

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL**  
**ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS EXATAS E ENGENHARIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS**  
**MATERIAIS**

**TESE DE DOUTORADO**

**ALINE LUCCHESI SCHIO**

**AUMENTO DA ATIVIDADE BACTERICIDA E VIRUCIDA DE PARTÍCULAS E DE**  
**FILMES COMPÓSITOS DE COBRE SOB INFLUÊNCIA DE LUZ BRANCA**

**CAXIAS DO SUL**

**2024**

**ALINE LUCCHESI SCHIO**

**AUMENTO DA ATIVIDADE BACTERICIDA E VIRUCIDA DE PARTÍCULAS E DE  
FILMES COMPÓSITOS DE COBRE SOB INFLUÊNCIA DE LUZ BRANCA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais da Universidade de Caxias do Sul como requisito para obtenção do grau de Doutora em Engenharia e Ciência dos Materiais.

**Orientador:** Prof. Dr. Carlos Alejandro Figueroa.

**Coorientadoras:** Profa. Dra. Gislaine Fongaro e Profa. Dra. Mariana Roesch Ely.

**CAXIAS DO SUL**

**2024**

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

S336a Schio, Aline Lucchesi

Aumento da atividade bactericida e virucida de partículas e de filmes compósitos de cobre sob influência de luz branca [recurso eletrônico] / Aline Lucchesi Schio. – 2024.

Dados eletrônicos.

Tese (Doutorado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais, 2024.

Orientação: Carlos Alejandro Figueroa.

Coorientação: Gislaïne Fongaro, Mariana Roesch Ely.

Modo de acesso: World Wide Web

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

1. Materiais. 2. Cobre. 3. Microorganismos. 4. Bactericidas. I. Figueroa, Carlos Alejandro, orient. II. Fongaro, Gislaïne, coorient. III. Ely, Mariana Roesch, coorient. IV. Título.

CDU 2. ed.: 658.7

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

**ALINE LUCCHESI SCHIO**

**AUMENTO DA ATIVIDADE BACTERICIDA E VIRUCIDA DE PARTÍCULAS E DE  
FILMES COMPÓSITOS DE COBRE SOB INFLUÊNCIA DE LUZ BRANCA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais da Universidade de Caxias do Sul como requisito para obtenção do grau de Doutora em Engenharia e Ciência dos Materiais.

Aprovada em 28 de novembro de 2024.

**Orientadores:**

Prof. Dr. Carlos Alejandro Figueroa (Orientador)  
*Universidade de Caxias do Sul*

Profa. Dra. Gislaine Fongaro (Coorientadora)  
*Universidade Federal de Santa Catarina*

Profa. Dra. Mariana Roesch Ely (Coorientadora)  
*Universidade de Caxias do Sul*

**Banca Examinadora:**

Dr. Fernando Graniero Echeverrigaray  
*Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer*

Prof. Dr. Sergio Yesid Gómez González  
*Universidade Federal de Santa Catarina*

Profa. Dra. Caroline Rigotto  
*Universidade Feevale*

Profa. Dra. Ana Paula Delamare  
*Universidade de Caxias do Sul*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a **Deus** pela vida e pelo privilégio de estar concluindo este trabalho. Sou grata por ter tanto a agradecer!

À minha mãe, **Salete**, pelo constante incentivo, carinho e amor em todos os momentos da minha vida.

Ao meu pai, **Elton** (*in memoriam*), cujo apoio, humildade e positividade sempre me inspiraram e guiaram.

Ao **Dionisio**, pelo constante incentivo e companheirismo. Ter com quem compartilhar a vida é uma bênção.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Carlos Alejandro Figueroa**, pela dedicação nas orientações e pelos conhecimentos compartilhados ao longo desse período. Agradeço pela confiança e incentivo, que foram constantes.

Às minhas co-orientadoras, **Profa. Dra. Gislaine Fongaro** e **Profa. Dra. Mariana Roesch-Ely**, e ao **Prof. Dr. Alexandre Fassini Michels**, pelas fundamentais contribuições que tornaram este trabalho possível e enriqueceram sua realização.

Aos membros da Banca de Qualificação, **Profa. Dra. Izabella Thaís da Silva**, **Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray** (*in memoriam*) e **Prof. Dr. Thiago Barcellos**; e aos membros da Banca de Defesa, **Dr. Fernando Graniero Echeverrigaray**, **Prof. Dr. Sergio Yesid Gómez González**, **Profa. Dra. Caroline Rigotto** e **Profa. Dra. Ana Paula Delamare**, por todas as valiosas contribuições.

Ao incrível grupo de pesquisa **Epipolé**, a todos os antigos e novos integrantes, pelo companheirismo, apoio e colaboração nessa jornada.

Agradeço também a todos os técnicos de laboratório da Universidade de Caxias do Sul pelo suporte e assistência fornecidos em inúmeros momentos, em especial à **Jocelei Duarte**, **Julcimára Santos Rossi**, **Rodrigo Antonio Barbieri** e **Sonia Blankenburg**.

Ao **Laboratório de Pesquisas Fotovoltaicas (LPF)** do Instituto de Física Gleb Wataghin, da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), em especial ao **Prof. Dr. Fernando Alvarez** e ao **Dr. Felipe Cemin**.

Ao **Laboratório de Toxicologia Aplicada e Bioprodutos (LTAB)** e ao **Laboratório de Enologia e Microbiologia Aplicada (LEMA)**, do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul e a todos os seus membros.

Ao **Laboratório de Virologia Aplicada (LVA)**, da Universidade Federal de Santa Catarina e a todos os seus membros.

Agradeço à **Universidade de Caxias do Sul (UCS)**, em especial ao **Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais (PPGMAT)**, por possibilitarem a realização desta pesquisa, e ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pela concessão da bolsa de doutorado.

A todas as demais pessoas que, de alguma forma, auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho. Obrigada!

## PRODUÇÕES BIBLIOGRÁFICAS E CONFERÊNCIAS

### ARTIGOS PUBLICADOS

SCHIO, A. L.; MICHELS, A. F.; FONGARO, G.; FIGUEROA, C. A. Trends in the Antiviral Chemical Activity of Material Surfaces Associated With the SARS-CoV-2 Outbreak. **Frontiers in Chemical Engineering**, v. 3, p. 1–6, 2021. DOI: 10.3389/fceng.2021.636075.

SCHIO, A. L.; LIMA, M. S. de; FRASSINI, R.; SCARIOT, F. J.; CEMIN, F.; ELOIS, M. A.; ALVAREZ, F.; MICHELS, A. F.; FONGARO, G.; ROESCH-ELY, M.; FIGUEROA, C. A. Light, Copper, Action: Visible-light illumination enhances bactericidal activity of copper particles. **ACS Biomaterials Science and Engineering**, v. 10, p. 1808–1818, 2024. DOI: 10.1021/acsbiomaterials.3c01873.

SCHIO, A. L.; LIMA, M. S. de; PEROTTI, B. L.; MICHELS, A. F.; FONGARO, G.; ROESCH-ELY, M.; FIGUEROA, C. A. Polymer matrix films containing copper particles with bactericidal activity under different illumination condition. **Materials Today Communications**, v. 41, p. 111031, 2024. DOI: 10.1016/j.mtcomm.2024.111031.

LIMA, M. S. de; SCHIO, A. L.; AGUZZOLI, C.; SOUZA, W.; ROESCH-ELY, M.; LEIDENS, L.; BOEIRA, C.; ALVAREZ, F.; ELOIS, M. A.; FONGARO, G.; FIGUEROA, C. A.; MICHELS, A. F. Visible light-driven photocatalysis and antibacterial performance of a Cu-TiO<sub>2</sub> nanocomposite. **ACS Omega**, v. 9, n. 41, p. 47122–47134, 2024. DOI: 10.1021/acsbiomaterials.3c01873.

### APRESENTAÇÕES EM CONGRESSOS

Em setembro de 2022, o trabalho intitulado *Antibacterial activity of copper-based materials under visible light illumination*, sob autoria de Aline L. Schio, Rafaele Frassini, Alexandre F. Michels, Mariana Roesch-Ely e Carlos A. Figueroa foi apresentado de forma oral por Aline L. Schio no *XX Brazilian Materials Research Society Meeting*, em Foz do Iguaçu/PR.

Em outubro de 2023, o trabalho intitulado *Bactericidal and virucidal activity of polymer-based copper coating boosted by visible light radiation*, sob autoria de Aline L. Schio, Michele S. de Lima, Rafael D. Cadamuro, Alexandre F. Michels, Mariana Roesch-Ely, Gislaine Fongaro e Carlos A. Figueroa foi apresentado de forma oral por Aline L. Schio no *XXI Brazilian Materials Research Society Meeting*, em Maceió/AL.

