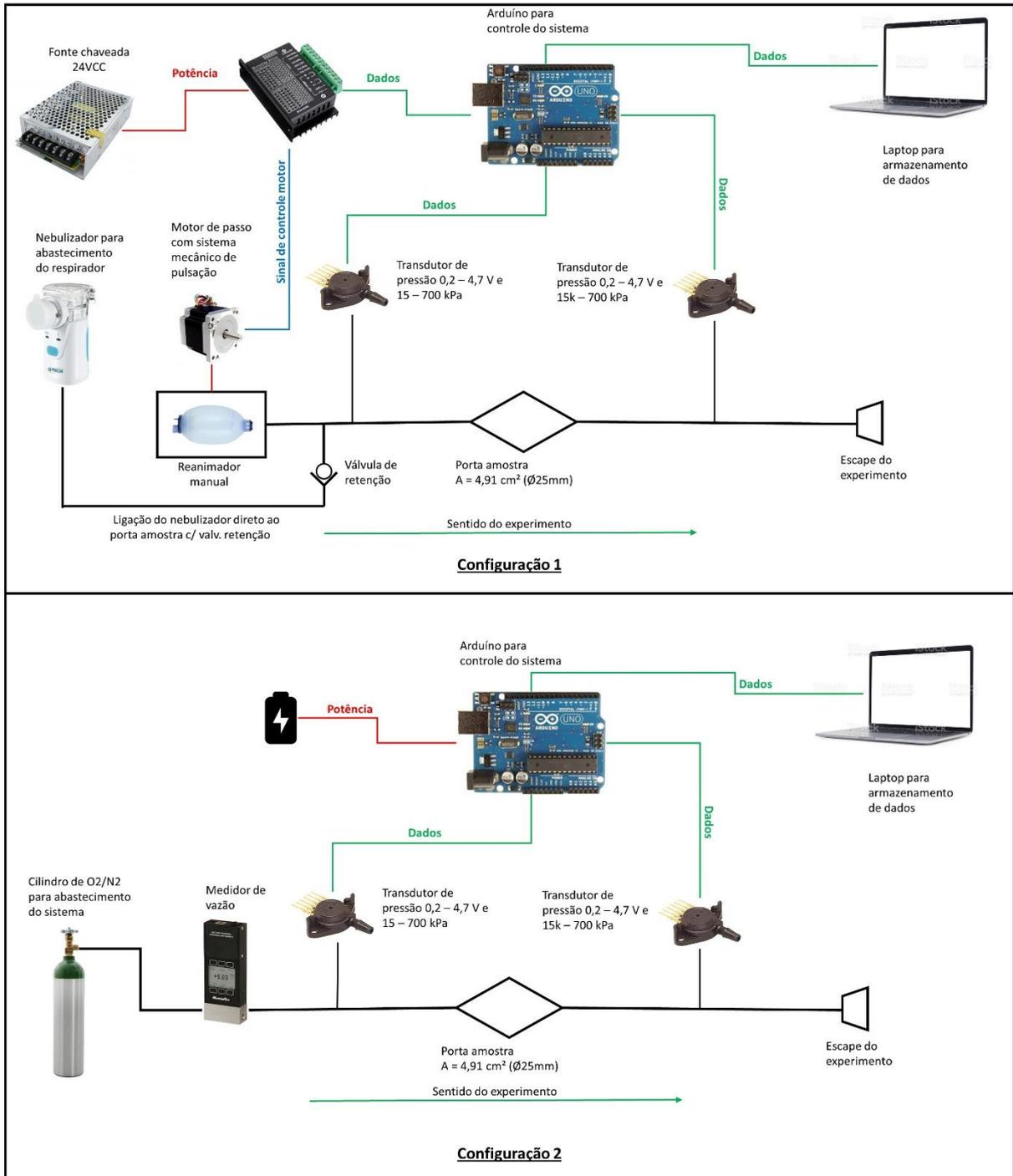


Figura 6 - Representação esquemática do dispositivo simulador de respiração.

A primeira configuração de porta amostras, feita de PP, possui sensores de pressão antes e depois da amostra em relação à direção do experimento, para registrar a perda de pressão (respirabilidade) na amostra durante a simulação de

respiração. A segunda configuração de porta amostras, fabricada em aço inoxidável, destina-se a ensaios dinâmicos de viabilidade celular. Na Figura 6 está o esquema representativo do equipamento, que na configuração 1 é montado e programado para teste dinâmico de viabilidade celular, e na configuração 2 para avaliação da respirabilidade. A Figura 28 do Apêndice A apresenta o diagrama eletrônico do dispositivo simulador de respiração.

O sistema mecânico é composto por um motor de passo NEMA 23 com 1,26 N.m de torque, controlado por uma placa Arduino DUE e um Driver TB6600, cuja programação foi desenvolvida no software Arduino 1.8.13 em linguagem C++ modificada. Foi elaborado um programa cuja lógica controla o motor de passo e driver para repetição dos ciclos de compressão e alívio do reanimador, o programa permite variação de velocidade e tempo de ciclo para controle do gradiente de pressão e vazão de ar. As tomadas de pressão dos sensores são feitas de acordo com um tempo determinado e registradas na porta serial do Arduino, permitindo sua conversão para um documento de texto para pós-processamento.

### **3.6 Avaliação de respirabilidade**

Uma ampla gama de métodos e parâmetros para avaliação de desempenho de tecidos está disponível na literatura [23], a grande maioria é baseada em definições vagas em relação aos parâmetros de teste. Poucos trabalhos estão bem estruturados em normas vigentes, que se aproximam das condições reais de uso para avaliação de eficiência. Assim, para este trabalho, foi utilizado como base um sistema normativo sólido, com condições de teste bem definidas, conforme segue.

Para determinar a respirabilidade do não tecido de PP adotado como substrato, utilizou-se como base a norma ABNT NBR 15052 [9] e o dispositivo simulador de respiração fabricado para realizar o ensaio. O porta amostras para fixação do tecido possui área de passagem de  $4,91 \text{ cm}^2$  ( $\varnothing 25 \text{ mm}$ ), foi utilizado um fluxo constante de  $\text{N}_2$  igual a  $8 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ . Os resultados (tomadas de pressão) foram obtidos a cada 50 ms em intervalo de 15 s pelo dispositivo simulador de respiração, e posteriormente registrados em documento de texto para pós-processamento.

### 3.7 Avaliação de lixiviação por uso contínuo

Para avaliar a adesão do filme de Cu ao tecido, foi elaborado um teste baseado nas indicações do CDC quanto ao uso de máscaras descartáveis por até 4 h, ou até que estejam úmidas [105, 106]. O cobre depositado no TNT não deve ser lixiviado pela respiração do usuário durante o período de uso, para que a máscara possa exercer seu efeito tóxico contra agentes nocivos à saúde. Para avaliação completa, definiu-se testar um lote completo de amostras depositadas ( $S_{030}$ ,  $S_{060}$ ,  $S_{120}$ ,  $S_{240}$ ,  $S_{480}$  e  $S_{960}$ ), mais a amostra controle ( $S_{000}$ ).

Os parâmetros de ensaio, vazão e área de passagem foram definidos conforme ABNT NBR 15052 [9] da seguinte forma: área da amostra de  $4,91 \text{ cm}^2$  (seção circular de 25mm), vazão de ar intermitente de  $8 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ . As amostras foram pesadas em balança de precisão SHIMADZU modelo AUW220D antes do teste para registro do massa da amostra mais o filme de Cu depositado. Após a pesagem, as amostras foram submetidas ao ciclo de teste com o dispositivo simulador de respiração, que foi configurado para realizar ciclos de 4 h (de acordo com o tempo máximo de uso de máscara descartável definido pelo CDC [105, 106]), realizando e pulsos de pressão e alívio na linha/amostra, simultaneamente com a pulverização de umidade gerada pelo nebulizador, buscando aproximar condições reais de uso. Após os ciclos de teste do dispositivo simulador de respiração, as amostras foram secas ao ar e inseridas no dessecador por 48 h para garantir a remoção completa da umidade, em seguida, foram pesadas novamente para verificar a perda de filme de Cu causada pela simulação de respiração do usuário. Cada amostra foi testada em triplicata para maior confiabilidade dos dados obtidos.

### 3.8 Avaliação dinâmica de atividade antimicrobiana

Para avaliação de desempenho do tecido projetado em condições dinâmicas, planejou-se um experimento baseado na norma ASTM F2101 [14] por meio do dispositivo simulador de respiração. O experimento objetivou-se a avaliar a viabilidade celular da bactéria *E. coli* após ser submetida a ciclos dinâmicos de respiração no dispositivo simulador, passando pelo porta amostras que contém o tecido projetado na concentração  $S_{960}$  e o tecido de controle  $S_{000}$ , ambos previamente esterilizados. O objetivo do experimento é aproximar a condição real de uso de uma máscara facial

simulando a inoculação do agente bacteriano *E. coli* e, mensurar a sua integridade após passar pelo tecido.

Para preparação da cultura, a cepa de *E. coli* AATCC 25922 foi descongelada e cultivada em ágar por 24 h à 37 °C. Após o cultivo, três colônias foram transferidas para 10 mL de PBS, onde obteve-se concentração de  $1 \times 10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup> (OD<sub>600</sub> 0,1). Em seguida, a solução foi diluída em PBS (Triton x-100 0,05%) até obter concentração de aproximadamente de  $1 \times 10^5$  CFU.mL<sup>-1</sup>. Foi realizado o plaqueamento da solução bacteriana em diluição seriada antes do ensaio dinâmico para determinar a concentração bacteriana inicial. 100 µL de cada diluição foram adicionados a placas de petri contendo meio TSB 2% e espalhadas com auxílio de uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas por 24 h a 37 °C.

O ensaio foi realizado em cabine de segurança biológica classe II B - 2 da marca FILTERFLUX, modelo SBIIB2 - 1266/4. Todas as partes em contato com as colônias foram previamente esterilizadas e inseridas na cabine de segurança. Para o teste realizado, definiram-se os parâmetros do fluxo de ar utilizado como veículo do ensaio de acordo com a norma ASTM F2101 [14] e ABNT NBR 15052 [9] conforme segue: vazão de 8 L.min<sup>-1</sup> (intermitente), pressão máxima durante a compressão 0,6 mH<sub>2</sub>O. A vazão da solução contendo a bactéria *E.coli* nebulizada foi definida em aproximadamente 100 µL.min<sup>-1</sup> na concentração de  $1 \times 10^5$  CFU.mL<sup>-1</sup>. O aerossol bacteriano produzido foi conduzido em direção às amostras de tecido pelo fluxo de ar utilizado como veículo. Após passar pelas amostras de tecido testadas, o fluxo de ar carregando a bactéria *E. coli* foi conduzido a tubos de coleta previamente esterilizados para armazenamento da solução condensada. O ensaio foi realizado de forma a garantir a coleta de um volume mínimo de aproximadamente 300 µL de solução para cada amostra testada. Cada amostra foi testada em duplicata.

Parte da solução condensada durante cada ciclo foi destinada ao ensaio de viabilidade celular por fluorescência utilizando-se do kit LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability, o procedimento para coloração da solução bacteriana foi executado conforme metodologia definida no 3.4.3. Outra parte da solução condensada foi plaqueada em diluição seriada, das quais 100 µL foram dispostos em placas de petri contendo meio TSB 2% e espalhadas com auxílio de uma alça de Drigalski. Posteriormente, foram incubadas por 24 h a 37 °C para realização do procedimento de contagem de colônias bacterianas resultante.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo são apresentados os resultados e discussões obtidos a partir da metodologia de fabricação e teste do tecido projetado, bem como do dispositivo simulador de respiração.

### 4.1 Obtenção das amostras piloto e revestimento via magnetron sputtering

As amostras foram obtidas a partir do corte do TNT de PP em seções quadradas de 100 mm x 100 mm, conforme estabelecido na metodologia deste trabalho. Após o corte, as amostras foram fixadas separadamente em porta amostras do equipamento de magnetron sputtering, conforme a Figura 7.

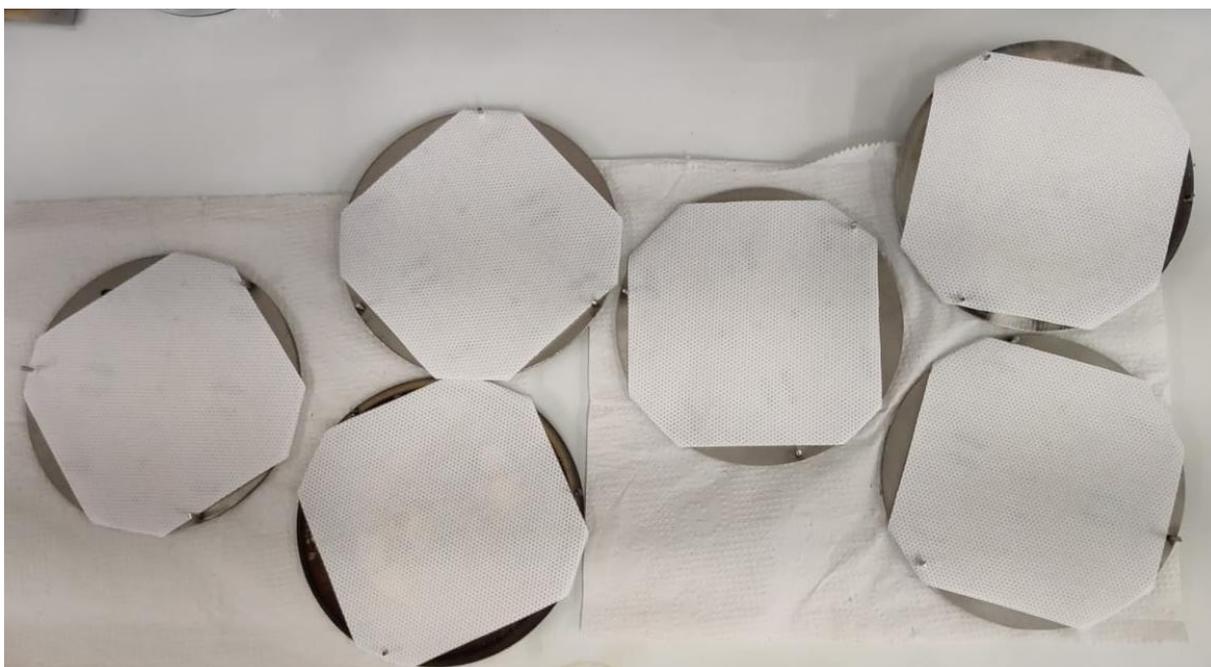


Figura 7 - Fixação das espécies nos porta amostras para processo de PVD.

Após a fixação, as amostras foram inseridas na câmara do equipamento 24 h antes da realização da deposição de Cu para formação de alto vácuo, conforme a Figura 8.

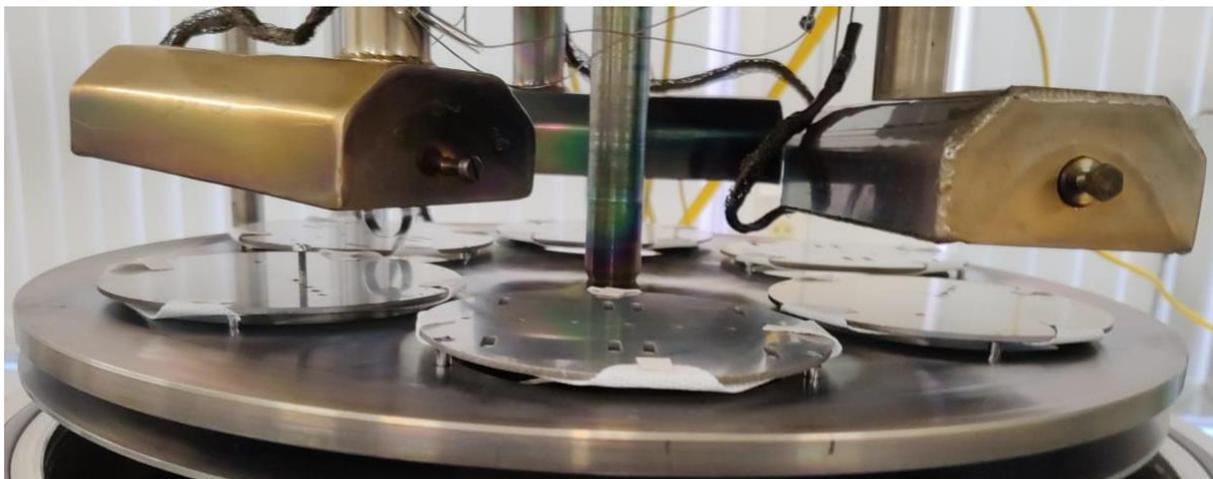


Figura 8 - Porta amostras fixos na câmara de magnetron sputtering.