## RESUMO

Diante da pandemia causada pelo novo coronavírus de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV-2) no final de 2019, a linha de pesquisa em materiais virucidas foi impulsionada. Ainda, diante do crescente número de microrganismos resistentes a antibióticos e das constantes infecções associadas aos cuidados de saúde, a pesquisa por materiais e superfícies bactericidas também é crescente. O cobre (Cu) se destaca nesse contexto devido às suas propriedades biocidas intrínsecas. Ademais, por absorver luz na região do visível é um material fotoativo, uma propriedade ainda pouco estudada e reportada na literatura. Para preencher essa lacuna, o presente estudo avaliou as propriedades bactericidas de suspensões de partículas de cobre metálico em micro (CuMPs) e nanoescala (CuNPs), bem como de micropartículas de óxido de cobre (I) (Cu<sub>2</sub>OMPs), na ausência de luz e sob iluminação com luz branca, frente à *Staphylococcus aureus* e à *Escherichia coli*. Na sequência, as partículas foram incorporadas a uma matriz polimérica de álcool polivinílico (PVA), resultando em filmes compósitos, os quais foram avaliados contra as mesmas bactérias e o vírus envelopado da hepatite murina tipo 3 (MHV-3), utilizando as duas condições de iluminação. Por espectroscopia UV-Vis confirmou-se que as três partículas apresentam banda proibida na região visível do espectro. Pelas técnicas de DRX, FTIR e Raman, não foi observada a presença de agentes contaminantes e ou de oxidação, embora por XPS tenha sido observada a oxidação parcial da superfície das partículas. Pelas técnicas de micrografia, observou-se que as CuMPs e as Cu<sub>2</sub>OMPs apresentam um tamanho médio de  $7,7 \pm 5,6 \mu\text{m}$  e  $7,6 \pm 3,9 \mu\text{m}$ , respectivamente, enquanto as CuNPs encontram-se na faixa de  $43 \pm 12 \text{ nm}$ . A fotoatividade bactericida contra *S. aureus* das suspensões de CuMPs e Cu<sub>2</sub>OMPs a  $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$  foi significativamente superior sob iluminação por luz visível (7 log), apresentando aumentos de 66% e 37% ( $p < 0,05$ ), respectivamente, em relação aos ensaios conduzidos no escuro. Os resultados possibilitam inferir que a fotoatividade desses materiais é dose-dependente. Quanto à suspensão de CuNPs na mesma concentração, conferiu-se a superioridade do material nanoparticulado, o qual subjuga a ação fotocatalítica, conferindo uma atividade bactericida tamanho-dependente. Frente à *E. coli*, as CuNPs apresentaram maior atividade, seguida das Cu<sub>2</sub>OMPs, que na concentração de  $5 \text{ mg mL}^{-1}$  reduziu em 3 unidades logarítmicas a carga bacteriana em ambas as condições de iluminação. Por fim, a suspensão de  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  de CuMPs evidenciou uma redução logarítmica superior, passando de 3 para 8 log no ensaio sob iluminação ( $p < 0,001$ ), indicando uma redução logarítmica 167% superior. Conferida a fotoatividade das partículas de cobre, foram sintetizados filmes compósitos por *drop casting* incorporando 2% m/v de partículas. Em 24 horas de exposição, tanto frente à *S. aureus* como à *E. coli*, os filmes apresentaram redução de 6 log das cargas bacterianas (redução acima de 99,9999%), resultados expressivos embora sem distinção entre as condições de iluminação. Nos ensaios com o vírus MHV-3, utilizando a linhagem de fibroblastos de camundongo L929, apenas o filme com as CuMPs, no ensaio sob iluminação, não apresentou efeito citopático, indicando fotoatividade virucida. Com a realização do ensaio ICC-RT-qPCR, verificou-se que o filme compósito promoveu uma redução de 43,1% da carga viral quanto iluminado por luz branca, enquanto no escuro, a redução foi de apenas 6,8%. Desse modo, foi conferida a obtenção de filmes compósitos fotoativos a partir da incorporação de micropartículas de cobre de baixo custo relativo e de uma técnica de deposição convencional. Com os resultados promissores, o estudo corrobora para o avanço das pesquisas relacionadas a materiais e superfícies com propriedades fotocatalíticas sob luz visível no combate à disseminação de patógenos.

**Palavras-chave:** cobre, álcool polivinílico, fotoatividade, filme bactericida, filme virucida, superfície biocida.



## ABSTRACT

In light of the pandemic caused by the novel coronavirus (SARS-CoV-2) in late 2019, research into virucidal materials has accelerated. Additionally, with the rise of antibiotic-resistant microorganisms and the constant healthcare-associated infections, the interest in the development of bactericidal materials and surfaces is also rising. Copper (Cu) stands out in this field due to its intrinsic biocidal properties. Moreover, copper's ability to absorb visible light makes it a photoactive material, a characteristic that has not been extensively studied or reported in the literature. To fill this gap, the present study evaluated the bactericidal properties of suspensions of metallic copper particles at both micro (CuMPs) and nanoscale (CuNPs), as well as copper (I) oxide microparticles (Cu<sub>2</sub>OMPs), under dark and white light illumination conditions against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The particles were subsequently incorporated into a polyvinyl alcohol (PVA) matrix to obtain composite films, which were tested against the same bacterial strains and the enveloped murine hepatitis virus type 3 (MHV-3) under both illumination conditions. UV-Vis spectroscopy confirmed that all particles exhibit a band gap in the visible region. XRD, FTIR, and Raman analyses did not detect contamination or oxidization, though XPS revealed partial oxidation on the surfaces of the particles. Microscopic analysis showed average sizes of  $7.7 \pm 5.6 \mu\text{m}$  for CuMPs and  $7.6 \pm 3.9 \mu\text{m}$  for Cu<sub>2</sub>OMPs, while CuNPs measured approximately  $43 \pm 12 \text{ nm}$ . The bactericidal photoactivity against *S. aureus* for CuMPs and Cu<sub>2</sub>OMPs suspensions at a concentration of  $2.5 \text{ mg mL}^{-1}$  was significantly enhanced under visible light, achieving a 7 log reduction, with increases of 66% and 37% ( $p < 0.05$ ), respectively, compared to dark conditions. These findings suggest that the photoactivity of these materials is dose-dependent. For the CuNPs suspension at the same concentration, the nanoparticulate material demonstrated superior performance, indicating that copper bactericidal action is also size-dependent. Against *E. coli*, CuNPs exhibited the highest activity, followed by Cu<sub>2</sub>OMPs, which at a concentration of  $5 \text{ mg mL}^{-1}$  reduced the bacterial load by 3 logarithmic units under both illumination conditions. The  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  CuMP suspension displayed a substantial increase, achieving a logarithmic reduction from 3 to 8 log under illumination ( $p < 0.001$ ), indicating a 167% higher activity. After confirming the photoactivity of the copper particles, composite films were synthesized by incorporating 2% w/v of the particles by the drop casting technique. Over a 24-hour exposure period, the films demonstrated a 6 log reduction in bacterial load (over 99.9999% reduction) against both *S. aureus* and *E. coli*, showing impressive results without significant differences between illumination conditions. In tests against the MHV-3 virus, using mouse fibroblast line L929, only the film containing CuMPs under illuminated conditions showed no cytopathic effect, indicating virucidal photoactivity. The ICC-RT-qPCR assay revealed that the composite film reduced viral load by 43.1% when exposed to white light, while the reduction in dark conditions was only about 6.8%. These findings demonstrate the successful synthesis of photoactive composite films using relatively low-cost copper microparticles and a conventional deposition method. The promising results highlight the potential of materials and surfaces with photocatalytic properties activated by visible light to combat the spread of pathogens, supporting further research and development in this field.

**Keywords:** copper, polyvinyl alcohol, photoactivity, bactericidal film, virucidal film, biocidal surface.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura da parede celular de bactérias Gram-positiva e Gram-negativa.....	25
Figura 2 – Micrografia eletrônica de varredura da <i>S. aureus</i> (a) e micrografia eletrônica de transmissão de uma célula dividida de <i>S. aureus</i> de 0,8 µm de diâmetro evidenciando a parede celular Gram-positiva (b).....	26
Figura 3 – Micrografias eletrônicas de varredura da <i>E. coli</i> (a) e de células <i>E. coli</i> aderidas no intestino grosso em simbiose mutualismo (b) .....	27
Figura 4 – Comparação de partículas virais não envelopadas e envelopadas .....	28
Figura 5 – Microscopia eletrônica (a) e estrutura (b) do coronavírus murino.....	29
Figura 6 – Representação da disseminação de vírus respiratórios associada a fômites .....	30
Figura 7 – Representação esquemática das técnicas de deposição <i>drop casting</i> (a), <i>dip coating</i> (b) e <i>spin coating</i> (c).....	32
Figura 8 – Fotos de uma maçaneta sem (a) e com o revestimento Cu <sub>2</sub> O/PU (b), e da micrografia da seção transversal do revestimento (c) .....	33
Figura 9 - Película de tela de celular transparente de PVA contendo cobre e grafeno .....	33
Figura 10 – Mecanismo da atividade bactericida do cobre .....	37
Figura 11 – Mecanismos de ação virucida (a,b) e antiviral (c,d) de nanopartículas .....	39
Figura 12 – Representação ilustrativa do mecanismo fotocatalítico por irradiação solar .....	40
Figura 13 – Comparação entre espectro solar e os espectros de absorção de TiO <sub>2</sub> e Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> . ...	41
Figura 14 – Fluxograma da metodologia da presente pesquisa.....	43
Figura 15 – Fotos do sistema de iluminação adaptado para análise da atividade fotocatalítica bactericidas e virucidas das amostras .....	48
Figura 16 – Representação esquemática dos ensaios para avaliação da fotoatividade bactericida das partículas de cobre.....	50
Figura 17 – Representação do ensaio de viabilidade por contagem de células bacterianas utilizando kit LIVE/DEAD BacLight.....	52
Figura 18 – Esquema representativo da síntese dos filmes compósitos por <i>drop casting</i> .....	54

Figura 19 – Representação esquemática dos ensaios para avaliação da fotoatividade bactericida dos filmes compósitos .....	57
Figura 20 – Esquema do ensaio para avaliação da fotoatividade virucida dos filmes compósitos .....	60
Figura 21 – Esquema do ensaio para avaliação da citotoxicidade indireta dos filmes compósitos .....	62
Figura 22 – Esquema do ensaio para avaliação da citotoxicidade direta dos filmes compósitos .....	63
Figura 23 – Espectros de reflectância (a) convertidos em espectros de absorbância (b) para determinação da energia proibida das CuMPs (c), CuNPs (d) e Cu <sub>2</sub> OMPs (e). .....	65
Figura 24 – Difractogramas obtidos por DRX das partículas de cobre.....	66
Figura 25 – Espectros obtidos por ATR-FTIR (a) e Raman (b) das micro e nanopartículas de cobre metálico e sua respectiva célula unitária .....	67
Figura 26 – Espectros obtidos por ATR-FTIR (a) e Raman (b) das micropartículas de óxido de cobre (I) e sua respectiva célula unitária .....	67
Figura 27 – Espectro total de XPS das partículas de cobre .....	68
Figura 28 – Deconvoluções dos espectros de XPS na região Cu 2p das partículas de cobre...	70
Figura 29 – Deconvoluções dos espectros de XPS nas regiões O 1s e C 1s das partículas .....	72
Figura 30 – Micrografias obtidas por MEV das amostras CuMPs (a,b) e Cu <sub>2</sub> OMPs (c,d).....	73
Figura 31 – Histogramas de distribuição de tamanho das CuMPs (a) e Cu <sub>2</sub> OMPs (b).....	74
Figura 32 – Micrografias obtidas por MEV-FEG (a) e por MET (b) da amostra CuNPs e seu respectivo histograma (c).....	74
Figura 33 – Espectros de EDS e mapa elementar das partículas de cobre .....	75
Figura 34 – Fotografias dos ensaios referentes à fotoatividade bactericida das CuMPs sobre <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> .....	76
Figura 35 – Fotografias dos ensaios referentes à fotoatividade bactericida das CuNPs sobre <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> .....	78
Figura 36 – Fotografias dos ensaios referentes à fotoatividade bactericida de Cu <sub>2</sub> OMPs sobre <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> .....	79

Figura 37 – Redução logarítmica da população bacteriana de <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> frente as partículas de cobre na ausência (L-) e presença de luz (L+) .....	79
Figura 38 – Médias marginais estimadas dos ensaios bactericidas contra <i>S. aureus</i> utilizando suspensão de 2,5 mg mL <sup>-1</sup> de partículas de cobre .....	80
Figura 39 – Micrografias observadas por microscopia de fluorescência com aumentos de 200 e 1000x dos ensaios com <i>S. aureus</i> usando suspensões de 2,5 mg mL <sup>-1</sup> de CuMPs na ausência de luz e sob iluminação de luz visível.....	83
Figura 40 – Micrografias observadas por microscopia de fluorescência com aumentos de 200 e 1000x dos ensaios com <i>E. coli</i> usando suspensões de 10 mg mL <sup>-1</sup> de CuMPs na ausência de luz e sob iluminação de luz visível.....	84
Figura 41 – Micrografias observadas por microscopia de fluorescência com aumentos de 200x dos ensaios com <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> usando suspensões de 2,5 e 5 mg mL <sup>-1</sup> de Cu <sub>2</sub> OMPs, respectivamente, na ausência de luz e sob iluminação de luz visível.....	85
Figura 42 – Densidade celular das amostras submetidas à incubação na ausência de luz e sob iluminação de luz visível com CuMPs para <i>S. aureus</i> (a) e <i>E. coli</i> (b) e Cu <sub>2</sub> OMPs para <i>E. coli</i> (c) .....	86
Figura 43 – Gráficos de citometria de fluxo de acúmulo intracelular de ROS utilizando CuMPs (a) e CuNPs (b). Gráfico de citometria de fluxo da viabilidade de células de <i>E. coli</i> com e sem tratamento (c).....	88
Figura 44 – Foto das lamínulas de vidro com filme PVA 5% puro (PVA) e dos filmes compósitos com 2% m/v de partículas incorporadas .....	89
Figura 45 – Espectros de absorção (a) e gráficos de Tauc dos filmes PVA-CuMPs (b), PVA-CuNPs (c) e PVA-Cu <sub>2</sub> OMPs (d).....	90
Figura 46 – Difractogramas obtidos por DRX dos filmes compósitos .....	91
Figura 47 – Espectros obtidos por ATR-FTIR dos filmes compósitos .....	92
Figura 48 – Micrografias e mapas de distribuição de elementos do filme de PVA puro na seção longitudinal (a) e na seção transversal (b).....	93
Figura 49 – Micrografias da seção longitudinal dos filmes compósitos com CuMPs (a), CuNPs (b) e Cu <sub>2</sub> OMPs (c) e seus respectivos mapas de distribuição de cobre obtidos por EDS ( <i>inset</i> ) .....	94

Figura 50 – Micrografias da seção transversal dos filmes compósitos com CuMPs (a), CuNPs (b) e Cu <sub>2</sub> OMPs (c) e mapas de distribuição de cobre obtidos por EDS de outra área dos filmes com CuMPs (d), CuNPs (e) e Cu <sub>2</sub> OMPs (f).....	95
Figura 51 – Perfil da composição elementar dos filmes compósitos por GDOES.....	96
Figura 52 – Micrografias obtidas por AFM dos filmes de PVA puro e compósitos.....	97
Figura 53 – Curva da decomposição térmica (TGA) e da primeira derivada (DTG) do filme de PVA puro (a) e dos filmes compósitos com CuMPs (b), CuNPs (c) e Cu <sub>2</sub> OMPs (d).....	99
Figura 54 – Ângulo de contato dos filmes compósitos .....	100
Figura 55 – Fotografias dos ensaios desenvolvidos referentes à fotoatividade bactericida dos filmes compósitos frente à <i>S. aureus</i> .....	102
Figura 56 – Fotografias dos ensaios desenvolvidos referentes à fotoatividade bactericida dos filmes compósitos frente à <i>E. coli</i> .....	103
Figura 57 – Redução logarítmica da população bacteriana de <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> frente aos filmes compósitos.....	104
Figura 58 – Fotografias das monocamadas celulares observadas por microscopia com aumento de 40x das placas do ensaio da atividade virucida do filme de PVA e dos filmes compósitos contra o MHV-3 na ausência de luz e sob iluminação com luz branca.....	105
Figura 59 – Esquema representativo da redução do MTT a formazan.....	108
Figura 60 – Viabilidade celular da linhagem L929 pelo ensaio MTT com os filmes de PVA e os filmes compósitos .....	109
Figura 61 – Micrografias obtidas por MEV-FEG do ensaio de citotoxicidade direto realizado no escuro (L-) e sob iluminação (L+) com o filme de PVA puro .....	110
Figura 62 – Micrografias obtidas por MEV-FEG do ensaio de citotoxicidade direto realizado no escuro (L-) e sob iluminação (L+) com o filme de PVA-CuMPs .....	111
Figura 63 – Micrografias obtidas por MEV-FEG do ensaio de citotoxicidade direto realizado no escuro (L-) e sob iluminação (L+) com o filme de PVA-CuNPs .....	112
Figura 64 – Micrografias obtidas por MEV-FEG do ensaio de citotoxicidade direto realizado no escuro (L-) e sob iluminação (L+) com o filme de PVA-Cu <sub>2</sub> OMPs .....	113

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Ordem de classificação dos quatro patógenos mais frequentes relatados pela <i>National Healthcare Safety Network</i> associados às IACS no período de 2015 a 2017.....	24
Tabela 2 – Descrição das partículas de cobre e de óxido de cobre (I) avaliadas no trabalho ..	44
Tabela 3 – Redução logarítmica em termos de redução percentual da carga bacteriana .....	51
Tabela 4 – Concentrações estimadas das fases de cobre na superfície das partículas de cobre .....	71
Tabela 5 – Descrição dos filmes compósitos obtidos por <i>drop casting</i> .....	89
Tabela 6 – Rugosidade quadrática média e rugosidade média dos filmes de PVA puro e compósitos.....	98
Tabela 7 – Efeito citopático do vírus MHV-3 na linhagem celular L929 sob diferentes tratamentos .....	106