A partir dos parâmetros estabelecidos para deposição do filme na metodologia deste trabalho, foram obtidos os resultados da deposição conforme Figura 9.

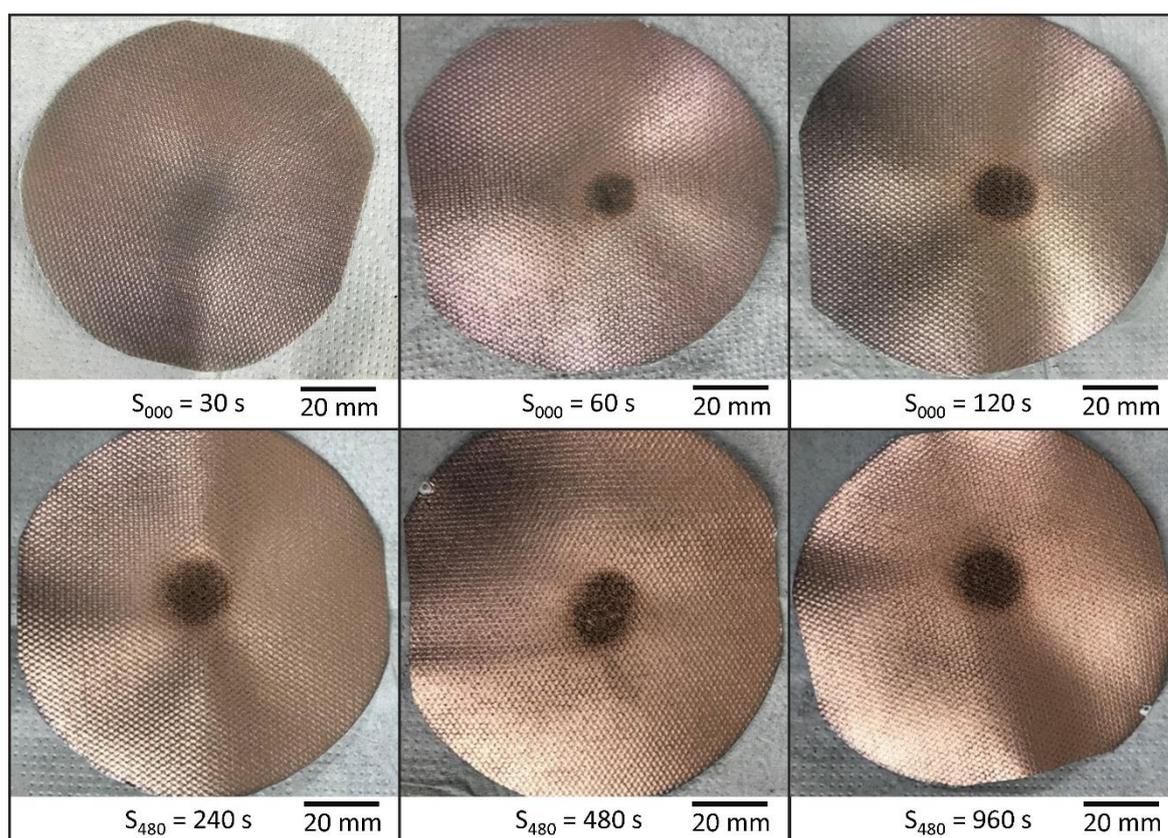


Figura 9 - Amostras de não tecido de polipropileno revestidas com filme de cobre via magnetron sputtering.

Uma primeira análise visual das amostras permite a detecção crescente de deterioração do substrato polimérico conforme o aumento do tempo de exposição ao plasma de Ar. A região central degradada não foi utilizada para as análises realizadas neste trabalho, utilizou-se somente partes adjacentes, com aspecto homogêneo. As

amostras S<sub>030</sub> e S<sub>060</sub> apresentam baixa deterioração central em comparação as demais. A coloração do revestimento torna-se mais intensa conforme o tempo de exposição ao alvo de Cu aumenta.

## 4.2 Caracterização do substrato e revestimento

### 4.2.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV/FEG)

Os resultados obtidos a partir da técnica de microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEV/FEG) para verificação da morfologia das amostras permitem concluir que o processo de deposição de cobre produziu filmes homogêneos na superfície do TNT. Nas Figuras 10 e 11, a amostra S<sub>000</sub> representa o tecido de controle, que não foi submetido ao processo de PVD, que apresenta coloração mais escura, indicando composição química predominante de elementos com menor número atômico (Z) da tabela periódica. Sendo a fórmula molecular do TNT (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>)<sub>n</sub>, a coloração escura observada na amostra S<sub>000</sub> diz respeito ao C de sua composição. As amostras exibidas na Figura 10, organizadas sequencialmente conforme o tempo de exposição ao alvo de Cu, apresentam alteração gradual de sua coloração para tons mais claros indicando tendência qualitativa de aumento da quantidade de Cu na composição do material, que é proporcional ao tempo de exposição ao alvo de deposição. Como consequência, a porosidade característica da estrutura do tecido projetado é alterada conforme o tempo de exposição ao alvo devido a tendência de aumento de Cu na superfície das fibras, conseqüentemente o tamanho médio dos poros é passível de alteração. Porém, qualitativamente, não foram observadas diferenças significativas na porosidade das amostras revestidas quando comparadas a amostra de controle pela análise visual.

De forma resumida, analisando-se os resultados obtidos pela técnica de microscopia eletrônica das amostras revestidas, entende-se que o processo de deposição de filme de cobre por magnetron sputtering foi satisfatório. Verifica-se também que, a quantidade de cobre depositado é proporcional ao tempo de exposição ao alvo e, o espessamento aparente das fibras indica um recobrimento uniforme de sua superfície.

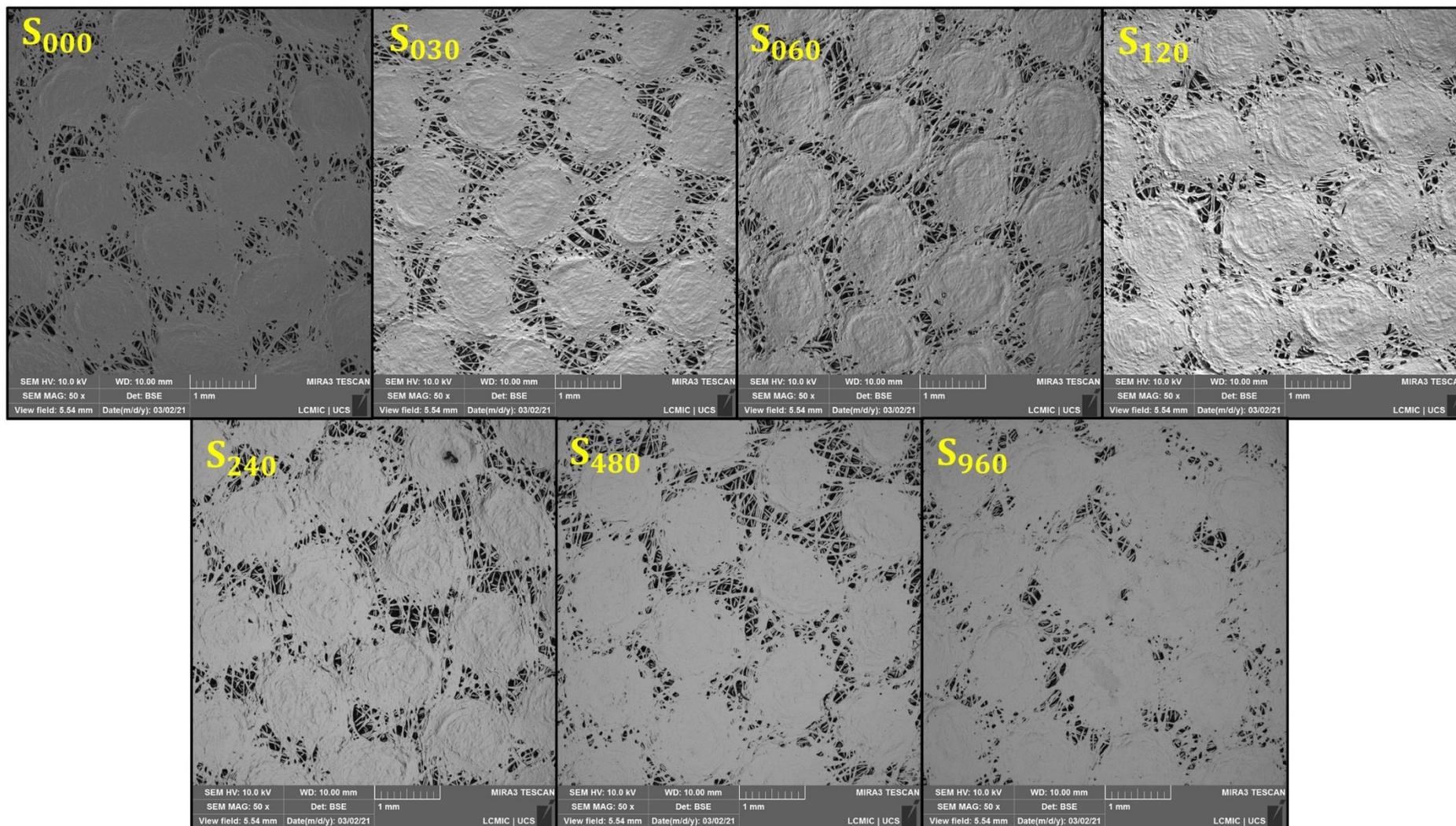


Figura 10 - Imagens de MEV/FEG com ampliação de 50x das amostras S<sub>000</sub>, S<sub>030</sub>, S<sub>060</sub>, S<sub>120</sub>, S<sub>240</sub>, S<sub>480</sub> e S<sub>960</sub>.

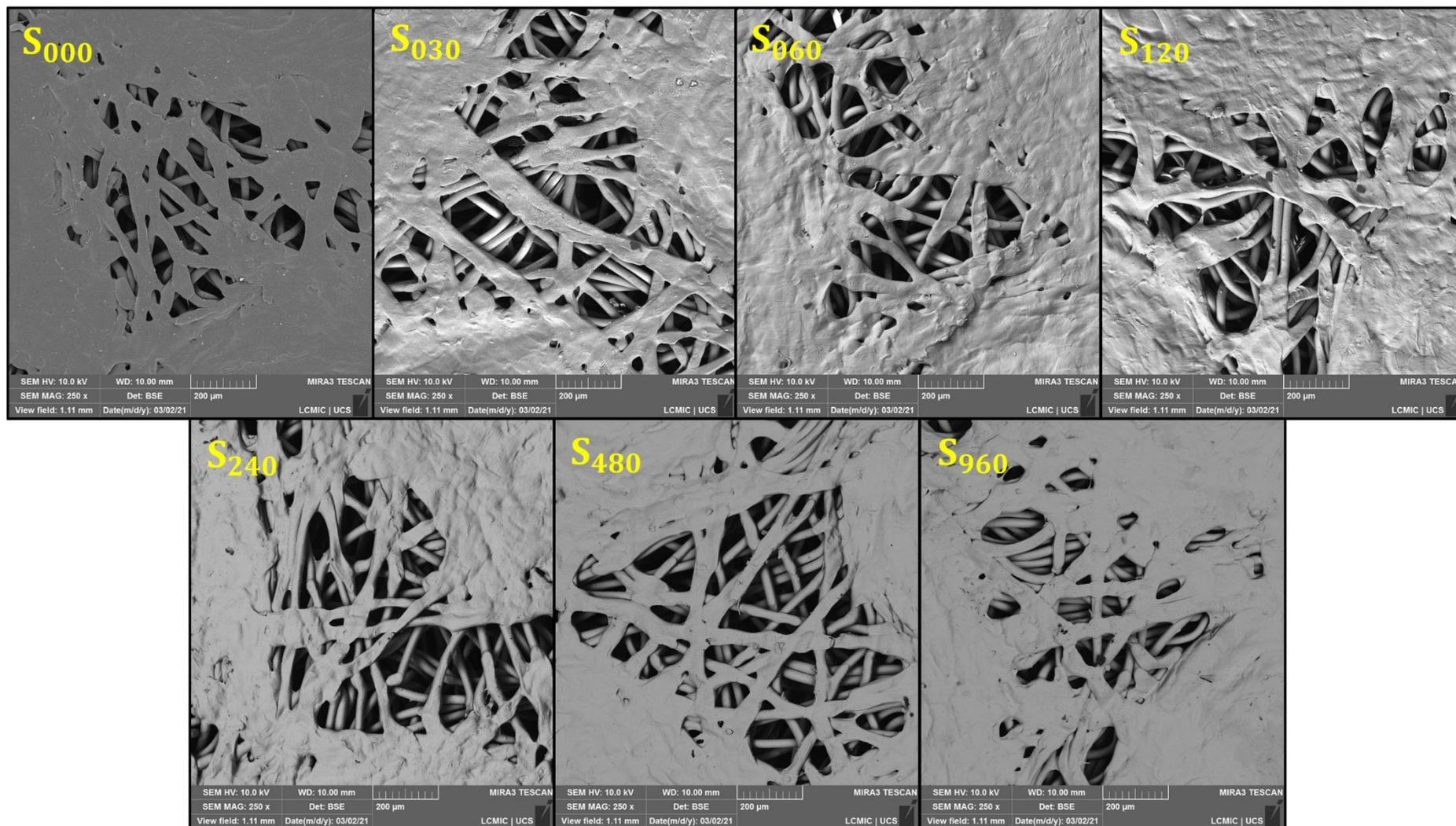


Figura 11 - Imagens de MEV/FEG com ampliação de 250x das amostras S000, S030, S060, S120, S240, S480 e S960.

#### 4.2.2 Espectroscopia de dispersão em energia (EDS)

Juntamente com os resultados da técnica de microscopia eletrônica (MEV/FEG), obteve-se os resultados da técnica de espectroscopia de dispersão em energia (EDS) para análise química qualitativa e de distribuição elementar.

A Figura 12 apresenta de forma comparativa as imagens obtidas a partir do ensaio de EDS, ao analisar a amostra  $S_{000}$ , observa-se que a mesma apresenta espectro de cores predominante na coloração ciano e verde, indicando C e O em sua estrutura. Observa-se também que, o material base possui Ca e Ti em sua composição, provenientes do processo de fabricação do TNT.

As amostras estão organizadas na Figura 12 conforme o tempo de exposição ao alvo. A amostra  $S_{030}$ , quando comparada a  $S_{000}$  de controle, apresenta pequena alteração de coloração, indicando que a quantidade de Cu depositada é baixa. Já a amostra  $S_{960}$  quando comparada com a  $S_{000}$ , apresenta coloração mais acentuada em direção ao tom alaranjado, indicando tendência de aumento na quantidade de Cu devido ao tempo de exposição mais elevado, que compactua com os resultados esperados.

Desta forma, pode-se concluir que, a alteração gradual de coloração das amostras indica tendência qualitativa de aumento na quantidade de Cu depositada pelo processo de PVD, que é diretamente proporcional ao tempo de exposição.

#### 4.2.3 Determinação da concentração de Cu

A concentração de cobre depositada nas amostras e a taxa de deposição foi determinada conforme metodologia definida anteriormente. Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 2. A partir da concentração de Cu das amostras  $S_{030}$ ,  $S_{240}$  e  $S_{960}$  obtidas experimentalmente, determinou-se a concentração das amostras  $S_{060}$ ,  $S_{120}$  e  $S_{480}$  matematicamente. A taxa média de deposição do filme de cobre foi calculada em aproximadamente  $3,11 \mu\text{g}\cdot\text{s}^{-1}$ .

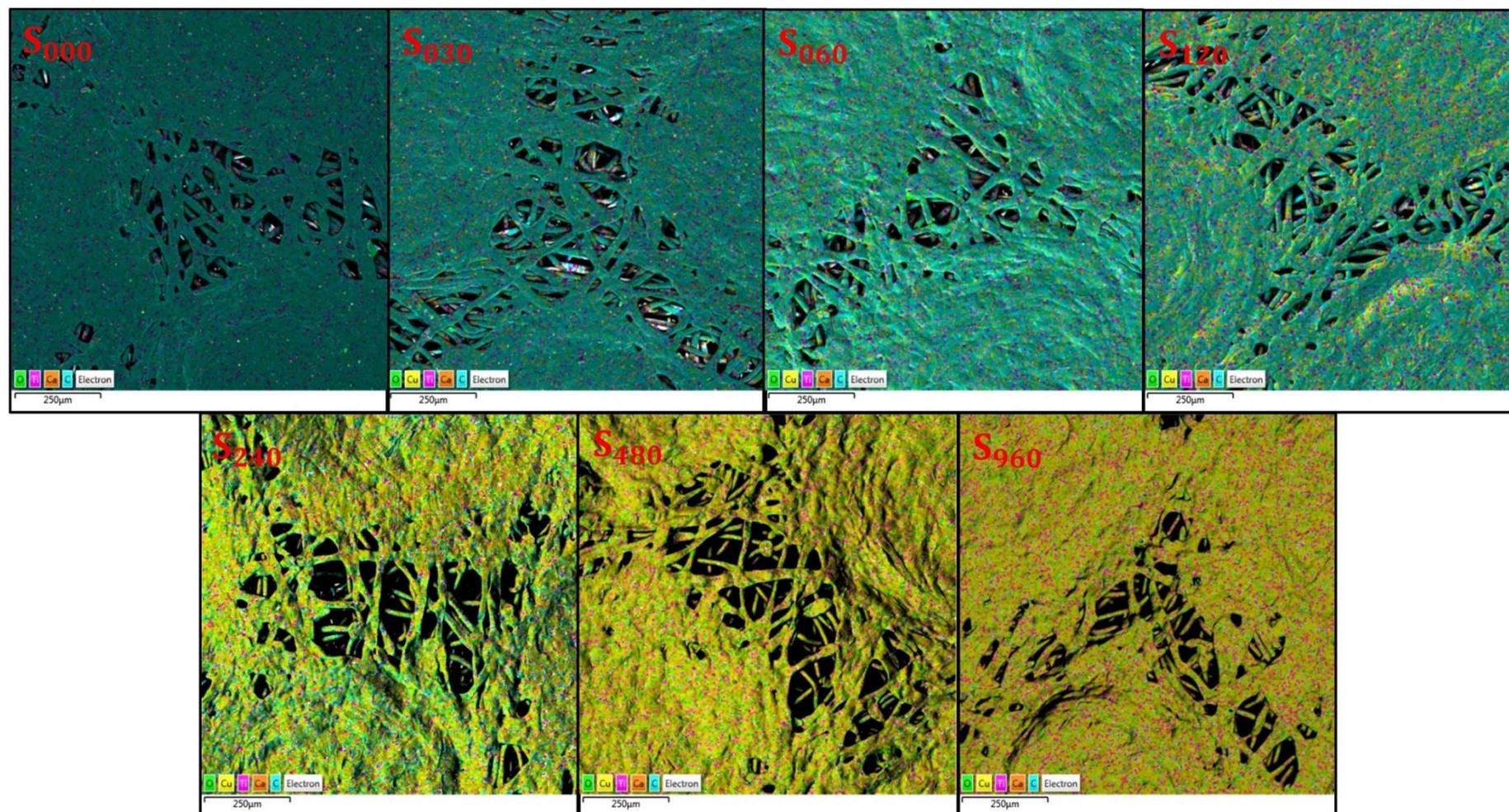


Figura 12 - Imagens de EDS com mapa de composição qualitativo das amostras S<sub>000</sub>, S<sub>030</sub>, S<sub>060</sub>, S<sub>120</sub>, S<sub>240</sub>, S<sub>480</sub> e S<sub>960</sub>.

Tempo de exposição (s)	%Cu (w/w)
0	0
30	0,07 ± 0,02
60*	0,21
120*	0,49
240	1,05 ± 0,12
480*	2,11
960	4,24 ± 0,73

Tabela 2 - Concentração de Cu obtida. O montante de Cu depositado nas amostras com \* foi obtido matematicamente.

Conforme a literatura, o intervalo de concentração de cobre em que observa-se aumento significativo do efeito tóxico do material, proporcionando efeito antiviral e antibacteriano, encontra-se entre 2 e 10% m/m [18, 31, 76, 77, 98], que é atingida pelas amostras S<sub>480</sub> e S<sub>960</sub>. A Figura 13 apresenta a curva de tendência ajustada linearmente, obtida conforme a metodologia adotada.

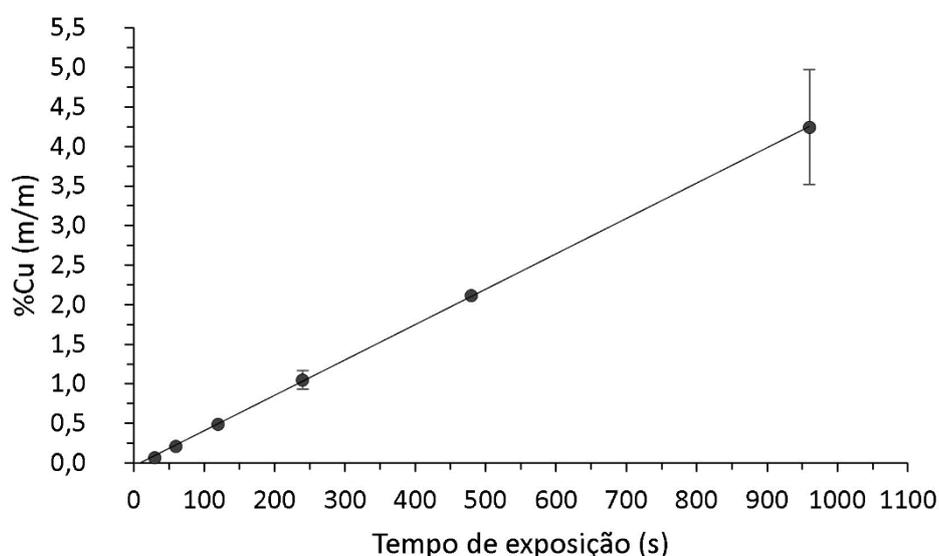


Figura 13 - Concentração de Cu de S<sub>030</sub>, S<sub>060</sub>, S<sub>120</sub>, S<sub>240</sub>, S<sub>480</sub> e S<sub>960</sub> com erro percentual calculado para as amostras que foram quantificadas experimentalmente, e, a curva de tendência ajustada linearmente para todas.

### 4.3 Ensaios biológicos

#### 4.3.1 Processo de esterilização

Para verificação da integridade morfológica do tecido projetado após o processo de esterilização com vapor em autoclave, utilizou-se da técnica de

microscopia eletrônica de varredura (MEV/FEG) conforme definido na metodologia deste trabalho.

A partir dos resultados apresentados na Figura 14, é possível observar que o processo de esterilização adotado não danifica a morfologia do tecido, uma vez que, não foram constatados danos aparentes nas fibras do material, sendo o processo passível de utilização sem quaisquer prejuízos nos resultados biológicos conseguintes.

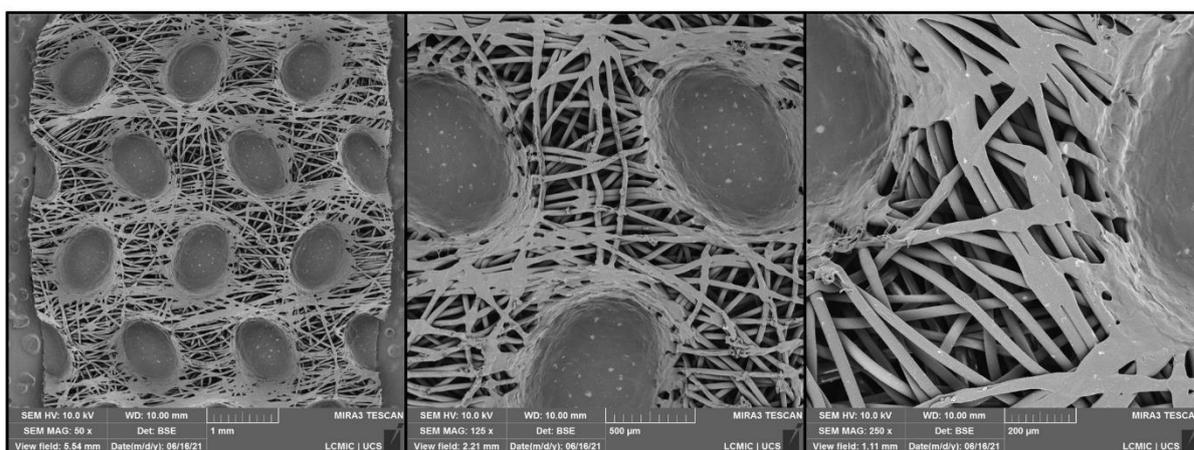


Figura 14 - Imagens de MEV/FEG em ampliação de 50x, 125x e 250x da amostra  $S_{000}$  após processo de esterilização por vapor em autoclave.

#### 4.3.2 Análise de citotoxicidade e viabilidade celular com fibroblastos L929

A citotoxicidade foi avaliada utilizando fibroblastos de camundongo L929 de acordo com os procedimentos estabelecidos na metodologia deste trabalho. Os testes foram executados avaliando-se amostras do tecido projetado de PP/Cu com diferentes concentrações de Cu, dentre elas, a amostra com menor tempo de exposição  $S_{030}$ , tempo de exposição intermediário  $S_{240}$  e maior tempo de exposição  $S_{960}$ . De acordo com a norma ISO 10993-05 [100], um material apresenta efeito citotóxico quando a viabilidade celular das amostras em contato apresenta um índice de redução superior a 30% após 24 h de exposição. Observando-se os resultados obtidos no ensaio MTT na Figura 15, as amostras  $S_{000}$  e  $S_{030}$  não apresentam efeito citotóxico, apresentando redução de viabilidade inferior a 30% para os fibroblastos de camundongo L929 após 24 h, conforme ISO 10993-05 [100]. As amostras  $S_{240}$  e  $S_{960}$  apresentaram efeito citotóxico superior, porém, aceitável para o período de 24 h, mesmo que haja redução superior a 30%. Considera-se que a máscara não deve ser utilizada por mais de 4 h

conforme recomendações do CDC [105, 106] e, que o tecido revestido deve ser utilizado como camada intermediária de forma a evitar o contato direto com a pele do usuário.

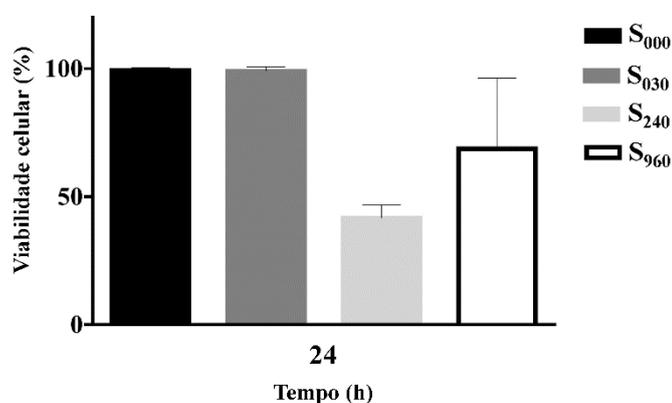


Figura 15 - Efeito citotóxico obtido pelo teste indireto MTT de acordo com a ISO 10993-05 [100] e 10993-12 [101] para a linhagem L929 de fibroblastos de camundongo.

A Figura 16 demonstra os resultados obtidos pela técnica MEV/FEG para análise de alterações de morfologia celular da linhagem L929 pelo período de 24 h conforme metodologia definida anteriormente.

Na Figura 16 é possível observar que as células L929 plaqueadas nas amostras S<sub>000</sub> e S<sub>030</sub> para o período de 24 h apresentam membranas regulares e morfologia celular intacta, também células com formato fusiforme ou alongado, indicando características saudáveis e elevada viabilidade celular para as células observadas conforme literatura [107, 108].

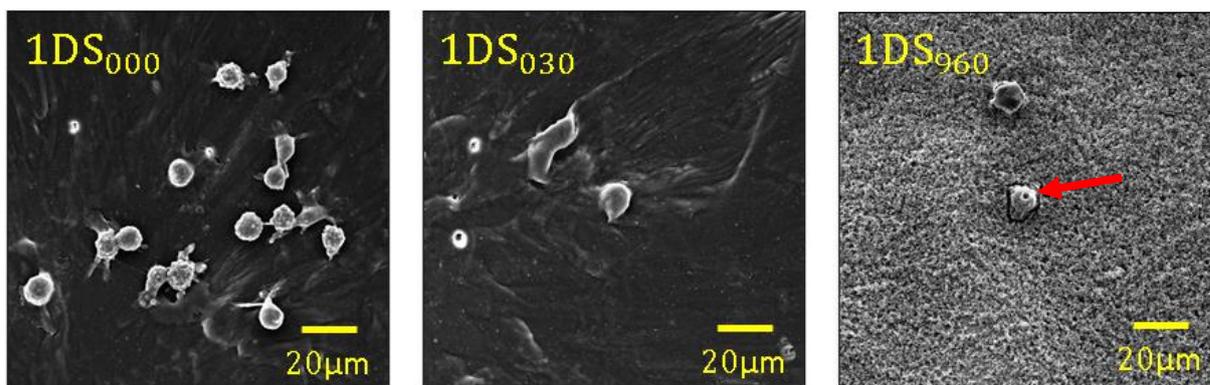


Figura 16 - MEV/FEG das amostras S<sub>000</sub>, S<sub>030</sub> e S<sub>960</sub> após 1 (1D), 2 (2D) e 7 (7D) dias.

Na Figura 16 é possível observar que as células L929 plaqueadas na amostra S<sub>960</sub> apresentam membrana celular danificada, com aspecto rugoso, alterações de morfologia e células “explodidas”. Nas amostras 1DS<sub>960</sub> constata-se a existência de

buracos na membrana celular, assinalado pela seta em vermelho, que aponta para o rompimento da membrana celular e, aniquilação da cultura, que compactua com a baixa viabilidade celular apresentada na Figura 15 para a amostra S<sub>960</sub>.

#### 4.3.3 Avaliação de atividade antimicrobiana pelo procedimento AATCC TM147

A metodologia definida anteriormente para avaliação da atividade antibacteriana do tecido permitiu a obtenção de resultados qualitativos. As Figuras 17 e 18 apresentam os resultados obtidos após a realização do ensaio de avaliação de atividade antimicrobiana de tecidos conforme padrões estabelecidos pela AATCC TM147 [103] utilizando as cepas de *S. aureus* AATCC 25923 e *E. coli* AATCC 25922.

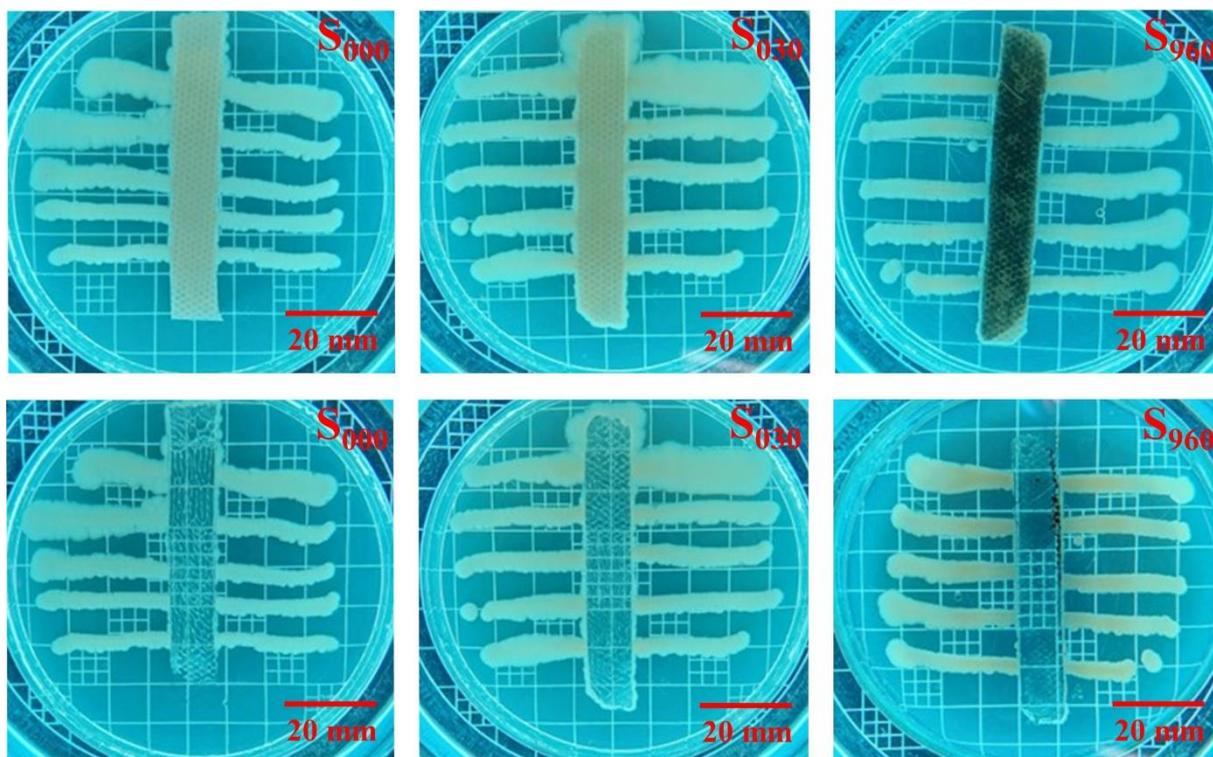


Figura 17 - Preparação dos poços para avaliação qualitativa de atividade antimicrobiana dos tecidos projetados S<sub>000</sub>, S<sub>030</sub> e S<sub>960</sub> conforme procedimento AATCC TM147 [103] utilizando a cepa *S.aureus*.