## LISTA DE ABREVIATURAS, ACRÔNIMOS E SIGLAS

AAS	Espectrometria de absorção atômica (do inglês <i>Atomic absorption spectrometry</i> )
AFM	Microscopia de força atômica (do inglês <i>Atomic force microscopy</i> )
ATCC	Coleção de microrganismos americana (do inglês <i>American Type Culture Collection</i> )
ATR-FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier com reflectância total atenuada (do inglês <i>Attenuated total reflectance Fourier-transform infrared spectroscopy</i> )
BET	Brunauer, Emmett, Teller
CBM	Concentração bactericida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
COVID-19	Doença infecciosa causada pelo vírus SARS-CoV-2
Cu <sub>2</sub> OMPs	Micropartículas de óxido de cobre (I)
CuMPs	Micropartículas de cobre metálico
CuNPs	Nanopartículas de cobre metálico
DMEM	Meio essencial mínimo modificado por Dulbecco (do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> )
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
DRX	Difração de raios X
DTG	Primeira derivada da curva termogravimétrica (do inglês <i>Derivative thermogravimetry</i> )
ECP	Efeito citopático
EDS	Espectroscopia de raios X por dispersão de energia (do inglês <i>Energy-dispersive X-ray spectroscopy</i> )
$E_g$	Banda proibida (do inglês <i>Band gap</i> )
GDOES	Espectroscopia de emissão óptica por descarga luminescente (do inglês <i>Glow Discharge Optical Emission Spectroscopy</i> )
IACS	Infecções associadas aos cuidados de saúde
ICC-RT-qPCR	Transcrição reversa quantitativa integrada à cultura celular (do inglês <i>Integrated Cell Culture and Reverse Transcription Quantitative PCR</i> )
ICP-OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (do inglês <i>Inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i> )

ICSD	Base de dados de estruturas cristalinas (do inglês <i>Inorganic crystal structure database</i> )
L929	Linhagem celular de fibroblastos de camundongos
LED	Diodo emissor de luz (do inglês <i>Light emitting diode</i> )
LPS	Lipopolissacarídeos
MEM	Meio essencial mínimo
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MEV-FEG	Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo
MHV-3	Vírus da hepatite murina (do inglês <i>Murine hepatitis virus type 3</i> )
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (do inglês <i>Multiple-resistant Staphylococcus aureus</i> )
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Solução salina tamponada com fosfato (do inglês <i>Phosphate buffered saline</i> )
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PVA	Álcool polivinílico
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês <i>Ribonucleic acid</i> )
ROS	Espécie reativa de oxigênio (do inglês <i>Reactive oxygen species</i> )
SARS-CoV-2	Coronavírus da síndrome respiratória aguda grave (do inglês <i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i> )
SFB	Soro fetal bovino
TCID <sub>50</sub>	Dose infecciosa para 50% da cultura de tecidos (do inglês, <i>50% Tissue Culture Infective Dose</i> )
TGA	Análise termogravimétrica (do inglês <i>Thermogravimetric analysis</i> )
UFC	Unidade formado de colônia
UV-Vis	Espectroscopia de absorção molecular na região do ultravioleta e do visível
XPS	Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (do inglês <i>X-ray photoelectron spectroscopy</i> )



## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
2	OBJETIVOS.....	22
2.1	OBJETIVO GERAL.....	22
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
3.1	AGENTES INFECCIOSOS E SAÚDE PÚBLICA.....	23
3.1.1	Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas: semelhanças e diferenças.....	25
3.1.2	Vírus envelopados e não-envelopados: semelhanças e diferenças.....	27
3.1.3	Medidas corretivas e de contenção mundiais no combate a bactérias e vírus....	29
3.2	SUPERFÍCIES E FILMES COM ATIVIDADE BIOCIDA E VIRUCIDA.....	30
3.2.1	Revestimentos com partículas metálicas.....	31
3.3	O COBRE E SEUS DERIVADOS NO COMBATE A MICRORGANISMOS.....	35
3.3.1	Mecanismos de ação bactericida e virucida do cobre e seus derivados.....	36
3.4	LUZ, COBRE E AÇÃO.....	39
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
4.1	PARTÍCULAS DE COBRE E DE ÓXIDO DE COBRE (I).....	44
4.1.1	Determinação da energia da banda proibida das partículas de cobre.....	44
4.1.2	Determinação da cristalinidade e da estrutura química das partículas de cobre por espectroscopias de DRX, FTIR e Raman.....	45
4.1.3	Análise da composição química superficial das partículas de cobre por XPS...	46
4.1.4	Análise morfológica, tamanho de partícula e composição elementar das partículas de cobre por microscopia eletrônica.....	46
4.2	CONDIÇÃO DE ILUMINAÇÃO PARA OS ENSAIOS BACTERICIDAS E VIRUCIDAS.....	47
4.3	CARACTERIZAÇÃO DA FOTOATIVIDADE BACTERICIDA DAS PARTÍCULAS DE COBRE.....	48
4.3.1	Testes de suscetibilidade bacteriana por Concentração Bactericida Mínima....	49

4.3.2	Viabilidade por contagem de células bacterianas utilizando kit LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability.....	51
4.3.3	Quantificação da liberação de íons de cobre e da geração de ROS das partículas de cobre	53
4.4	SÍNTESE DOS FILMES COMPÓSITOS .....	53
4.5	CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES COMPÓSITOS .....	55
4.5.1	Composição elementar dos filmes compósitos por GDOES .....	55
4.5.2	Rugosidade dos filmes compósitos por AFM.....	55
4.5.3	Caracterização do comportamento térmico dos filmes compósitos por análise termogravimétrica (TGA).....	56
4.5.4	Molhabilidade da superfície dos filmes compósitos por ângulo de contato.....	56
4.6	CARACTERIZAÇÃO DA FOTOATIVIDADE BACTERICIDA DOS FILMES COMPÓSITOS.....	57
4.7	CARACTERIZAÇÃO DA FOTOATIVIDADE VIRUCIDA DOS FILMES COMPÓSITOS.....	58
4.7.1	Condições do cultivo celular da linhagem L929 e da propagação viral do MHV-3	58
4.7.2	Ensaio virucida .....	59
4.8	CITOTOXICIDADE DOS FILMES COMPÓSITOS .....	61
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	64
5.1	CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS DE COBRE.....	64
5.1.1	Banda proibida das partículas de cobre .....	64
5.1.2	Difratogramas de DRX e espectros de FTIR e de Raman das partículas de cobre	65
5.1.3	XPS das partículas de cobre .....	68
5.1.4	Micrografias das partículas de cobre e respectivos EDS.....	73
5.2	EFEITO DA LUZ NA ATIVIDADE BACTERICIDA DAS PARTÍCULAS DE COBRE.....	76
5.2.1	Teste de suscetibilidade bacteriana por Concentração Bactericida Mínima .....	76

5.2.2	Viabilidade por contagem de células bacterianas utilizando kit LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability.....	82
5.2.3	Concentração dos íons de cobre liberados e da geração de ROS .....	87
5.3	PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES COMPÓSITOS.....	88
5.3.1	Caracterização dos filmes compósitos por espectroscopia UV-Vis .....	90
5.3.2	Difratogramas de DRX e espectros de FTIR dos filmes compósitos.....	91
5.3.3	Micrografias das seções longitudinais e transversais dos filmes compósitos seguidas de análise por EDS.....	92
5.3.4	Perfil da composição elementar dos filmes compósitos por GDOES .....	96
5.3.5	Rugosidade da superfície dos filmes compósitos por AFM.....	97
5.3.6	Comportamento térmico dos filmes compósitos .....	98
5.3.7	Molhabilidade por ângulo de contato .....	100
5.3.8	Liberação de íons de cobre dos filmes compósitos .....	101
5.4	FOTOATIVIDADE BACTERICIDA DOS FILMES COMPÓSITOS.....	101
5.5	FOTOATIVIDADE VIRUCIDA DOS FILMES COMPÓSITOS.....	104
5.6	CITOTOXICIDADE DOS FILMES COMPÓSITOS .....	108
6	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....	114
	REFERÊNCIAS .....	117

## 1 INTRODUÇÃO

O novo coronavírus designado como SARS-CoV-2 gerou a primeira pandemia causada por coronavírus. Em um período de quatro anos, foram registradas mais de 6,9 milhões de mortes no mundo pela doença provocada pelo vírus, a COVID-19. Tal cenário evidenciou que as medidas mundiais atuais para conter e mitigar surtos virais ainda são precárias e insuficientes (Schio *et al.*, 2021; WHO, 2023).