Nas Figuras 17 e 18, nas placas que contém a amostra S<sub>000</sub> é possível observar que há crescimento das colônias de forma acentuada abaixo do tecido em contato direto com sua superfície e, ao redor do material, ou seja, sem formação de halo. Em complemento, a Figura 19 apresenta os resultados após a coloração das cepas *S. aureus* com o kit LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability e captura dos resultados em microscópio de fluorescência, ambos resultados indicam que não há inibição

significativa do crescimento das colônias, ou seja, pode-se observar que não há atividade antibacteriana significativa para o controle em relação as cepas utilizadas para o teste.

As espécies  $S_{030}$  e  $S_{960}$  foram testadas com o lado que possui o filme de Cu virado para baixo, em contato com a solução e com as colônias. Para as placas que contém a amostra  $S_{030}$  nas Figuras 17 e 18, é possível observar que a inibição do crescimento das colônias na região em contato com a superfície do tecido que possui o filme de Cu é qualitativamente maior quando comparado a  $S_{000}$ , que indica aumento de atividade antibacteriana em relação ao controle. Em complemento, observa-se que não há formação de halo, que indica que não há lixiviação significativa do filme para o meio. Na Figura 19, para a amostra  $S_{030}$ , é possível observar que houve crescimento das colônias, porém com grande quantidade de colônias mortas ou lesadas de forma irreversível, indicando aumento de atividade antibacteriana em comparação a  $S_{000}$ .

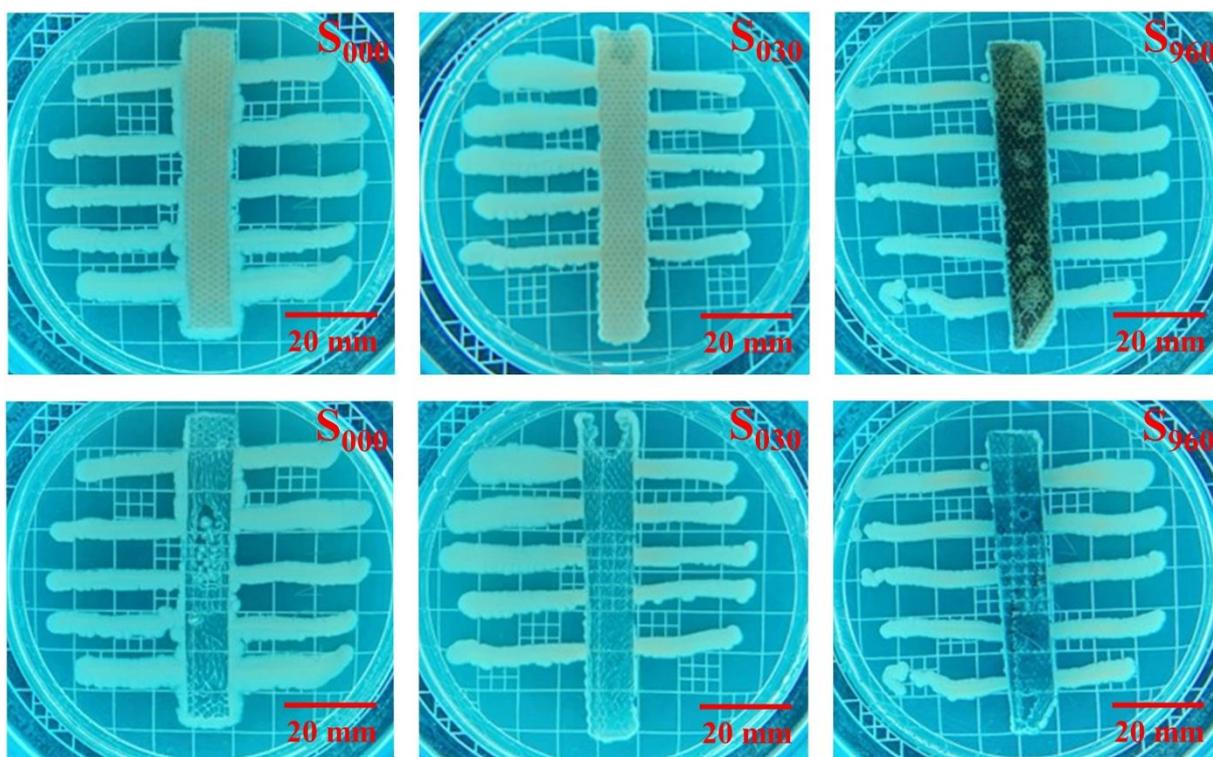


Figura 18 - Preparação dos poços para avaliação qualitativa de atividade antimicrobiana dos tecidos projetados  $S_{000}$ ,  $S_{030}$  e  $S_{960}$  conforme procedimento AATCC TM147 [103] utilizando a cepa *E.coli*.

Para as placas que contém a amostra  $S_{960}$  nas Figuras 17 e 18, é possível observar que a inibição do crescimento das colônias na região em contato com a superfície do tecido que possui o filme de Cu é qualitativamente maior quando comparado a  $S_{000}$  e a  $S_{030}$ , indicando atividade antibacteriana mais expressiva em

relação ao controle e a S<sub>030</sub>. Pôde-se verificar a formação de uma região esverdeada/azulada ao redor do material, sendo possível oxidação do cobre Cu<sup>2+</sup> para óxido cúprico CuO, para esta análise o efeito foi considerado como não significativo, uma vez que, o mesmo também possui atividade antibacteriana [18].

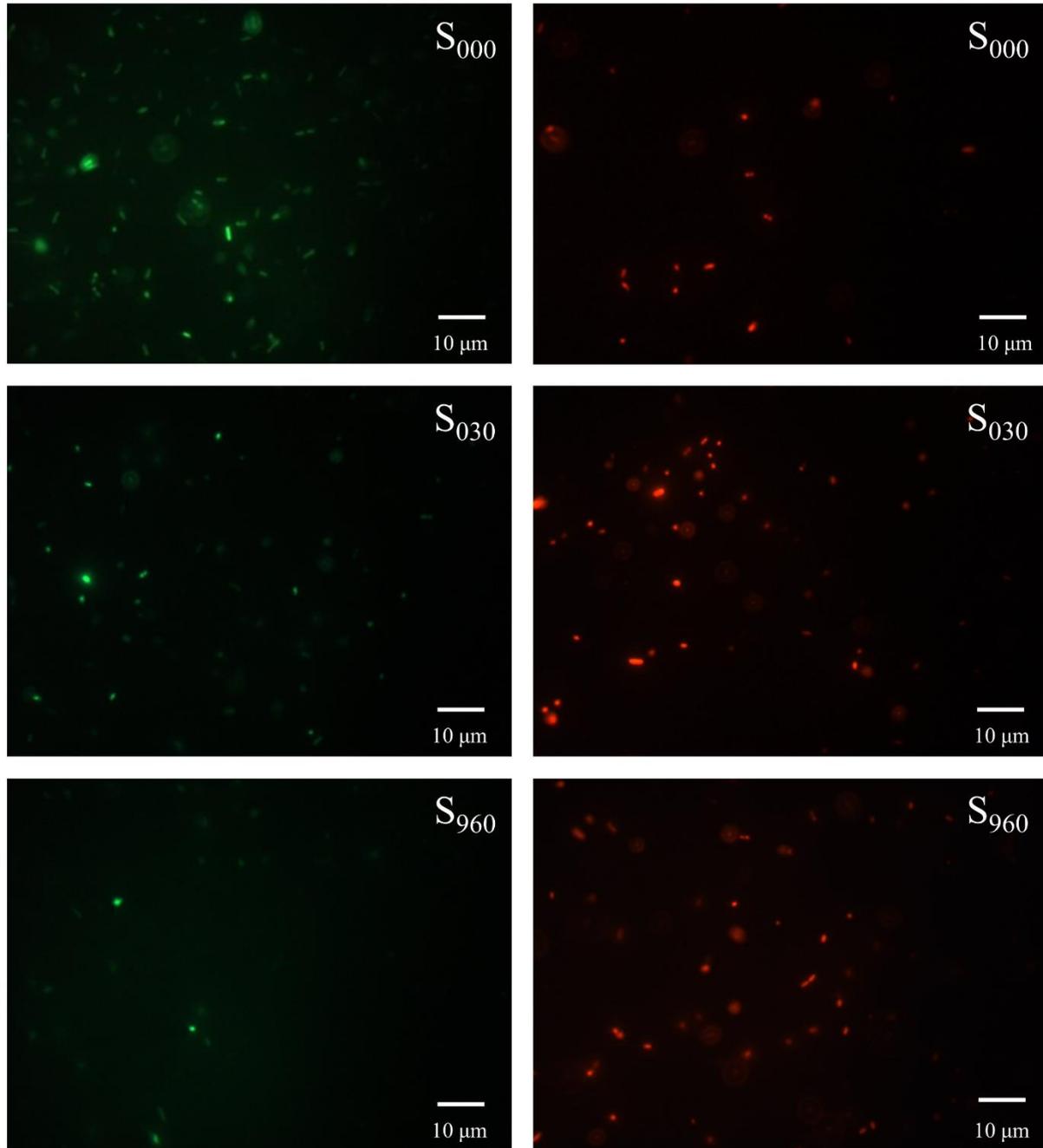


Figura 19 - Técnica de fluorescência para avaliação qualitativa de atividade antimicrobiana dos tecidos projetados S<sub>000</sub>, S<sub>030</sub> após coração das colônias com LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability kit da cepa *S. aureus*.

Na Figura 19, para a amostra S<sub>960</sub>, é possível observar que o crescimento das colônias foi inferior quando comparado a S<sub>000</sub> e a S<sub>030</sub> e, as poucas colônias que

prosperaram, em sua grande maioria, foram mortas ou lesadas de forma irreversível, indicando atividade antibacteriana mais expressiva. Contudo, não há formação de halo, apontando que o efeito tóxico do material prevalece no contato com a superfície que possui o filme de Cu. Fica claro a influência do Cu na superfície do tecido, bem como de sua concentração para as amostras  $S_{030}$  e  $S_{960}$  em relação a desativação e inibição de crescimento das cepas *S. aureus* e *E. coli*.

#### 4.3.4 Avaliação de atividade antimicrobiana pela técnica de resazurina

As Figuras 20 e 21 apresentam os resultados qualitativos do ensaio de viabilidade celular com resazurina, utilizando as culturas *S. aureus* e *E. coli* após exposição ao tecido projetado nas concentrações  $S_{000}$ ,  $S_{030}$  e  $S_{960}$ , mais o meio de controle positivo e negativo e posterior coloração com resazurina para avaliação de atividade antimicrobiana, conforme definido na metodologia deste trabalho.

Observando-se os poços que contém a amostra  $S_{000}$  nas Figuras 20 e 21, identifica-se uma coloração rosa intensa, semelhante ao controle positivo do meio, provocado pela respiração aeróbica das colônias indicando elevada atividade celular e crescimento das colônias, apontando, de forma qualitativa, baixa atividade antimicrobiana da amostra  $S_{000}$ .

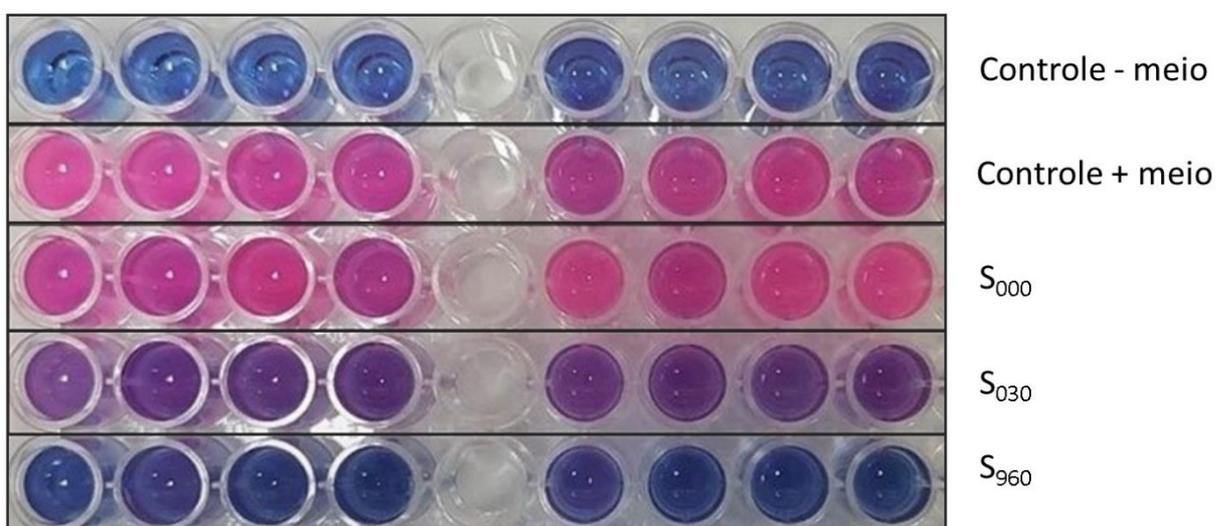


Figura 20 - Ensaio de resazurina de solução bacteriana da cepa *S. aureus* exposta ao tecido projetado nas concentrações  $S_{000}$ ,  $S_{030}$  e  $S_{960}$  mais controle positivo e negativo do meio.

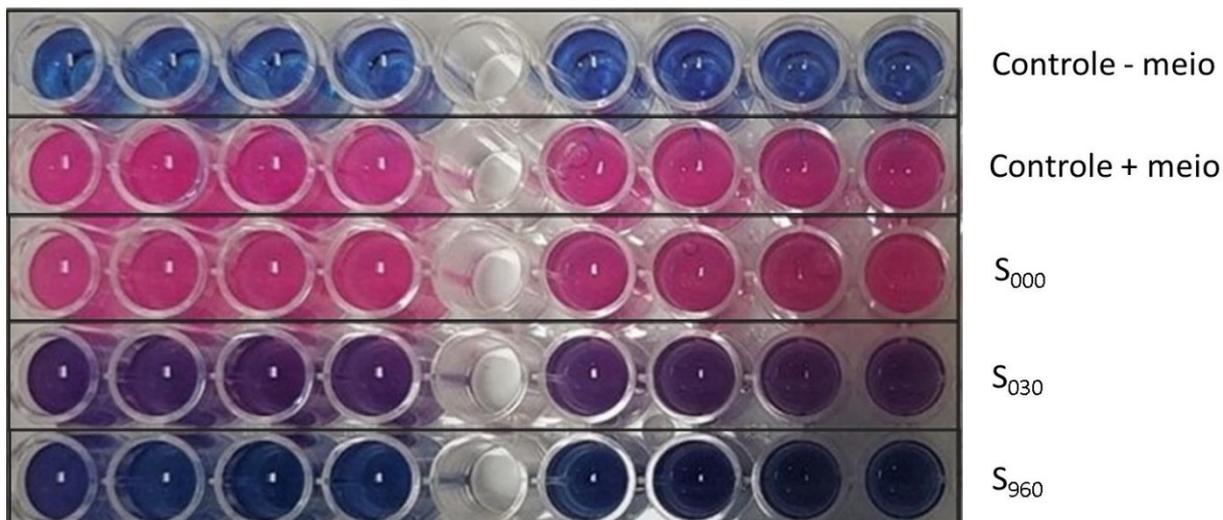


Figura 21 - Ensaio de resazurina de solução bacteriana da cepa *E. coli* exposta ao tecido projetado nas concentrações  $S_{000}$ ,  $S_{030}$  e  $S_{960}$  mais controle positivo e negativo do meio.