Entretanto, além dos vírus, bactérias também representam uma ameaça à saúde humana, especialmente na área hospitalar, pois são comumente responsáveis pelas infecções nosocomiais, também chamadas de infecções associadas aos cuidados de saúde (IACS), ou seja, infecções contraídas pelo paciente enquanto este recebia tratamento para outra condição (Tortora; Finke; Case, 2019). De acordo com o atual Programa Nacional de Prevenção e Controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (2021-2025), elaborado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), centenas de milhões de pacientes são afetados pelas IACS por ano no mundo, gerando, além de uma mortalidade significativa, perdas financeiras para os sistemas de saúde, uma vez que o custo diário do paciente com IACS é 55% superior ao de um paciente sem IACS (Anvisa, 2021).

Grandes avanços já foram obtidos para reduzir o índice de infecções nosocomiais nas últimas décadas, porém, elas ainda estão entre as complicações mais comuns que afetam pacientes hospitalizados (Hassan *et al.*, 2017; Koch *et al.*, 2015; Tortora; Finke; Case, 2019). Ainda, o crescente número de microrganismos resistentes a antibióticos é de preocupação constante. Segundo Balasubramaniam *et al.* (2021), são relatadas quase 700 mil mortes devido a infecções por bactérias resistentes a antimicrobianos por ano no mundo.

Sendo assim, uma vez que diferentes microrganismos e vírus sobrevivem por dias em superfícies e objetos inanimados, o estudo e o desenvolvimento de materiais e revestimentos com propriedades biocidas é uma necessidade permanente (Dev Kumar *et al.*, 2020; Hasan *et al.*, 2020; Kampf *et al.*, 2020). Uma abordagem que vem se destacando é a incorporação de metais com propriedades bactericidas e virucidas intrínsecas em diferentes superfícies para a obtenção de revestimentos antimicrobianos, um mercado que em 2021 foi estimado em US\$ 4,19 bilhões, com uma taxa de crescimento anual de 12,1%, considerando os cinco anos precedentes (Balasubramaniam *et al.*, 2021; Huang *et al.*, 2020; Prasher; Sharma, 2021).

Dentre os metais mais estudados, destaca-se o cobre. O cobre possui propriedades biocidas intrínsecas, e que podem ser amplificadas por radiação visível, uma vez que se trata de um material fotoativo. Assim, quando o cobre, e derivados como o óxido de cobre (I), são irradiados por luz visível, em sua superfície ocorre a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) que, junto às suas propriedades intrínsecas, promovem a destruição de microrganismos, viabilizando a obtenção de superfícies autolimpantes pelo processo fotocatalítico (Ghosh, 2018; Prasher; Sharma, 2021; Bagheri *et al.*, 2023). Tal característica possibilita sua aplicação em processos de desinfecção assistidos por energia solar ou por luz branca, por exemplo, sem qualquer aditivo, tornando essa uma linha de pesquisa de interesse mundial na contenção da propagação de diversos agentes patogênicos (McEvoy; Zhang, 2014; Rtimi; Kiwi, 2020; Soni *et al.*, 2022).

Assim, embora a aplicação do cobre na área de desinfecção seja bastante difundida na literatura, a interpretação da atividade biocida, na ausência ou na presença de luz, é pouco relatada e bastante discutível (Ghosh, 2018; Vincent *et al.*, 2018). Ademais, não há trabalhos nessa linha de pesquisa que tenham avaliado o efeito fotocatalítico do cobre puro frente a vírus, ou que compare a fotoatividade de micro e nanopartículas de cobre e seus derivados, pois desde o advento da nanotecnologia, as pesquisas têm se dedicado ao estudo das propriedades de materiais na nanoescala, acreditando serem a nova promessa, deixando as micropartículas em segundo plano.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as propriedades antimicrobianas de micro e nanopartículas de cobre metálico e de óxido de cobre (I), na ausência e na presença de luz, e desenvolver filmes compósitos incorporando as partículas em matriz polimérica e avaliar as propriedades bactericidas e virucidas dos mesmos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para o cumprimento do objetivo geral, foram traçados objetivos específicos. São eles:

- a) analisar as propriedades espectroscópicas (UV-Vis, DRX, FTIR, Raman, XPS), morfológicas e elementares (MEV, MEV-FEG, MET, EDS) e a liberação de íons (AAS) de micro e nanopartículas de cobre metálico e micropartículas de óxido de cobre (I);
- b) avaliar, pelo método de Concentração Bactericida Mínima, a influência da iluminação por luz branca na fotoatividade bactericida *in vitro* das partículas de cobre no combate à bactéria Gram-positiva *S. aureus* e à Gram-negativa *E. coli*;
- c) desenvolver filmes compósitos a partir da incorporação das partículas de cobre em matriz polimérica de álcool polivinílico (PVA) por *drop casting*;
- d) analisar as propriedades espectroscópicas (UV-Vis, DRX, FTIR), morfológicas, elementares e de superfície (MEV, EDS, GDOES, AFM), térmicas (TGA), de molhabilidade (ângulo de contato) e a liberação de íons (AAS) dos filmes compósitos obtidos;
- e) avaliar a influência da iluminação por luz branca na fotoatividade bactericida *in vitro* dos filmes compósitos no combate à bactéria Gram-positiva *S. aureus* e à Gram-negativa *E. coli*;
- f) avaliar a influência da iluminação por luz branca na fotoatividade virucida *in vitro* dos filmes compósitos no combate ao coronavírus murinho (MHV-3);
- g) avaliar a citotoxicidade dos filmes compósitos frente à linhagem celular de fibroblastos L929 pela atividade mitocondrial (MTT) e por microscopia (MEV-FEG).

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O presente trabalho surgiu em resposta aos desafios advindos da pandemia de 2019, que impactou o mundo em diversos setores. Nesse capítulo é apresentada uma contextualização desse tema conectando-o ao combate a microrganismos, os quais também representam uma ameaça constante à saúde pública. Tal revisão justifica o estudo de materiais bactericidas e virucidas, culminando na proposta de filmes e superfícies fotoativos com cobre, um metal com propriedades biocidas intrínsecas. A revisão é concluída com o emprego da fotocatalise na otimização das atividades bactericida e virucida de materiais e superfícies no combate à disseminação de patógenos.

#### 3.1 AGENTES INFECCIOSOS E SAÚDE PÚBLICA

Em 2003 ocorreu o primeiro surto de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS, do inglês *severe acute respiratory syndrome*). Este surto causado por um coronavírus, levando à denominação de SARS-CoV, teve início na China e se espalhou para 29 países causando a morte de quase 800 pessoas até ser contido em julho do mesmo ano. Sua taxa de letalidade foi de 9,6% no geral, mas superior a 50% entre pacientes acima de 65 anos (Abdelrahman; Li; Wang, 2020). Na época, a então Diretora Geral da Organização Mundial da Saúde (OMS), Dra. Gro Harlem Brundtland disse “[...] da próxima vez, podemos não ter tanta sorte.” A diretora alegou a importância do estudo desse vírus de modo a prevenir futuros surtos (WHO, 2003).

De fato, outro surto de coronavírus eclodiu no final de 2019 com o surgimento do novo coronavírus, o SARS-CoV-2. Em quatro anos, a doença provocada por esse vírus, denominada COVID-19, resultou em mais de 7 milhões de mortes, culminando na primeira pandemia do século XXI (WHO, 2024). Segundo Reina *et al.* (2020), estima-se que o impacto do SARS-CoV-2 tenha gerado uma queda de quase 3% no crescimento econômico mundial, o que representa trilhões de dólares e torna essa a maior crise desde a Segunda Guerra Mundial.

Ainda, com o decorrer do tempo, a partir de análises clínicas com pacientes recuperados, verificou-se que, além de causar uma variedade de patologias, desde infecções leves do trato respiratório até pneumonia e síndrome respiratória grave, a COVID-19 também acarreta em distúrbios neurológicos, como perda de olfato, de paladar e até de memória (Abdelrahman; Li; Wang, 2020; Hasan *et al.*, 2020; Patel *et al.*, 2020). Esse cenário impeliu o mundo a buscar soluções práticas e inovadoras para impedir a disseminação do vírus.

Paralelo a esse contexto, também permanecem crescentes pesquisas com foco no combate a microrganismos, os quais representam outra ameaça à saúde humana. A disseminação mundial de microrganismos resistentes a antibióticos, como a *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA, do inglês *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) são de preocupação constante. De acordo com Hassan *et al.* (2017), é previsto que até 2050 a resistência aos medicamentos antimicrobianos levará a uma perda de 10 milhões de vidas por ano. Desse modo, a pesquisa no ramo de materiais bactericidas também se faz uma necessidade permanente (Grass; Rensing; Solioz, 2011; Warnes; Keevil, 2013).

Ainda, um outro assunto relacionado e de significativas proporções diz respeito às infecções nosocomiais, também chamadas de infecções associadas aos cuidados de saúde (IACS). Essas, referem-se a infecções que não estavam presentes, nem em incubação, no momento da admissão do doente no hospital, ou seja, o paciente contraiu-a em uma unidade de saúde enquanto recebia tratamento para outras condições. Assim, além de representar um problema de saúde pública com elevada taxa de mortalidade, também gera significativas perdas financeiras para os sistemas de saúde, pois o custo diário de do paciente com IACS é 55% superior ao de um paciente sem IACS (Anvisa, 2021; Balasubramaniam *et al.*, 2021). Grass, Rensing e Solioz (2011) citam que, em 2006, os Estados Unidos tiveram uma despesa extra de 125 bilhões de dólares devido aos casos de IACS.

Segundo o artigo de Weiner-Lastinger *et al.* (2020), o qual apresenta um resumo dos dados reportados pela *National Healthcare Safety Network* (o maior sistema de vigilância de IACS nos EUA), quase 50% dos casos de IACS reportados correspondem a quatro patógenos principais (Tabela 1). A bactéria *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) é o patógeno predominante na maioria dos tipos de cirurgia, enquanto a *Escherichia coli* (*E. coli*) se destaca nas cirurgias abdominais mais especificamente, mas também engloba as de trato urinário e pneumonia.

Tabela 1 – Ordem de classificação dos quatro patógenos mais frequentes relatados pela *National Healthcare Safety Network* associados às IACS no período de 2015 a 2017

Patógeno	Número de casos	Equivalência
<i>Escherichia coli</i>	62.571	17,5%
<i>Staphylococcus aureus</i>	42.132	11,8%
<i>Klebsiella</i> ( <i>pneumoniae/oxytoca</i> )	31.530	8,8%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28.513	8,0%

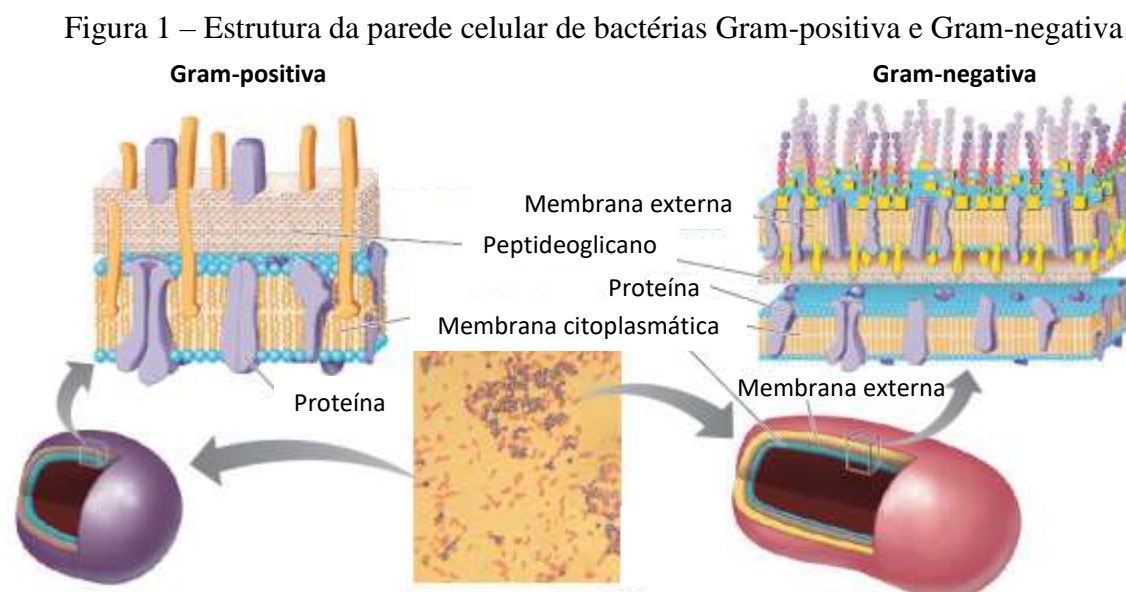
Fonte: adaptado de Weiner-Lastinger *et al.* (2020).



Nesse contexto, diante do objetivo do presente trabalho, é apresentado nos subtópicos seguintes um breve conceito sobre bactérias e vírus, agentes infecciosos em estudo, bem como uma exposição mais detalhada dos que foram estudados.

### 3.1.1 Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas: semelhanças e diferenças

As bactérias são seres vivos microscópicos constituídos por uma única célula cercada por uma parede e desprovida de núcleo (organismos procarióticos). O principal componente genético nessas células é o cromossomo, onde se encontra o DNA de fita dupla do organismo. Sua dimensão média é de 1 a 10  $\mu\text{m}$  (Madigan *et al.*, 2019). As paredes das células das bactérias contêm um polissacarídeo rígido denominado peptidoglicano, que confere força estrutural à célula. A composição da parede celular possibilita que diferentes bactérias sejam classificadas em Gram-positiva ou Gram-negativa (Figura 1) de acordo com o princípio da coloração Gram (Parra-Ortiz; Malmsten, 2022; Tortora; Finke; Case, 2019).



Fonte: traduzido de Madigan *et al.* (2018).

A parede celular de bactérias Gram-positivas é formada por várias camadas de peptidoglicano, enquanto a parede das Gram-negativas contém apenas uma fina camada de peptidoglicano. Todavia, estas últimas possuem uma membrana externa com lipopolissacarídeos (LPS), e por isso, são comumente relacionadas a uma maior resistência contra agentes externos (Tortora; Finke; Case, 2019; Tranquillo; Bollino, 2020).

### 3.1.1.1 Bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*

Estafilococos, do inglês *Staphylococcus*, são um gênero de bactérias Gram-positivas e um dos principais grupos bacterianos presentes na microbiota humana. Os estafilococos são cocos (do latim *coccus*) com um tamanho médio de 0,5 a 1,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Essas bactérias são resistentes à secagem, toleram altas concentrações de sal (até 10% m/v NaCl) e são facilmente dispersas em partículas de poeira e na água (Madigan *et al.*, 2019).

Conforme mencionado anteriormente, a *S. aureus* (Figura 2) é um dos patógenos mais importantes e difundidos quando o assunto é IACS, além de ser uma problemática na maternidade. Tal bactéria possui uma pigmentação amarelada e é comumente associada à pneumonia, osteomielite, meningite e artrite. Ainda, a *S. aureus* é mais frequentemente ligada a doenças humanas e algumas de suas cepas são resistentes a antibióticos, como a *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) (Madigan *et al.*, 2019; Tortora; Finke; Case, 2019).

Figura 2 – Micrografia eletrônica de varredura da *S. aureus* (a) e micrografia eletrônica de transmissão de uma célula dividida de *S. aureus* de 0,8  $\mu\text{m}$  de diâmetro evidenciando a parede celular Gram-positiva (b)



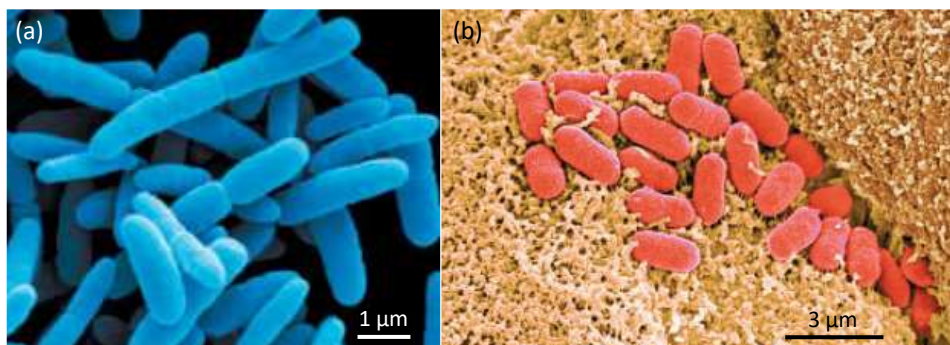
Fonte: adaptado de Madigan *et al.* (2018) e de Tortora, Finke e Case (2019).

### 3.1.1.2 Bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*

*Escherichia coli* (*E. coli*) são bacilos Gram-negativos e anaeróbios facultativos com tamanho médio de 2 x 0,5  $\mu\text{m}$  (Figura 3). É considerado um organismo modelo para biologia molecular diante de sua simples e rápida duplicação. A *E. coli* é um dos microrganismos mais prolíficos no trato intestinal humano. São normalmente inofensivas, porém, existem cepas patogênicas secretoras de toxinas que se adaptam à invasão de células epiteliais intestinais,

causando gastroenterite. Outros locais como o trato urinário, a corrente sanguínea e o sistema nervoso central, também podem ser afetados (Madigan *et al.*, 2019; Tortora; Finke; Case, 2019).