É possível verificar alteração gradual de coloração dos poços contendo a amostra  $S_{030}$  nas Figuras 20 e 21 para um tom mais arroxeadado, indicando que o crescimento celular das colônias foi prejudicado pela concentração de Cu existente no material, apontando tendência qualitativa de aumento da atividade antimicrobiana.

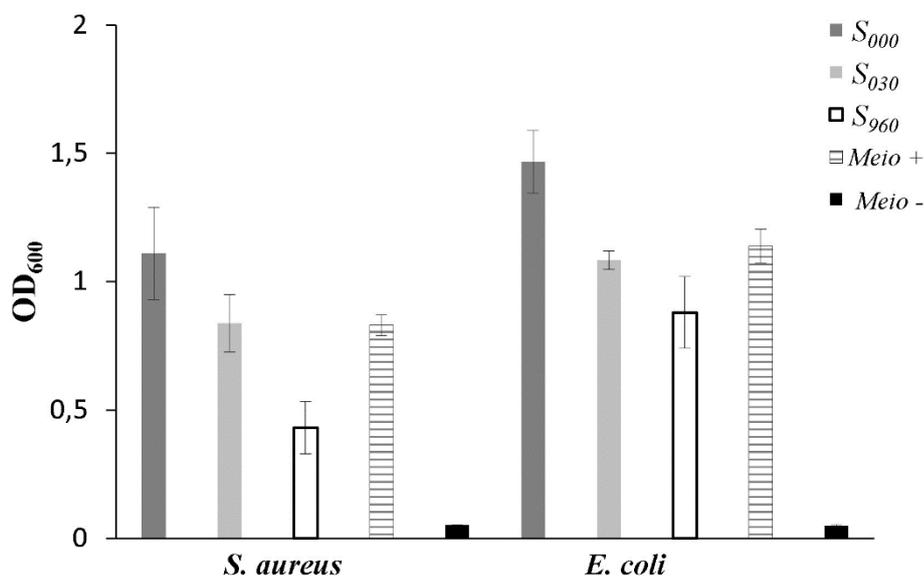


Figura 22 - Análise de crescimento bacteriano das culturas *S. aureus* e *E. coli* pela técnica de densidade ótica ( $OD_{600}$ ) dos poços expostos as amostras  $S_{000}$ ,  $S_{030}$ ,  $S_{960}$  mais controle positivo e negativo do meio.

Os poços contendo a amostra  $S_{960}$  nas Figuras 20 e 21 apresentam coloração da solução em tom azul escuro, que indica redução expressiva do crescimento celular das colônias, apontando tendência qualitativa de elevada atividade antimicrobiana do material, a coloração apresenta-se semelhante ao controle negativo do meio.

A Figura 22 apresenta o crescimento celular das culturas de *S. aureus* e *E. coli* expostas as amostras S<sub>000</sub>, S<sub>030</sub> e S<sub>960</sub> juntamente com controle positivo e negativo do meio, conforme metodologia apresentada anteriormente. A OD<sub>600</sub> está diretamente relacionada a densidade de CFU.mL<sup>-1</sup> das soluções contendo as culturas testadas.

Na Figura 22 é possível observar que os poços contendo a amostra S<sub>000</sub> apresentam densidade óptica elevada para ambas as culturas testadas, OD<sub>600</sub> de 1,1 para *S. aureus* e OD<sub>600</sub> de 1,5 para *E. coli* apontando, de forma quantitativa, baixa atividade antimicrobiana da amostra S<sub>000</sub>. A amostra S<sub>000</sub> apresenta possível formação de biofilme em sua superfície, que justifica o aumento de densidade óptica, quando comparado ao Meio +.

Observa-se que os poços que contém a amostra S<sub>030</sub> apresentam densidade óptica das culturas testadas ainda elevadas, OD<sub>600</sub> de 0,8 para *S. aureus* e OD<sub>600</sub> de 1 para *E. coli*. A redução mais significativa é observada nos poços que contém a amostra S<sub>960</sub>, que apresentam densidade óptica das culturas reduzida quando comparadas às amostras S<sub>000</sub> e S<sub>030</sub>. Para a *S. aureus* constatou-se OD<sub>600</sub> de 0,5 e para *E.coli* de 0,9. A maior sensibilidade é observada para a *S. aureus* pela metodologia adotada.

Os testes realizados demonstram de forma qualitativa e quantitativa a atividade antibacteriana do tecido projetado e sua relação direta com a concentração do filme de Cu no material, destaca-se que estes resultados compactuam com conclusões encontradas em diversas bibliografias levantadas para este estudo [18, 31,76, 77, 98], que indicam aumento de atividade antimicrobiana de materiais revestidos/impregnados com Cu, de forma proporcional as concentrações de Cu utilizadas.

#### **4.4 Fabricação do dispositivo simulador de respiração**

Para simular as condições reais de uso, um dispositivo que simula a respiração foi projetado e construído de acordo com a metodologia apresentada anteriormente. O dispositivo foi feito para avaliar a eficiência do tecido funcional sob condições dinâmicas. Foi construído visando o baixo custo, para que possa ser facilmente utilizado na indústria para avaliação de tecidos e máscaras.

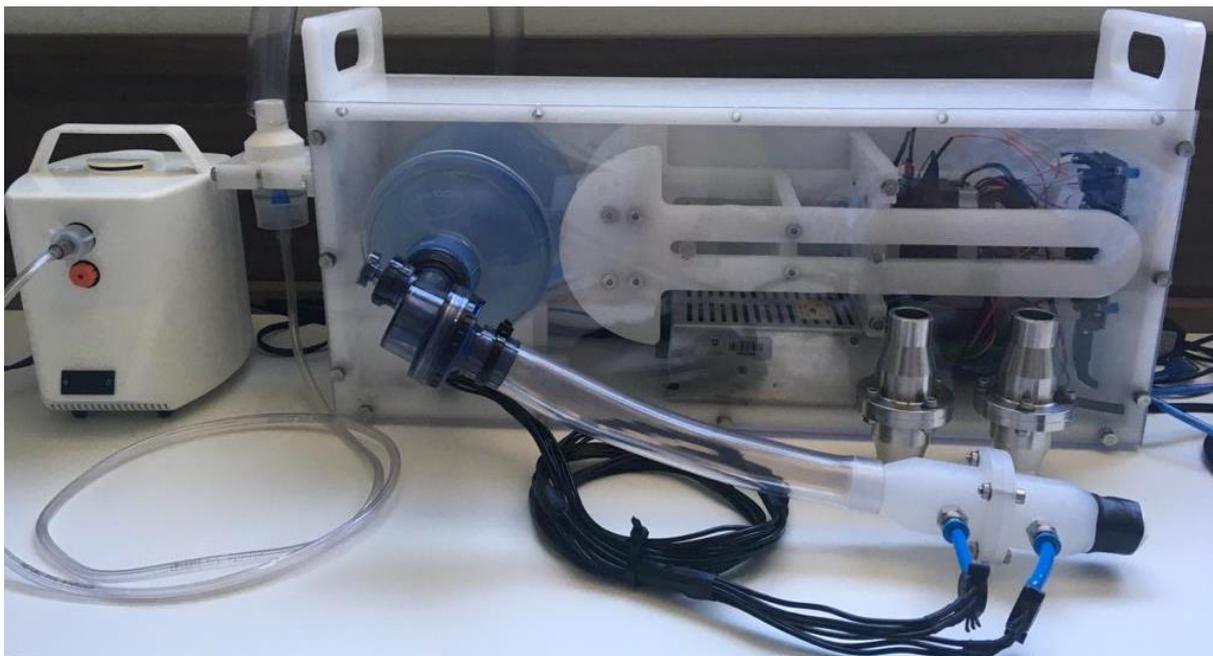


Figura 23 - Dispositivo simulador de respiração.

As peças estruturais foram fabricadas em diversas empresas do segmento metalmeccânico, os itens eletromecânicos comerciais foram adquiridos em lojas diversas. A Figura 23 apresenta o resultado da fabricação. Estimou-se um custo total de fabricação de aproximadamente R\$ 5.000,00 não contabilizando horas de projeto e montagem.

#### 4.5 Avaliação de respirabilidade

A partir do teste de respirabilidade realizado com o simulador de respiração, o coeficiente de permeabilidade do não tecido de polipropileno correspondeu a  $71,4 \text{ Pa}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Apesar de possuir um coeficiente de permeabilidade superior ao valor de referência aceitável de  $39,2 \text{ Pa}\cdot\text{cm}^{-2}$  pela norma ABNT NBR 15052 [9], quando comparado a outros materiais já utilizados para a fabricação das máscaras, o não tecido de polipropileno utilizado como substrato tem valores muito semelhantes e toleráveis, como mostrado na Tabela 3.

Uma pequena diferença foi observada nos coeficientes de permeabilidade das múltiplas amostras revestidas quando comparadas ao tecido controle  $S_{000}$ , mas não foram consideradas significativas considerando o erro percentual e a ordem de magnitude do resultado.

<b>Material do tecido</b>	<b>Coefficiente de permeabilidade (Pa.cm<sup>-2</sup>)</b>
3M FFR2 N95	75,6
Neoprene (polyester 92%, PU elastano 8%)	83,6
Máscara descartável TNT 3 camadas (baixa densidade)	47,6
S <sub>000</sub> (TNT de controle)	71,4

Tabela 3 - Valores comparativos de respirabilidade entre diferentes materiais para fabricação de máscaras faciais.

#### 4.6 Lixiviação por uso contínuo

A avaliação da lixiviação de Cu do tecido projetado foi realizada com o dispositivo simulador de respiração conforme definido na metodologia deste trabalho. Cada concentração foi testada em triplicata.

<b>Amostra</b>	<b>Massa inicial (mg)</b>	<b>Massa final (mg)</b>	<b>Diferença (mg)</b>
S <sub>000</sub> 1	85,9	85,9	0
S <sub>000</sub> 2	87,8	87,8	0
S <sub>000</sub> 3	98,7	98,7	0
S <sub>030</sub> 1	83,4	83,4	0
S <sub>030</sub> 2	87,5	87,4	-0,1
S <sub>030</sub> 3	84,5	84,5	0
S <sub>060</sub> 1	84,6	84,6	0
S <sub>060</sub> 2	84,1	84,2	0,1
S <sub>060</sub> 3	81,5	81,4	-0,1
S <sub>120</sub> 1	77,7	77,8	0,1
S <sub>120</sub> 2	79,5	79,5	0
S <sub>120</sub> 3	84,2	84,2	0
S <sub>240</sub> 1	89	89,1	0,1
S <sub>240</sub> 2	87,1	87	-0,1
S <sub>240</sub> 3	89,2	89,3	0,1
S <sub>480</sub> 1	68,4	68,4	0
S <sub>480</sub> 2	77,6	77,7	0,1
S <sub>480</sub> 3	88,5	88,6	0,1
S <sub>960</sub> 1	93,2	93,2	0
S <sub>960</sub> 2	91,5	91,5	0
S <sub>960</sub> 3	84,1	84,1	0

Tabela 4 - Avaliação de lixiviação do filme de Cu por uso contínuo realizado com o dispositivo simulador de respiração.

A Tabela 4 traz os resultados obtidos a partir do procedimento estabelecido na metodologia deste trabalho. Os valores positivos da coluna de diferença representam possível ganho de massa, os valores negativos da coluna de diferença representam possível perda de massa, porém, a diferença máxima de massa obtida por este processo é equivalente a  $\pm 0,1$  mg, portanto, não foi observada diferença significativa considerando o erro percentual. A diferença encontrada pode estar associada à umidade residual e/ou ao erro associado às leituras da balança.

A partir desse resultado, é possível assumir que não há lixiviação significativa do filme de Cu a partir do procedimento de simulação de respiração adotado, sugerindo-se que o desempenho do material seja satisfatório ao longo de seu tempo de uso.

#### **4.7 Avaliação dinâmica de atividade antimicrobiana**

A metodologia definida anteriormente para avaliação da atividade antibacteriana do tecido em condições dinâmicas permitiu a obtenção de resultados iniciais qualitativos e quantitativos por meio de ensaios biológicos e da técnica de MEV/FEG.

Na Figura 24, pode-se observar a montagem do dispositivo simulador de respiração no interior da cabine de segurança junto com todas as partes necessárias ao ensaio dinâmico, conforme definido na metodologia.

A Figura 25 apresenta as amostras de solução bacteriana plaqueadas para contagem de colônias. As placas 1A, 1B, 1C, e 1D contêm a solução inicial utilizada para geração do aerossol, em diluição de  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^3$  e  $1 \times 10^2$  CFU.mL<sup>-1</sup> respectivamente. As amostras 2A, 2B, 2C, e 2D representam a solução condensada após o ciclo dinâmico de respiração com a amostra S<sub>000</sub>, em diluição de  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^3$  e  $1 \times 10^2$  CFU.mL<sup>-1</sup> respectivamente. As amostras 3A, 3B, 3C, e 3D representam a solução condensada após o ciclo dinâmico de respiração com a amostra S<sub>960</sub>, em diluição de  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^3$  e  $1 \times 10^2$  CFU.mL<sup>-1</sup> respectivamente. Observando-se as placas, é possível identificar algumas colônias de contaminação diferentes da colônia característica de *E. coli* utilizada. As colônias contaminantes apresentam borda irregular, diferente da borda lisa e bem definida da colônia característica e, para fins de análise, foram desconsideradas no procedimento de contagem.



Figura 24 - Montagem do dispositivo simulador de respiração e partes necessárias na cabine de segurança FILTERFLUX, modelo SBIIIB2 - 1266/4.

Na primeira fileira da Figura 25, nas placas 1A, 1B, 1C e 1D é possível observar densidade de colônias bastante elevada, característica da solução inicial utilizada para geração do aerossol bacteriano. Na segunda fileira da Figura 25, nas placas 2A, 2B, 2C e 2D verifica-se diminuição expressiva da densidade de colônias que passaram pelo equipamento e pela amostra  $S_{000}$ . A diminuição da contagem após ensaio com a  $S_{000}$  pode ser justificada pela condensação da solução nas paredes internas da tubulação do equipamento, fazendo com que haja queda na concentração bacteriana e, pela retenção de colônias no próprio tecido. Como complemento, mesmo com a redução significativa de contagem das colônias de *E. coli*, a Figura 26 apresenta o resultado do ensaio de viabilidade por fluorescência da solução exposta a  $S_{000}$ , o resultado indica que, mesmo que houve redução de contagem, as colônias remanescentes permanecem ativas, conforme coloração verde após coloração com o LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability kit.

Na terceira fileira da Figura 25, nas placas 3A, 3B, 3C e 3D observa-se uma queda ainda mais acentuada na contagem de colônias que passaram pelo equipamento e pela amostra  $S_{960}$  em comparação as placas 1A, 1B, 1C, 1D, 2A, 2B, 2C e 2D. A diminuição da contagem após ensaio com a  $S_{960}$  pode ser justificada pela condensação da solução nas paredes internas da tubulação do equipamento, fazendo com que haja queda na concentração bacteriana e, também pela retenção e desativação de grande parte das colônias no tecido. Como complemento, a redução

de contagem e desativação das colônias de *E. coli* pode ser observada na Figura 26, que apresenta o resultado do ensaio de viabilidade por fluorescência da solução exposta a  $S_{960}$ , o resultado indica que, além da redução elevada da contagem, grande parte das colônias remanescente encontram-se desativadas, indicadas pela coloração vermelha predominante após coloração com o LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability kit.