Figura 3 – Micrografias eletrônicas de varredura da *E. coli* (a) e de células *E. coli* aderidas no intestino grosso em simbiose mutualismo (b)

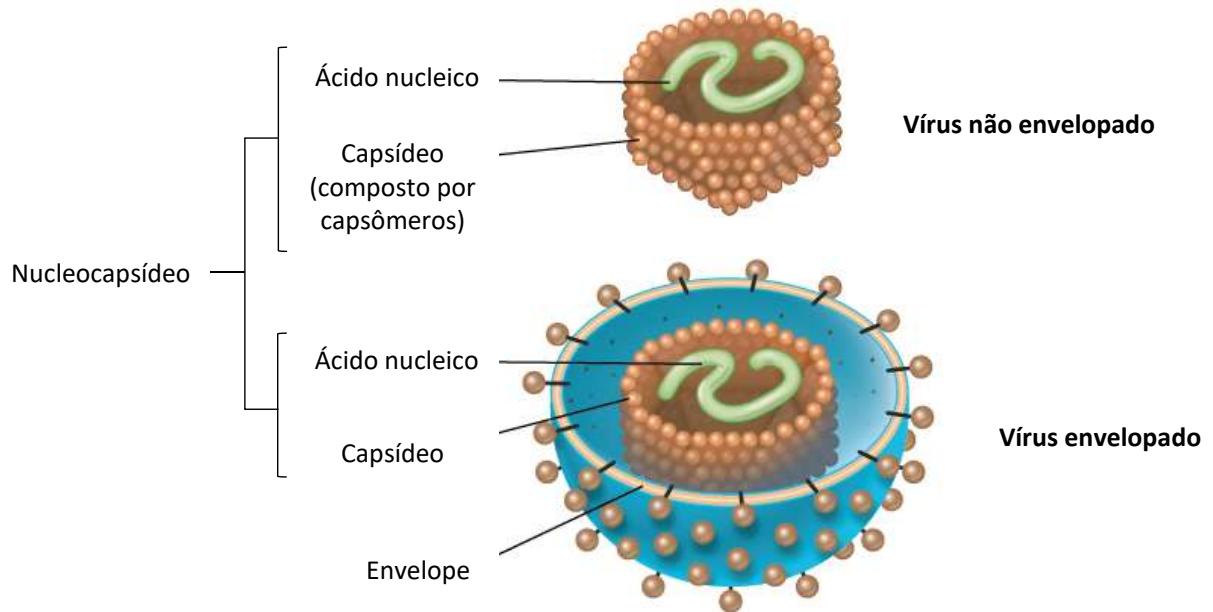


Fonte: adaptado de Tortora, Finke e Case (2019).

### 3.1.2 Vírus envelopados e não-envelopados: semelhanças e diferenças

Vírus, que significa "veneno" em latim, representa de forma simples, um ácido nucleico (DNA ou RNA, ou os dois, de fita simples ou dupla) cercado por proteína, ou seja, é um agente infeccioso protegido por uma cápsula proteica (o capsídeo) e por isso, não é classificado como um ser vivo, mas como uma partícula infecciosa (Flint *et al.*, 2015; Madigan *et al.*, 2019). O capsídeo, junto com o ácido nucleico que ele envolve, formam o nucleocapsídeo. Alguns vírus são formados apenas pelo nucleocapsídeo (não envelopados), enquanto outros possuem um envoltório ou envelope externo rico em lipídios, os chamados vírus envelopados (Figura 4) (Madigan *et al.*, 2019). Os vírus envelopados, como no caso dos coronavírus, são menos resistentes no ambiente, visto que podem ter sua membrana lipídica danificada e/ou destruída por detergentes e desinfetantes usuais de sanitização, além de serem sensíveis ao calor, a agentes oxidantes e à radiação UV. Os vírus não envelopados, como os adenovírus, apresentam maior resistência quando fora da célula hospedeira (Flint *et al.*, 2015; ICTV, 2022; Warnes; Keevil, 2013).

Figura 4 – Comparação de partículas virais não envelopadas e envelopadas



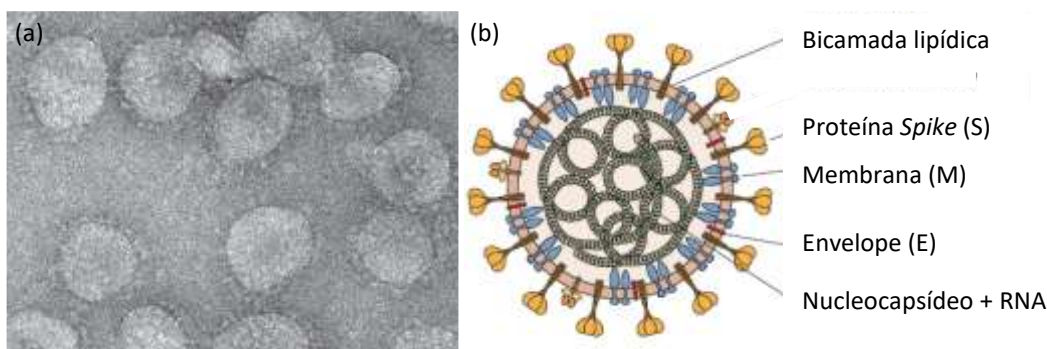
Fonte: traduzido de Madigan *et al.* (2018).

### 3.1.2.1 Coronavírus murino

Os coronavírus são vírus envelopados com dimensão esférica que varia entre 120 e 160 nm. O nome deriva do envelope que apresenta uma superfície com espículas (do inglês *spikes*) que proporcionam às partículas virais a aparência de uma coroa (do latim *corona*). Seu material genético consiste em RNA de fita simples (cadeia única de nucleotídeos) senso positivo, ou seja, a sequência de RNA do vírus é a mesma do RNA mensageiro (mRNA) que as células hospedeiras normalmente usam para produzir proteínas, viabilizando a síntese de proteínas virais logo após infecção (Lal, 2010; Madigan *et al.*, 2019).

O coronavírus murino (Figura 5), conhecido como vírus da hepatite murina (MHV, do inglês *murine hepatitis virus*), pertencente ao gênero *Betacoronavirus*, é composto por cepas que induzem doenças em vários órgãos de camundongos, causando além de hepatite, infecções graves que podem levar à paralisia. Por compartilhar o mesmo gênero do SARS-CoV-2, o coronavírus murino vem sendo utilizado como modelo para investigar a atividade virucida de diferentes tipos de materiais, uma vez que pode ser testado em laboratórios com nível de biossegurança 2 (Andrade *et al.*, 2021; Dev Kumar *et al.*, 2020; Kampf *et al.*, 2020).

Figura 5 – Microscopia eletrônica (a) e estrutura (b) do coronavírus murino



Fonte: adaptado de Flint *et al.* (2015).

Até o surgimento do primeiro coronavírus da síndrome respiratória aguda grave esses vírus eram conhecidos apenas por causarem resfriados comuns. Atualmente, as doenças mais conhecidas infringidas por essa família são a síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS, do inglês *Middle East respiratory syndrome*) causada pelo vírus MERS-CoV, e a própria COVID-19 (Abdelrahman; Li; Wang, 2020; Flint *et al.*, 2015; ICTV, 2022).

### 3.1.3 Medidas corretivas e de contenção mundiais no combate a bactérias e vírus

Para o controle de patógenos provenientes de microrganismos, majoritariamente das bactérias, os antibióticos vêm ao encontro nesse combate. Todavia, conforme apresentado anteriormente, trata-se de uma medida corretiva que necessita de constantes pesquisas e desenvolvimento de novas formulações devido ao surgimento de novas espécies, bem como do aumento da resistência das já existentes e conhecidas. Além disso, tal medida não é de disponibilidade fácil, rápida e acessível (Hajipour *et al.*, 2021; Vincent *et al.*, 2018).

Quanto aos vírus, no surto referente ao SARS-CoV-2, uma das medidas mundialmente empregada para mitigar a propagação do vírus foi a utilização de máscaras faciais. Tal medida foi mantida mesmo após o início da vacinação, uma vez que são necessários meses para a administração das doses necessárias para atingir a taxa de eficácia proposta (Hasan *et al.*, 2020; Huang *et al.*, 2020; Reina *et al.*, 2020).

Outras medidas de contenção do avanço da proliferação de bactérias ou da disseminação de vírus abrangem o campo do saneamento básico, a partir do uso de agentes químicos. Essas medidas objetivam majoritariamente a desinfecção de objetos e de superfícies inanimados.

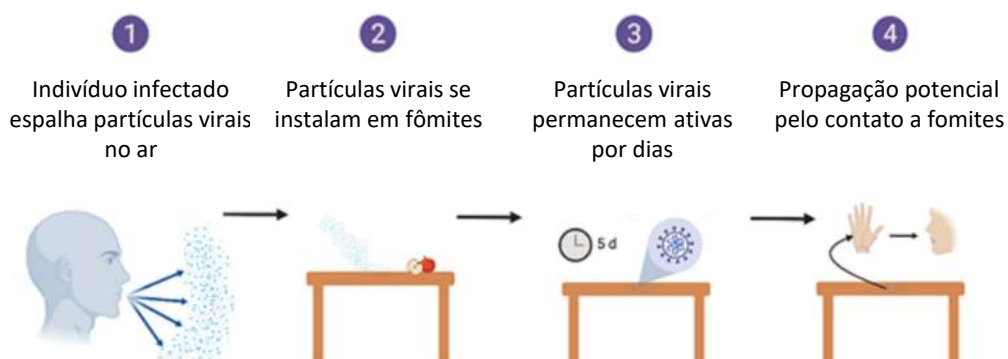
Ozônio e radiação ultravioleta são outros meios que também já provaram ação virucida, além de compostos naturais, como óleos essenciais e quitosana (Dev Kumar *et al.*, 2020; Kampf *et al.*, 2020; Loutfy *et al.*, 2020; Nadjib, 2020). Todavia, apesar das opções serem variadas, todos esses agentes citados não proporcionam uma descontaminação duradoura, pois um contato reincidente de uma carga bacteriana ou viral, desencadeia novamente na contaminação. Ademais, há uma problemática com alguns desses desinfetantes convencionais, como cloro e ozônio, os quais podem estar ligados à formação de subprodutos prejudiciais à saúde humana e ambiental (McEvoy; Zhang, 2014; Richardson, 2003).