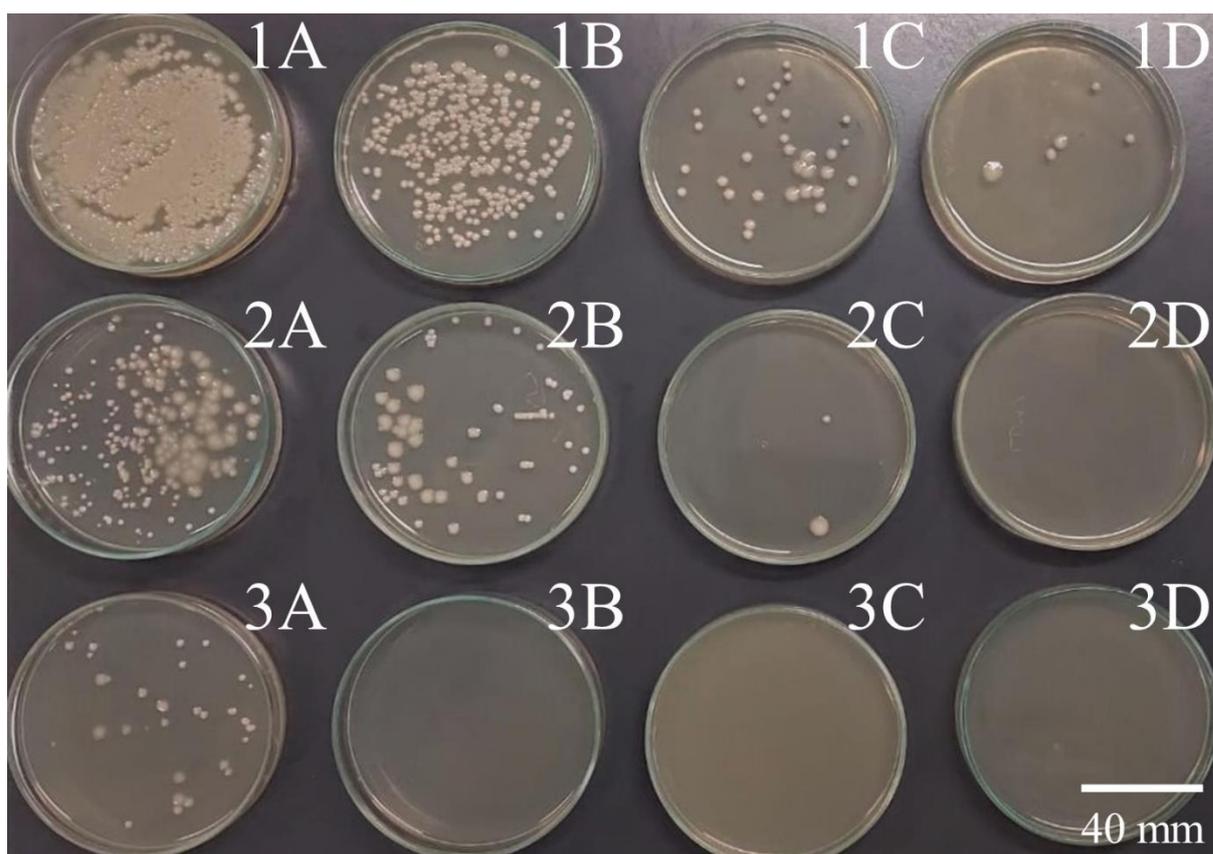


Figura 25 - Plaqueamento da solução bacteriana para contagem de colônias com respectivas diluições. Solução bacteriana antes do ensaio: 1A:  $1 \times 10^5$  CFU.mL<sup>-1</sup>, 1B:  $1 \times 10^4$  CFU.mL<sup>-1</sup>, 1C:  $1 \times 10^3$  CFU.mL<sup>-1</sup>, e 1D:  $1 \times 10^2$  CFU.mL<sup>-1</sup>. Solução que passou pela amostra  $S_{000}$ : 2A:  $1 \times 10^5$  CFU.mL<sup>-1</sup>, 2B:  $1 \times 10^4$  CFU.mL<sup>-1</sup>, 2C:  $1 \times 10^3$  CFU.mL<sup>-1</sup>, e 2D:  $1 \times 10^2$  CFU.mL<sup>-1</sup>. Solução que passou pela amostra  $S_{960}$ : 3A:  $1 \times 10^5$  CFU.mL<sup>-1</sup>, 3B:  $1 \times 10^4$  CFU.mL<sup>-1</sup>, 3C:  $1 \times 10^3$  CFU.mL<sup>-1</sup>, e 3D:  $1 \times 10^2$  CFU.mL<sup>-1</sup>.

Conforme definido pela literatura e pelo NCCLS [109 - 111], para testes *in vitro* sob condições restritas de laboratório, classifica-se como bactericida o agente capaz de inativar 99,9% de uma cultura após 18 a 24h, com inóculo inicial de  $1 \times 10^5$  CFU.mL<sup>-1</sup>, para reduções entre 90 e 99%, classifica-se o agente como bacteriostático. A Figura 27 apresenta o resultado da contagem de colônias da solução bacteriana coletada no ensaio dinâmico. Para a solução ensaiada com a amostra  $S_{000}$  a contagem obtida foi de aproximadamente  $0,13 \times 10^5$  CFU.mL<sup>-1</sup>, uma redução de 87% em relação ao

inóculo inicial de  $1 \times 10^5$  CFU.mL<sup>-1</sup>. Para a solução ensaiada com a amostra S<sub>960</sub> a contagem obtida foi de aproximadamente  $0,02 \times 10^5$  CFU.mL<sup>-1</sup>, uma redução de 98% em relação ao inóculo inicial de  $1 \times 10^5$  CFU.mL<sup>-1</sup>. Há uma redução de aproximadamente 80% na contagem de colônias de *E. coli* da solução ensaiada com a amostra S<sub>960</sub> em comparação a solução ensaiada com a amostra S<sub>000</sub>, indicando aumento de atividade antimicrobiana da amostra S<sub>960</sub> em relação ao tecido de controle. Conforme definido pela literatura, observa-se efeito bacteriostático para amostra S<sub>960</sub> frente a *E. coli* utilizada para o teste.

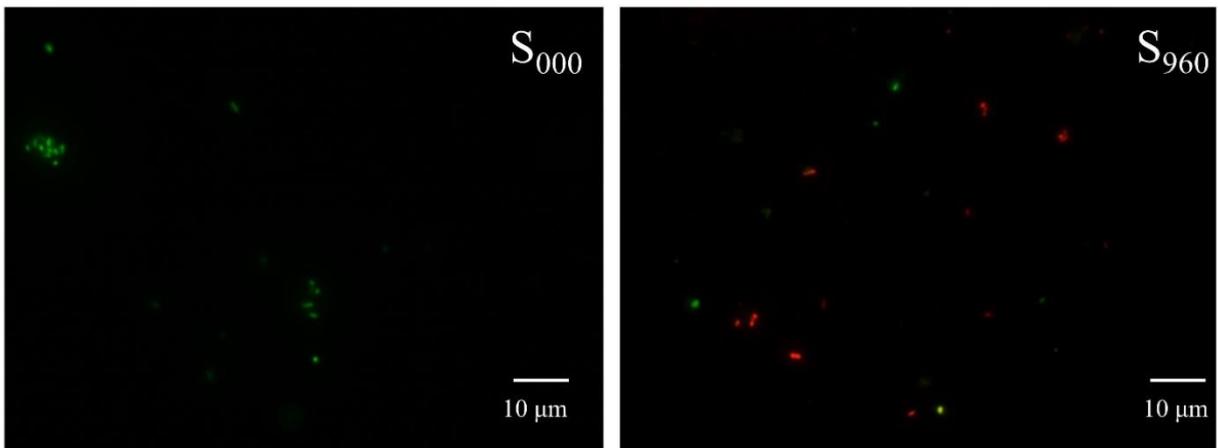


Figura 26 - Técnica de fluorescência da solução precipitada durante os ensaios dinâmicos para avaliação qualitativa de atividade antimicrobiana das amostras S<sub>000</sub> e S<sub>960</sub> após coloração das colônias com LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability kit com a cepa *E. coli*.

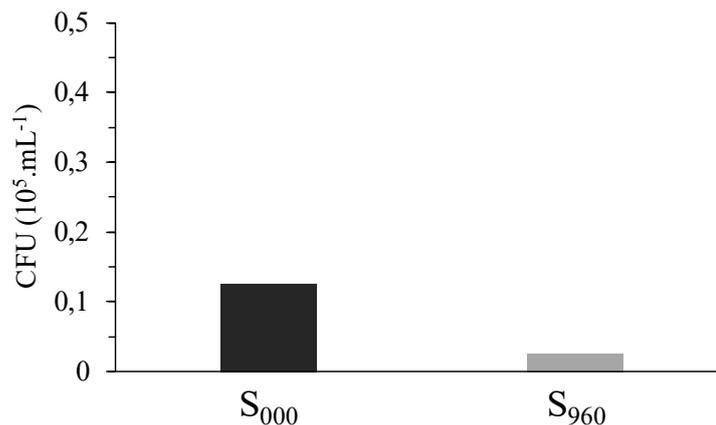


Figura 27 - Contagem de colônias de *E. coli* da solução bacteriana coletada no ensaio dinâmico com as amostras S<sub>000</sub> e S<sub>960</sub>.

## 5 CONCLUSÕES

Este trabalho objetivou-se ao estudo e desenvolvimento de um tecido projetado para fabricação de máscaras de proteção facial multicamadas. Foi utilizado como material base um TNT de PP que foi revestido com filme de Cu em diferentes concentrações por processo de magnetron sputtering para melhor compreensão das propriedades citotóxicas e antimicrobianas apresentadas pelo compósito resultante. Buscou-se o desenvolvimento de uma nova metodologia para teste de tecidos altamente funcionais de forma dinâmica, que procura submeter os materiais testados a condições semelhantes às reais de utilização.

O objetivo de produzir amostras com diferentes concentrações de Cu mantendo-se todos os parâmetros do processo de magnetron sputtering constantes, exceto o tempo de exposição ao alvo, foi atingida e confirmada pelas técnicas de caracterização MEV/FEG, EDS e pelos resultados obtidos para determinação da concentração de Cu do item 4.2.3. As concentrações atingidas variam entre  $0,07 \pm 0,02\%$  para a amostra  $S_{030}$  até  $4,24 \pm 0,73\%$  para a amostra  $S_{960}$ . As bibliografias levantadas para o estudo indicam que propriedades antibacterianas e antivirais satisfatórias são atingidas em concentrações de Cu em materiais entre 2 e 10% em peso, faixa que foi satisfatoriamente atingida.

As propriedades do compósito obtido foram avaliadas por meio de ensaios biológicos. A análise de citotoxicidade foi realizada avaliando-se as amostras de tecido  $S_{030}$ ,  $S_{240}$  e  $S_{960}$  com uma linhagem celular de fibroblastos de camundongo L929, por meio do método indireto MTT. Conforme padrões definidos pela ISO 10993-05 [100], as amostras  $S_{000}$  e  $S_{030}$  não apresentam efeito citotóxico frente a linhagem L929 testada. As amostras  $S_{240}$  e  $S_{960}$  apresentaram efeito citotóxico aceitável para o período de 24 h, mesmo que haja redução superior a 30%, considerando-se que a máscara não deve ser utilizada por mais de 4 h conforme recomendações do CDC [105, 106].

Os ensaios realizados para análise de atividade antimicrobiana do tecido projetado nas diferentes concentrações permitiram observar de forma clara a influência da concentração do filme de Cu depositado no não tecido em relação ao efeito antibacteriano desempenhado. Conforme resultados apresentados nos itens 4.3.3 e 4.3.4, é possível destacar que, conforme o aumento da concentração do Cu no material, a atividade antimicrobiana do compósito é acentuada, a atividade

antibacteriana mais significativa foi observada na S<sub>960</sub>, que possui concentração de  $4,24 \pm 0,73\%$  de Cu.

O dispositivo simulador de respiração projetado e fabricado foi de fundamental importância para avaliação de eficiência do compósito em condições dinâmicas. Permitiu a análise de lixiviação por uso contínuo, no qual, para os parâmetros utilizados, não foi observada lixiviação significativa do filme durante os ciclos de respiração, possibilitou a avaliação de respirabilidade da amostra S<sub>000</sub>, que, de forma comparativa, apresentou coeficiente de permeabilidade semelhante a máscaras de proteção facial disponíveis no mercado.

A avaliação dinâmica de atividade antimicrobiana foi realizada utilizando-se do dispositivo simulador de respiração, que permitiu a simulação de inoculação de forma dinâmica do agente bacteriano *E. coli*. Foi possível observar redução elevada de contagem de colônias, 87% para S<sub>000</sub> e 98% para S<sub>960</sub> em relação ao inóculo inicial de  $1 \times 10^5$  CFU.mL<sup>-1</sup>. A redução apresentada pela S<sub>000</sub> indica possíveis perdas de contagem por condensação nas paredes internas da tubulação do equipamento utilizado e retenção de colônias no próprio tecido, porém, há redução de aproximadamente 80% na contagem de colônias de *E. coli* da solução ensaiada com a S<sub>960</sub> em comparação a S<sub>000</sub>, indicando aumento de atividade antimicrobiana da amostra S<sub>960</sub> em relação a S<sub>000</sub>.

É possível concluir que, o trabalho permitiu o desenvolvimento de um novo equipamento para teste de tecidos funcionais de forma dinâmica, que atendeu aos requisitos para os quais foi projetado: baixo custo, versatilidade e que permita obter resultados rápidos e de qualidade, apto a ser utilizado na indústria. Por meio do equipamento e dos ensaios realizados, foi possível comprovar que o tecido revestido com filme de Cu possui boas propriedades filtrantes e que a aplicação do revestimento de Cu não apresenta prejuízos a sua permeabilidade, observou-se que não há lixiviação do filme ao longo de sua utilização, indicando que suas propriedades permanecem constantes durante o uso e, o compósito obtido apresenta propriedades antibacterianas significativas, com potencial elevado para aplicação como camada funcional em máscaras faciais.

## 6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

De forma a sugerir a continuidade do trabalho que possui ramificações de grande importância, podendo-se destacar dentre as principais, o potencial de exploração e aplicação dos revestimentos altamente funcionais de Cu buscando suas propriedades antimicrobianas nas mais diversas aplicações e, o desenvolvimento de ensaios dinâmicos para avaliação de tecidos funcionais que evoluíram imensamente devido ao último cenário pandêmico provocado pelo SARS-CoV-2.

Sugere-se trabalhos para investigação do não tecido após processo de revestimento via PVD buscando compreender melhor a morfologia do material em relação a possíveis alterações no tamanho específico dos poros e espessamento das fibras, correlacionando com a perda de carga gerada durante o processo de respiração de um usuário.

Sugere-se aperfeiçoamento do dispositivo simulador de respiração em relação a automação, estrutura e otimização de partes móveis e peças, que permitam melhor esterilização das partes em contato com agentes em teste. O dispositivo simulador encontra-se disponível no Laboratório de Engenharia de Superfícies e Tratamentos Térmicos I (LESTT I) da Universidade de Caxias do Sul.

Sugere-se realização de ensaios de exposição de tecidos revestidos com cobre via processo de PVD a bactérias resistentes como *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e o fungo *Candida albicans*, também as bactérias *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*. Por fim, sugere-se também ensaios de exposição ao vírus SARS-CoV-2 para estudo de atividade antiviral. O estudo proposto sugere a avaliação de desempenho e possíveis limitações do material de forma qualitativa e quantitativa.

## 7 REFERÊNCIAS

- [1] Chin, A. W. H., Chu, J. T. S., Perera, M. R. A., Hui, K. P. Y., Yen, H.-L., Chan, M. C. W., Peiris, M., & Poon, L. L. M. (2020). Stability of SARS-CoV-2 in different environmental conditions. *The Lancet Microbe*, 1(1), e10. [https://doi.org/10.1016/s2666-5247\(20\)30003-3](https://doi.org/10.1016/s2666-5247(20)30003-3).
- [2] Kampf, G. (2020). Potential role of inanimate surfaces for the spread of coronaviruses and their inactivation with disinfectant agents. *Infection Prevention in Practice*, 2(2), 100044. <https://doi.org/10.1016/j.infpip.2020.100044>.
- [3] Kampf, G., Todt, D., Pfaender, S., & Steinmann, E. (2020). Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents. *Journal of Hospital Infection*, 104(3), 246–251. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.01.022>.
- [4] Wood-Black, F., Lewin, J., Blayney, M. B., Galindo, L., Foreman, R., Zelivyanskaya, M., & Reid, M. (2020). Highlights: Reusing Masks, Face Covering Efficacy, Plant Restarts, and More. *ACS Chemical Health & Safety*, 27(4), 204–208. <https://doi.org/10.1021/acs.chas.0c00069>.
- [5] Gandhi, M., & Rutherford, G. W. (2020). Facial Masking for Covid-19 - Potential for “Variolation” as We Await a Vaccine. *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/nejmp2026913>.
- [6] Gandhi, M., Beyrer, C., & Goosby, E. (2020). Masks Do More Than Protect Others During COVID-19: Reducing the Inoculum of SARS-CoV-2 to Protect the Wearer. *Journal of General Internal Medicine*. <https://doi.org/10.1007/s11606-020-06067-8>.
- [7] CDC. (2020, February 11). Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). Considerations for Wearing Masks. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/prevent-getting-sick/cloth-face-cover-guidance.html>. [último acesso em 20 de setembro 2020].
- [8] NIOSH Regulations | NIOSH | CDC. (n.d.). Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/niosh/regulations.html>. [último acesso em 14 de setembro 2021].
- [9] ABNT NBR 15052 (2004). Artigos de não tecido de uso odonto-médico-hospitalar - Máscaras cirúrgicas - Requisitos. Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). [www.abnt.org.br](http://www.abnt.org.br). [último acesso em 16 de março de 2021].
- [10] BS EN 14683:2019. Medical face masks. Requirements and test methods. BSI British Standards Institution. <https://www.bsigroup.com/en-GB/standards/>. [último acesso em 06 de fevereiro de 2022].
- [11] ASTM D737-96. Test Method for Air Permeability of Textile Fabrics. ASTM International. [www.astm.org](http://www.astm.org). [último acesso em 16 de fevereiro de 2022].

- [12] ISO 9237 (1995). Textiles - Determination of the permeability of fabrics to air. International Organization for Standardization (ISO). <https://www.iso.org/standard/16869.html>. [último acesso em 25 de novembro de 2021].
- [13] ASTM F2299 / F2299M-03(2017). Standard Test Method for Determining the Initial Efficiency of Materials Used in Medical Face Masks to Penetration by Particulates Using Latex Spheres. ASTM International. [www.astm.org](http://www.astm.org). [último acesso em 06 de fevereiro de 2021].
- [14] ASTM F2101 (2019). Standard Test Method for Evaluating the Bacterial Filtration Efficiency (BFE) of Medical Face Mask Materials, Using a Biological Aerosol of Staphylococcus aureus. ASTM International. [www.astm.org](http://www.astm.org). [último acesso em 06 de fevereiro de 2021].
- [15] Abulikemu, M., Tabrizi, B. E. A., Ghobadloo, S. M., Mofarah, H. M., & Jabbour, G. E. (2021). Silver Nanoparticle-Decorated Personal Protective Equipment for Inhibiting Human Coronavirus Infectivity. *ACS Applied Nano Materials*, 5(1), 309–317. <https://doi.org/10.1021/acsnm.1c03033>.
- [16] Kumar, S., Karmacharya, M., Joshi, S. R., Gulenko, O., Park, J., Kim, G. H., & Cho, Y. K. (2020). Photoactive Antiviral Face Mask with Self-Sterilization and Reusability. *Nano Letters*, 21(1), 337–343. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c03725>.
- [17] Huang, L., Xu, S., Wang, Z., Xue, K., Su, J., Song, Y., Chen, S., Zhu, C., Tang, B. Z., & Ye, R. (2020). Self-Reporting and Photothermally Enhanced Rapid Bacterial Killing on a Laser-Induced Graphene Mask. *ACS Nano*, 14(9), 12045–12053. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c05330>.
- [18] Gabbay, J., Borkow, G., Mishal, J., Magen, E., Zatzoff, R., & Shemer-Avni, Y. (2006). Copper Oxide Impregnated Textiles with Potent Biocidal Activities. *Journal of Industrial Textiles*, 35(4), 323–335. <https://doi.org/10.1177/1528083706060785>.
- [19] Zhao, M., Liao, L., Xiao, W., Yu, X., Wang, H., Wang, Q., Lin, Y. L., Kilinc-Balci, F. S., Price, A., Chu, L., Chu, M. C., Chu, S., & Cui, Y. (2020). Household Materials Selection for Homemade Cloth Face Coverings and Their Filtration Efficiency Enhancement with Triboelectric Charging. *Nano Letters*, 20(7), 5544–5552. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c02211>.
- [20] Cerkez, I., Worley, S. D., Broughton, R. M., & Huang, T. S. (2013). Antimicrobial surface coatings for polypropylene nonwoven fabrics. *Reactive and Functional Polymers*, 73(11), 1412–1419. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2013.07.016>.
- [21] Ghatak, B., Banerjee, S., Ali, S. B., Bandyopadhyay, R., Das, N., Mandal, D., & Tudu, B. (2021). Design of a self-powered triboelectric face mask. *Nano Energy*, 79, 105387. <https://doi.org/10.1016/j.nanoen.2020.105387>.

- [22] Kang, D. H., Kim, N. K., & Kang, H. W. (2021). Electrostatic Charge Retention in PVDF Nanofiber-Nylon Mesh Multilayer Structure for Effective Fine Particulate Matter Filtration for Face Masks. *Polymers*, 13(19), 3235. <https://doi.org/10.3390/polym13193235>.
- [23] Rashid, T. U., Sharmeen, S., & Biswas, S. (2022). Effectiveness of N95 Masks against SARS-CoV-2: Performance Efficiency, Concerns, and Future Directions. *ACS Chemical Health & Safety*. <https://doi.org/10.1021/acs.chas.1c00016>.
- [24] Palza, H. (2015). Antimicrobial Polymers with Metal Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(1), 2099–2116. <https://doi.org/10.3390/ijms16012099>.
- [25] Yahya, M. T., Straub, T. M., Gerba, C. P., & Margolin, A. B. (1991). Inactivation of Bacteriophage MS-2 and poliovirus in copper, galvanized and plastic domestic water pipes. *International Journal of Environmental Health Research*, 1(2), 76–86. <https://doi.org/10.1080/09603129109356707>.
- [26] Block, S. S. (2000). *Disinfection, Sterilization, and Preservation* (Fifth ed.). LWW.
- [27] Fatoba, O. S., Esezobor, D. E., Akanji, O. L., Fatoba, A. J., Macgregor, D., & Etubor, J. (2014). The Study of the Antimicrobial Properties of Selected Engineering Materials' Surfaces. *Journal of Minerals and Materials Characterization and Engineering*, 02(02), 78–87. <https://doi.org/10.4236/jmmce.2014.22012>
- [28] Dollwet, H.H.A. and Sorenson, J.R.J. (2001) *Historic Uses of Copper Compounds in Medicine*. *Trace Elements in Medicine* (2nd ed.). The Humana Press Inc.
- [29] Borkow, G., & Gabbay, J. (2009). Copper, An Ancient Remedy Returning to Fight Microbial, Fungal and Viral Infections. *Current Chemical Biology*, 3(3), 272–278. <https://doi.org/10.2174/187231309789054887>.
- [30] Cooney, T. (1995). Bactericidal Activity of Copper and Noncopper Paints. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 16(8), 444-450. <https://doi:10.2307/30141081>.
- [31] Behzadinasab, S., Chin, A., Hosseini, M., Poon, L., & Ducker, W. A. (2020). A Surface Coating that Rapidly Inactivates SARS-CoV-2. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 12(31), 34723–34727. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c11425>.
- [32] Van Doremalen, N., Bushmaker, T., Morris, D. H., Holbrook, M. G., Gamble, A., Williamson, B. N., Tamin, A., Harcourt, J. L., Thornburg, N. J., Gerber, S. I., Lloyd-Smith, J. O., de Wit, E., & Munster, V. J. (2020). Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. *New England Journal of Medicine*, 382(16), 1564–1567. <https://doi.org/10.1056/nejmc2004973>.

- [33] Lamas, T., Borges, L., Oliveira, R., Albuquerque, M., Seixas, D., & Mendes, J. J. (2020). A Estratégia de Combate à COVID-19. *Gazeta Médica*, 171–176. <https://doi.org/10.29315/gm.v7i2.362>.
- [34] Cai, J., Sun, W., Huang, J., Gamber, M., Wu, J., & He, G. (2020). Indirect Virus Transmission in Cluster of COVID-19 Cases, Wenzhou, China, 2020. *Emerging Infectious Diseases*, 26(6), 1343–1345. <https://doi.org/10.3201/eid2606.200412>.
- [35] Rahman, M.A.; Hossain, M.G.; Singha, A.C.; Islam, M.S.; Islam, M.A. A Retrospective Analysis of Influence of Environmental/Air Temperature and Relative Humidity on SARS-CoV-2 Outbreak. Preprints 2020, 2020030325 <https://doi.org/10.20944/preprints202003.0325.v1>.
- [36] Siddell, S., Anderson, R., Cavanagh, D., Fujiwara, K., Klenk, H., Macnaughton, M., Pensaert, M., Stohman, S., Sturman, L., & van der Zeijst, B. (1983). Coronaviridae. *Intervirology*, 20(4), 181–189. <https://doi.org/10.1159/000149390>.
- [37] Fehr, A. R., & Perlman, S. (2015). Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. *Coronaviruses*, 1–23. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7_1).
- [38] V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H., & Thiel, V. (2020). Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nature Reviews Microbiology*, 19(3), 155–170. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>.
- [39] Peng, R., Wu, L. A., Wang, Q., Qi, J., & Gao, G. F. (2021). Cell entry by SARS-CoV-2. *Trends in Biochemical Sciences*, 46(10), 848–860. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2021.06.001>.
- [40] Belouzard, S., Millet, J. K., Licitra, B. N., & Whittaker, G. R. (2012). Mechanisms of Coronavirus Cell Entry Mediated by the Viral Spike Protein. *Viruses*, 4(6), 1011–1033. <https://doi.org/10.3390/v4061011>.
- [41] Kumar, S., Nyodu, R., Maurya, V. K., & Saxena, S. K. (2020). Morphology, Genome Organization, Replication, and Pathogenesis of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Medical Virology: From Pathogenesis to Disease Control*, 23–31. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-4814-7\\_3](https://doi.org/10.1007/978-981-15-4814-7_3).
- [42] Rothe, C., Schunk, M., Sothmann, P., Bretzel, G., Froeschl, G., Wallrauch, C., Zimmer, T., Thiel, V., Janke, C., Guggemos, W., Seilmaier, M., Drosten, C., Vollmar, P., Zwirgmaier, K., Zange, S., Wölfel, R., & Hoelscher, M. (2020). Transmission of 2019-nCoV Infection from an Asymptomatic Contact in Germany. *New England Journal of Medicine*, 382(10), 970–971. <https://doi.org/10.1056/nejmc2001468>.
- [43] United States Environmental Protection Agency. List N: Disinfectants for use against SARS-CoV-2 (updated April 23, 2020). Washington, DC: EPA; 2020. Disponível em: <https://www.epa.gov/pesticide-registration/list-n-disinfectants-use-against-SARS-CoV-2>. [último acesso em 07 de setembro 2020].

- [44] Hamzavi, I. H., Lyons, A. B., Kohli, I., Narla, S., Parks-Miller, A., Gelfand, J. M., Lim, H. W., & Ozog, D. M. (2020). Ultraviolet germicidal irradiation: Possible method for respirator disinfection to facilitate reuse during the COVID-19 pandemic. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 82(6), 1511–1512. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2020.03.085>.
- [45] Prather, K. A., Wang, C. C., & Schooley, R. T. (2020). Reducing transmission of SARS-CoV-2. *Science*, 368(6498), 1422–1424. <https://doi.org/10.1126/science.abc6197>.
- [46] Mittal, R., Ni, R., & Seo, J.-H. (2020). The flow physics of COVID-19. *Journal of Fluid Mechanics*, 894, 1–14. <https://doi.org/10.1017/jfm.2020.330>.
- [47] Leung, N. H. L., Chu, D. K. W., Shiu, E. Y. C., Chan, K.-H., McDevitt, J. J., Hau, B. J. P., Yen, H.-L., Li, Y., Ip, D. K. M., Peiris, J. S. M., Seto, W.-H., Leung, G. M., Milton, D. K., & Cowling, B. J. (2020). Respiratory virus shedding in exhaled breath and efficacy of face masks. *Nature Medicine*, 26(5), 676–680. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0843-2>.
- [48] Liao, M., Liu, H., Wang, X., Hu, X., Huang, Y., Liu, X., Brenan, K., Mecha, J., Nirmalan, M., & Lu, J. R. (2021, April). A technical review of face mask wearing in preventing respiratory COVID-19 transmission. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 52, 101417. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2021.101417>.
- [49] Zhong, H., Zhu, Z., You, P., Lin, J., Cheung, C. F., Lu, V. L., Yan, F., Chan, C. Y., & Li, G. (2020, June 24). Plasmonic and Superhydrophobic Self-Decontaminating N95 Respirators. *ACS Nano*, 14(7), 8846–8854. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c03504>.
- [50] Zhong, H., Zhu, Z., Lin, J., Cheung, C. F., Lu, V. L., Yan, F., Chan, C. Y., & Li, G. (2020, April 24). Reusable and Recyclable Graphene Masks with Outstanding Superhydrophobic and Photothermal Performances. *ACS Nano*, 14(5), 6213–6221. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c02250>.
- [51] Hiragond, C. B., Kshirsagar, A. S., Dhapte, V. V., Khanna, T., Joshi, P., & More, P. V. (2018, October). Enhanced anti-microbial response of commercial face mask using colloidal silver nanoparticles. *Vacuum*, 156, 475–482. <https://doi.org/10.1016/j.vacuum.2018.08.007>.
- [52] Pullangott, G., Kannan, U., S., G., Kiran, D. V., & Maliyekkal, S. M. (2021). A comprehensive review on antimicrobial face masks: an emerging weapon in fighting pandemics. *RSC Advances*, 11(12), 6544–6576. <https://doi.org/10.1039/d0ra10009a>.
- [53] A. Brochocka and K. Majchrzycka, Technology for the production of bioactive melt-blown filtration materials applied to respiratory protective devices, *Fibres Text. East. Eur.*, 2009, 17, 92–98.
- [54] Schabes-Retchkiman, P., Canizal, G., Herrera-Becerra, R., Zorrilla, C., Liu, H., & Ascencio, J. (2006, October). Biosynthesis and characterization of Ti/Ni bimetallic

- nanoparticles. *Optical Materials*, 29(1), 95–99.  
<https://doi.org/10.1016/j.optmat.2006.03.014>.
- [55] Ghaffari, H., Tavakoli, A., Moradi, A., Tabarraei, A., Bokharaei-Salim, F., Zahmatkeshan, M., Farahmand, M., Javanmard, D., Kiani, S. J., Esghaei, M., Pirhajati-Mahabadi, V., Monavari, S. H., & Ataei-Pirkooh, A. (2019). Inhibition of H1N1 influenza virus infection by zinc oxide nanoparticles: another emerging application of nanomedicine. *Journal of Biomedical Science*, 26(1).  
<https://doi.org/10.1186/s12929-019-0563-4>.
- [56] K. Nakano, A. Sato, T. Kusaka, S. Kasamatsu, A. Sasaki and and D. Fukushi, Antiviral material, antiviral film, antiviral fiber, and antiviral product, (patent US10327445B2), 2019. Toshiba Corp Toshiba Materials Co Ltd.
- [57] Jordan, F. T. W., & Nassar, T. J. (1973). The survival of infectious bronchitis (ib) virus in water. *Avian Pathology*, 2(2), 91–101.  
<https://doi.org/10.1080/03079457309353787>.
- [58] Yahya, M. T., Straub, T. M., Gerba, C. P., & Margolin, A. B. (1991). Inactivation of Bacteriophage MS-2 and poliovirus in copper, galvanized and plastic domestic water pipes. *International Journal of Environmental Health Research*, 1(2), 76–86.  
<https://doi.org/10.1080/09603129109356707>.
- [59] Sagripanti, J. L., Routson, L. B., & Lytle, C. D. (1993). Virus inactivation by copper or iron ions alone and in the presence of peroxide. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(12), 4374–4376.  
<https://doi.org/10.1128/aem.59.12.4374-4376.1993>.
- [60] Borkow, G., Lara, H. H., Covington, C. Y., Nyamathi, A., & Gabbay, J. (2008). Deactivation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Medium by Copper Oxide-Containing Filters. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(2), 518–525. <https://doi.org/10.1128/aac.00899-07>.
- [61] Noyce, J. O., Michels, H., & Keevil, C. W. (2007). Inactivation of Influenza A Virus on Copper versus Stainless Steel Surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(8), 2748–2750. <https://doi.org/10.1128/aem.01139-06>.
- [62] Warnes, S. L., Little, Z. R., & Keevil, C. W. (2015). Human Coronavirus 229E Remains Infectious on Common Touch Surface Materials. *MBio*, 6(6), 1–10.  
<https://doi.org/10.1128/mbio.01697-15>.
- [63] Pedriquez, M. & Pinto, J.F. (2018). Copper T intrauterine device 380A: Safety as a contraceptive method in post-abortion state. *Revista de Obstetricia y Ginecologia de Venezuela*. 78.192-203.
- [64] Bilian, X. (2002). Intrauterine devices. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 16(2), 155–168.  
<https://doi.org/10.1053/beog.2002.0267>.

- [65] Hostynek, J. J., & Maibach, H. I. (2003). Copper Hypersensitivity: Dermatologic Aspects. *Reviews on Environmental Health*, 18(3), 153–83. <https://doi.org/10.1515/reveh.2003.18.3.153>.
- [66] Institute of Medicine, Board, F. A. N., Intakes, S. C. O. T. S. E. O. D. R., Intakes, S. O. I. A. U. O. D. R., Nutrients, S. O. U. R. L. O., & Micronutrients, P. O. (2002). *Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc* (1st ed.). National Academies Press.
- [67] Lemire, J. A., Harrison, J. J., & Turner, R. J. (2013). Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nature Reviews Microbiology*, 11(6), 371–384. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3028>.
- [68] Wakshlak, R. B.-K., Pedahzur, R., & Avnir, D. (2015). Antibacterial activity of silver-killed bacteria: the “zombies” effect. *Scientific Reports*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/srep09555>.
- [69] Shleev, S., Tkac, J., Christenson, A., Ruzgas, T., Yaropolov, A. I., Whittaker, J. W., & Gorton, L. (2005). Direct electron transfer between copper-containing proteins and electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*, 20(12), 2517–2554. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.10.003>.
- [70] He, L., He, T., Farrar, S., Ji, L., Liu, T., & Ma, X. (2017). Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 44(2), 532–553. <https://doi.org/10.1159/000485089>.
- [71] Gaetke, L. (2003). Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*, 189(1–2), 147–163. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(03\)00159-8](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(03)00159-8).
- [72] Buettner, G. R., & Jurkiewicz, B. A. (1996). Catalytic Metals, Ascorbate and Free Radicals: Combinations to Avoid. *Radiation Research*, 145(5), 532–541. <https://doi.org/10.2307/3579271>.
- [73] Grass, G., Rensing, C., & Solioz, M. (2010). Metallic Copper as an Antimicrobial Surface. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(5), 1541–1547. <https://doi.org/10.1128/aem.02766-10>.
- [74] Tal, M. (1999). Metallized textile (patent US5871816A). MTC Ltd.
- [75] Liang., R., & Ghosh, T. (2015). Composição antimicrobiana para tratar tecido, e, processo para acabamento de tecido (BRPI1106570A2). Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI).
- [76] Zhang, W., Zhang, Y.-H., Ji, J.-H., Zhao, J., Yan, Q., & Chu, P. K. (2006). Antimicrobial properties of copper plasma-modified polyethylene. *Polymer*, 47(21), 7441–7445. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2006.08.057>.

- [77] Borkow, G., & Gabbay, J. (2004). Putting copper into action: copper-impregnated products with potent biocidal activities. *The FASEB Journal*, 18(14), 1728–1730. <https://doi.org/10.1096/fj.04-2029fje>.
- [78] Borkow, G., Zhou, S. S., Page, T., & Gabbay, J. (2010). A Novel Anti-Influenza Copper Oxide Containing Respiratory Face Mask. *PLoS ONE*, 5(6), e11295. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011295>.
- [79] CDC. (2018). Current Standard Testing Procedures for Air-Purifying Respirators | NPPTL | NIOSH | CDC. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/niosh/npptl/stps/apresp.html>. [último acesso em 07 de setembro 2020].
- [80] American Association of Textile Chemists and Colorists (AATCC). (2020, June). Guidance and Considerations for General Purpose Textile Face Coverings: Adult. <https://members.aatcc.org/4DCGI/download/b7e0U1z4k/M014.pdf>.
- [81] CDC. (2020, February 11). Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). Using Personal Protective Equipment (PPE). Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/using-ppe.html>. [último acesso em 07 de setembro 2020].
- [82] CDC. (2020, February 11). Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). Clinical Questions about COVID-19: Questions and Answers. Centers for Disease Control and Prevention. [https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/faq.html?CDC\\_AA\\_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fcoronavirus%2F2019ncov%2Fhcp%2Finfection-control-faq.html](https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/faq.html?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fcoronavirus%2F2019ncov%2Fhcp%2Finfection-control-faq.html). [último acesso em 07 de setembro 2020].
- [83] Matsuyama, S., Nao, N., Shirato, K., Kawase, M., Saito, S., Takayama, I., Nagata, N., Sekizuka, T., Katoh, H., Kato, F., Sakata, M., Tahara, M., Kutsuna, S., Ohmagari, N., Kuroda, M., Suzuki, T., Kageyama, T., & Takeda, M. (2020). Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(13), 7001–7003. <https://doi.org/10.1073/pnas.2002589117>.
- [84] Liu, J., Zhang, X., Zhang, H., Zheng, L., Huang, C., Wu, H., Wang, R., & Jin, X. (2017). Low resistance bicomponent spunbond materials for fresh air filtration with ultra-high dust holding capacity. *RSC Advances*, 7(69), 43879–43887. <https://doi.org/10.1039/c7ra07694k>.
- [85] Yim, W., Cheng, D., Patel, S. H., Kou, R., Meng, Y. S., & Jokerst, J. V. (2020, November 30). KN95 and N95 Respirators Retain Filtration Efficiency despite a Loss of Dipole Charge during Decontamination. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 12(49), 54473–54480. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c17333>.
- [86] Wang, C. S. (2001, August). Electrostatic forces in fibrous filters—a review. *Powder Technology*, 118(1–2), 166–170. [https://doi.org/10.1016/s0032-5910\(01\)00307-2](https://doi.org/10.1016/s0032-5910(01)00307-2).

- [87] Lam, T. N., Wu, C. H., Huang, S. H., Ko, W. C., Huang, Y. L., Ma, C. Y., Wang, C. C., & Huang, E. W. (2019, October 28). Multi-Scale Microstructure Investigation for a PM2.5 Air-Filter Efficiency Study of Non-Woven Polypropylene. *Quantum Beam Science*, 3(4), 20. <https://doi.org/10.3390/qubs3040020>.
- [88] Mattox, D. M. (1998). *Handbook of Physical Vapor Deposition (PVD) Processing (Materials Science and Process Technology)* (1st ed.). William Andrew.
- [89] Bunshah, R. F. (2002). *Handbook of Hard Coatings: Deposition Technologies, Properties and Applications (Materials and Processing Technology)* (1st ed.). William Andrew.
- [90] Wasa, K., Kanno, I., Hidetoshi, K. Wasa, K. (2012). *Handbook of Sputter Deposition Technology: Fundamentals and Applications for Functional Thin Films, Nano-Materials and MEMS* (2nd ed.). William Andrew.
- [91] Moutinho, A. M.C., Silva, M. E. S. F., Cunha, M. A. C. M. I. (1980). *Tecnologia de Vácuo* (1ª ed.). Universidade de Nova Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia.
- [92] Baptista, A., Silva, F., Porteiro, J., Míguez, J., Pinto, G., & Fernandes, L. (2018). On the Physical Vapour Deposition (PVD): Evolution of Magnetron Sputtering Processes for Industrial Applications. *Procedia Manufacturing*, 17, 746–757. <https://doi.org/10.1016/j.promfg.2018.10.125>.
- [93] Seshan, K. (2002). *Handbook of Thin Film Deposition (Materials and Processing Technology)* (1st ed.). William Andrew.
- [94] Stoddart, M. J. (2011). Cell Viability Assays: Introduction. *Methods in Molecular Biology*, 1–6. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6_1).
- [95] Aslantürk, Ö. S. (2018). In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.71923>.
- [96] Präbst, K., Engelhardt, H., Ringgeler, S., & Hübner, H. (2017). Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. *Methods in Molecular Biology*, 1–17. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9_1).
- [97] Azad, T., Tashakor, A., & Hosseinkhani, S. (2014). Split-luciferase complementary assay: applications, recent developments, and future perspectives. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(23), 5541–5560. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-7980-8>.
- [98] Borkow, G., Sidwell, R. W., Smee, D. F., Barnard, D. L., Morrey, J. D., Lara-Villegas, H. H., Shemer-Avni, Y., & Gabbay, J. (2007). Neutralizing Viruses in Suspensions by Copper Oxide-Based Filters. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(7), 2.

- [99] Steam Sterilization | Disinfection & Sterilization Guidelines | Guidelines Library | Infection Control | CDC. (2008). Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/disinfection/sterilization/steam.html>. [último acesso em 19 de novembro de 2021].
- [100] ISO 10993-5 (2009). Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. International Organization for Standardization (ISO). <https://www.iso.org/standard/16869.html> . [último acesso em 25 de novembro de 2021].
- [101] ISO 10993-12 (2021). Biological evaluation of medical devices - Part 12: Sample preparation and reference materials. International Organization for Standardization (ISO). <https://www.iso.org/standard/16869.html> . [último acesso em 25 de novembro de 2021].
- [102] NCCLS M07 (2018). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m07/>. [último acesso em 23 de abril de 2022].
- [103] AATCC TM147-2011(2016)e. Antibacterial Activity of Textile Materials: Parallel Streak. American Association of Textile Chemists and Colorists (AATCC). <https://members.aatcc.org/store/tm147/554/>. [último acesso em 02 de maio de 2022].
- [104] Stiefel, P., Schneider, J., Amberg, C., Maniura-Weber, K., & Ren, Q. (2016). A simple and rapid method for optical visualization and quantification of bacteria on textiles. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep39635>.
- [105] Your Guide to Masks. (2020, February 11). Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/prevent-getting-sick/about-face-coverings.html>.
- [106] Masks and Respirators. (2022, January 21). Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/prevent-getting-sick/types-of-masks.html>.
- [107] Elias, S. T., Santos, A. F. D., Garcia, F. C., Pereira, P. N., Hilgert, L. A., Fonseca-Bazzo, Y. M., Guerra, E. N. S., & Ribeiro, A. P. D. (2015). Cytotoxicity of Universal, Self-Etching and Etch-and-Rinse Adhesive Systems According to the Polymerization Time. *Brazilian Dental Journal*, 26(2), 160–168. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201300294>.
- [108] Nath, S., Kalmodia, S., & Basu, B. (2011). In vitro biocompatibility of novel biphasic calcium phosphate-mullite composites. *Journal of Biomaterials Applications*, 27(5), 497–509. <https://doi.org/10.1177/0885328211412206>.
- [109] National Committee for Clinical Laboratory Standards, National Committee for Clinical Laboratory Standards, & Barry, A. L. (1999). *Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents: Approved Guideline*. NCCLS.

- [110] Pankey, G. A., & Sabath, L. D. (2004, March 15). Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections. *Clinical Infectious Diseases*, 38(6), 864–870. <https://doi.org/10.1086/381972>.
- [111] Alagarasan, D., Harikrishnan, A., Surendiran, M., Indira, K., Khalifa, A. S., & Elesawy, B. H. (2021, September 12). Synthesis and characterization of CuO nanoparticles and evaluation of their bactericidal and fungicidal activities in cotton fabrics. *Applied Nanoscience*. <https://doi.org/10.1007/s13204-021-02054-5>.

## APÊNDICE A - DIAGRAMA ELETRÔNICO DO DISPOSITIVO SIMULADOR DE RESPIRAÇÃO

A Figura 28 disposta neste Apêndice demonstra o diagrama eletrônico utilizado para controle dos diversos elementos do dispositivo simulador de respiração.

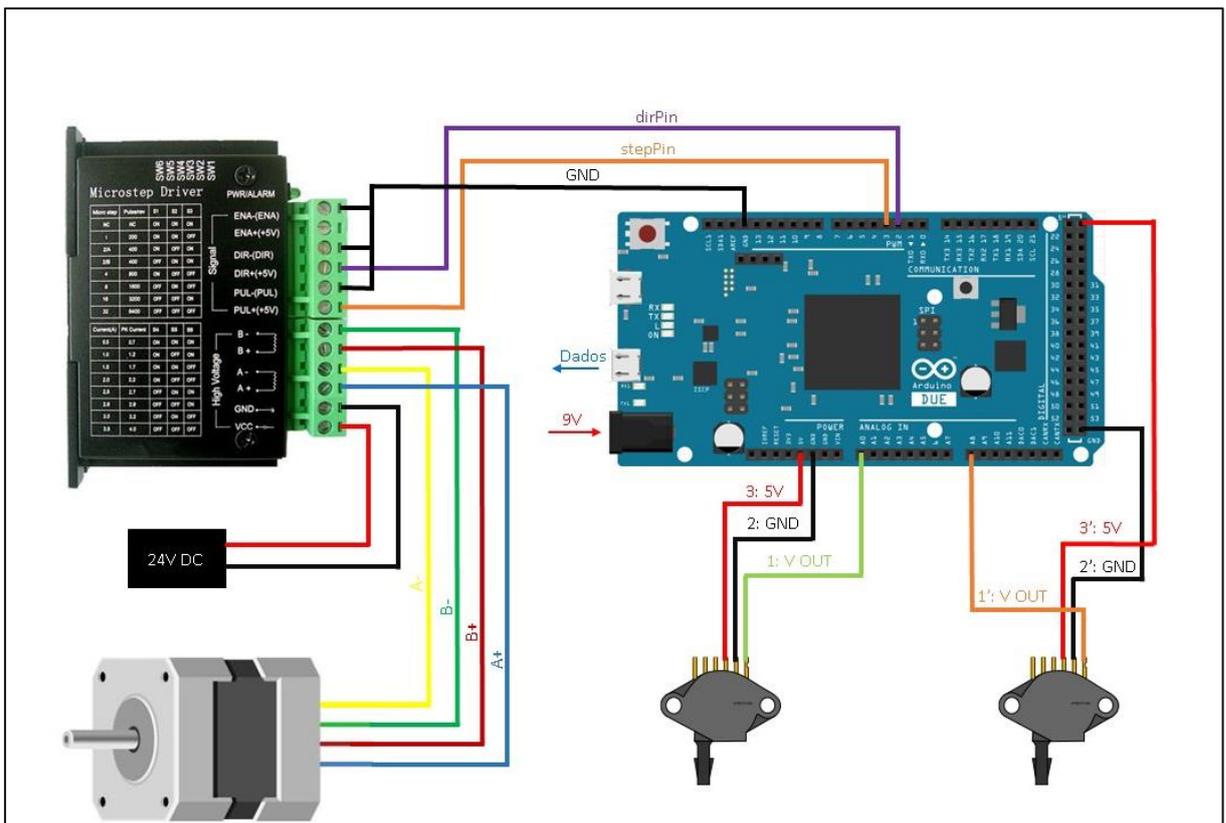


Figura 1 - Diagrama eletrônico do dispositivo simulador de respiração

## ANEXO A - CERTIFICADO TECIDO NÃO TECIDO DE POLIPROPILENO



Cachoeirinha – RS  
Fone: 3470.4646 / 3102.5183  
Site: www.nonwoven.com.br

### Certificado de Análises

<b>Data:</b> 17/11/2020		
<b>Material:</b> TNT 148 Gr.		
<b>Cor:</b> Branco	<b>100 % POLIPROPILENO, HIDROFOBICO</b>	
<b>Lote:</b> 2264D	<b>NF-e:</b>	<b>Data produção:</b> 12/09/2020

#### MÉTODOS/PROCEDIMENTOS UTILIZADOS:

##### Resistencia à Tração:

Ensaio utilizado para definir a resistência a tração. Corpos de prova em forma de tira, obtidos nos sentidos longitudinal e transversal da amostra. Equipamento: Máquina Universal de Ensaio, com velocidade de afastamento das garras de 500 mm/min, distância entre garras de 100 mm, tamanho das amostras de prova 300x50 mm. Metodologia de ensaio baseada na norma NBR13041.

##### Resistencia à Rasgamento:

Ensaio utilizado para definir a resistência ao rasgamento. Corpos de prova obtidos nos sentidos longitudinal e transversal da amostra. Máquina Universal de Ensaio, com afastamento das garras de 500 mm/min. Metodologia de ensaio baseada na norma NBR 13041

#### RESULTADOS OBTIDOS:

VARIÁVEIS	MÉTODO DE TESTE	UNIDADE	MIN	TARGET	MÁX	RESULTADO
Gramatura	EDANA WSP 130.1	g/m <sup>2</sup>	133,0	148,0	163,0	146,6
Resistência Longit	EDANA WSP 110.1	N/5cm	200,00	250,00	-	217
Resistência Transv.	EDANA WSP 110.1	N/5cm	110,00	180,00	-	124
Alongamento Longit	EDANA WSP 110.1	%	80,00	150,00	200,00	83
Alongamento Transv.	EDANA WSP 110.1	%	100,00	160,00	210,00	94

*Francine V. Roque.*

Responsável pelas Amostras  
Francine Vargas Roque

*Vilmar C. Roque*

Controle de Qualidade  
Vilmar Cardoso Roque

Figura 2 - Certificado do não tecido de polipropileno