Desse modo, diante diferentes estudos que mostraram que diversos vírus, incluindo o SARS-CoV-2, podem sobreviver por dias em superfícies e objetos inanimados, outros meios de contenção vêm sendo considerados. A pesquisa e o desenvolvimento de materiais e de superfícies ou revestimentos autolimpantes, com propriedades biocidas e virucidas intrínsecas, se tornou objeto de estudo em escala mundial (Kampf *et al.*, 2020; McEvoy; Zhang, 2014; Poggio *et al.*, 2020).

### 3.2 SUPERFÍCIES E FILMES COM ATIVIDADE BIOCIDA E VIRUCIDA

Em meados de 1970, segundo Otter, Yezli e French (2011), a transmissão de infecções associadas à saúde por contaminação de superfícies era desprezada, considerada insignificante. Atualmente, a função desempenhada por superfícies contaminadas por patógenos é bastante embasado e conhecido. Objetos e superfícies inanimadas, denominados fômites, desempenham um papel importante na disseminação de diferentes patógenos, visto que são capazes de reter e de transportar diferentes agentes infecciosos (Figura 6) (Dev Kumar *et al.*, 2020; Hasan *et al.*, 2020; Otter; Yezli; French, 2011).

Figura 6 – Representação da disseminação de vírus respiratórios associada a fômites



Fonte: traduzido de Dev Kumar *et al.* (2020).

Superfícies de toque comumente encontradas em hospitais, por exemplo, como maçanetas, grades da cama e botões de chamada também são superfícies altamente suscetíveis à contaminação. O aço inoxidável é o metal predominantemente usado em ambientes de saúde, devido à sua resistência à corrosão e à sua aparência que remete a ideia de limpeza. No entanto, tal material não possui qualquer atividade antimicrobiana inerente, logo, sua superfície é suscetível a recontaminações a todo momento. Itens de uso pessoal, como máscaras e luvas, são outra fonte de infecção quando descartados, pois são feitos de materiais que carecem de atividade biocida (Grass; Rensing; Solioz, 2011; Huang *et al.*, 2020). De acordo com Prasher e Sharma (2021), gotas e/ou aerossóis carregados com partículas virais evaporam mais rapidamente em superfícies porosas do que em impermeáveis, reduzindo o tempo de sobrevivência das partículas virais, pois muitos vírus necessitam de um ambiente úmido para permanecerem viáveis. Logo, superfícies como aço inoxidável, supostamente favorecem a sobrevivência de partículas virais.

Nesse contexto, estudos na área de materiais têm combinado vantagens de dois ou mais materiais de modo a integrar propriedades bactericidas e virucidas a fômites e superfícies, promovendo uma característica autolimpante, mercado com uma taxa de crescimento anual acima de 12% atualmente (Balasubramaniam *et al.*, 2021; Imani *et al.*, 2020; Spisak *et al.*, 2022). Uma proposta destaque é o emprego de metais, especialmente nanopartículas, em matrizes poliméricas. Hodek *et al.* (2016) já reportaram há quase 10 anos sobre o interesse crescente no uso de materiais híbridos orgânico-inorgânicos na medicina, para revestimentos de agulhas, articulações artificiais e implantes. A incorporação de partículas metálicas em polímeros, promove a obtenção de filmes com elasticidade e livres de rachaduras (Imani *et al.*, 2020; Prasher; Sharma, 2021; Tranquillo; Bollino, 2020).

### **3.2.1 Revestimentos com partículas metálicas**

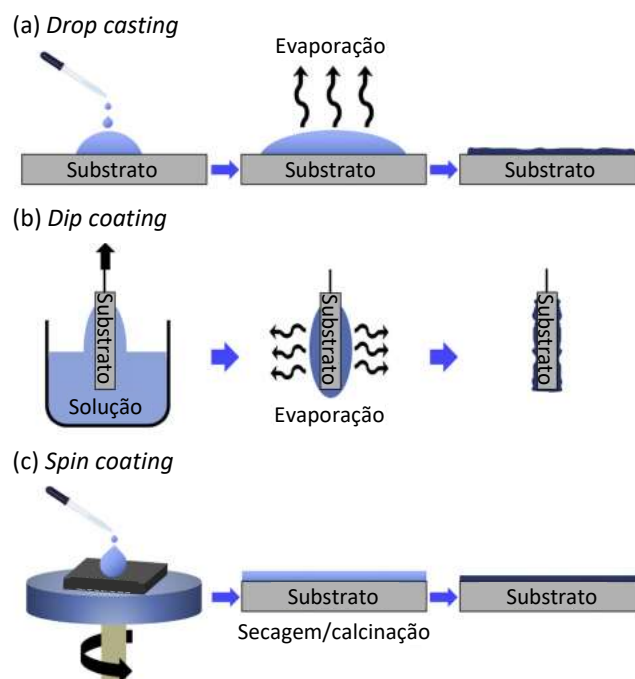
Dentre os métodos mais empregados para a obtenção de filmes ou revestimentos metálicos ou compósitos estão os métodos baseados em revestimento, tradução de *Coating-based methods*. As técnicas mais conhecidas são as de deposição por *drop casting*, por *dip coating* e por *spin coating* (Figura 7). Tais técnicas são empregadas com sucesso em diferentes áreas, como ótica, eletrônica, energia, meio ambiente, células solares, catalisadores e sensores, incluindo revestimentos de superfícies, vindo ao encontro do objetivo do presente trabalho (Ahmad *et al.*, 2018; Tranquillo; Bollino, 2020).

A técnica *drop casting* (Figura 7a) é amplamente usada para depositar nanomateriais em superfícies de eletrodo para a fabricação de biossensores, por exemplo. Nessa técnica, partículas ativas do material de interesse são suspensas em solventes adequados de modo a formar uma suspensão ou pasta por métodos baseados em sonicação. Com a solução homogênea, esta é vertida sobre a superfície a ser revestida, e em seguida, a amostra é encaminhada a uma etapa de secagem para evaporação do solvente. É uma técnica simples e com baixo desperdício de material, porém, sua aplicação é limitada para grandes áreas de cobertura e a espessura do revestimento é difícil de ser controlada (Ahmad *et al.*, 2018; Tranquillo; Bollino, 2020).

A técnica *dip coating* é baseada na imersão vertical do material a ser revestido em uma solução contendo as partículas ativas de interesse (Figura 7b). O movimento de remoção do substrato acarreta na drenagem da suspensão seguida da parcial deposição na superfície concomitantemente à evaporação do solvente (Ahmad *et al.*, 2018; Tranquillo; Bollino, 2020).

A técnica *spin coating* é a mais utilizada para revestimentos poliméricos. A técnica consiste em verter a solução de revestimento sobre o substrato de interesse e este é rotacionado, horizontalmente, em torno de seu eixo. Com a rotação, a solução é espalhada pela força centrífuga enquanto ocorre, paralelamente, a evaporação do solvente (Figura 7c) (Ahmad *et al.*, 2018; Tranquillo; Bollino, 2020).

Figura 7 – Representação esquemática das técnicas de deposição *drop casting* (a), *dip coating* (b) e *spin coating* (c)

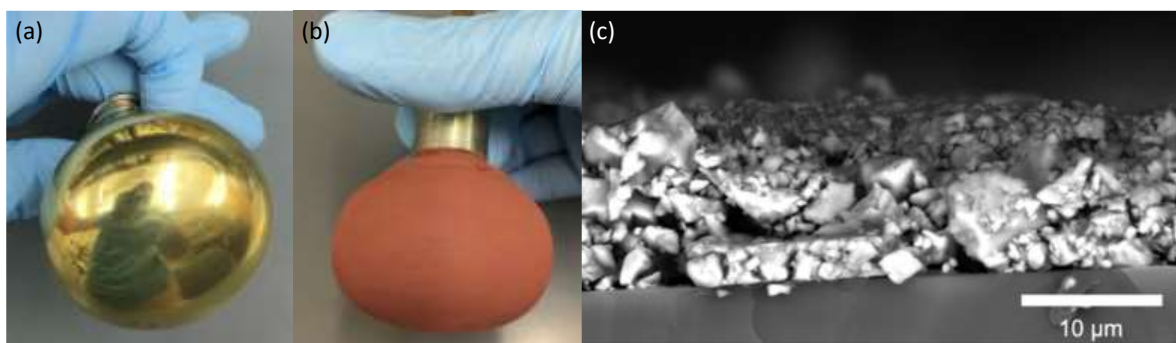


Fonte: adaptado de Ahmad (2018).



Behzadinasab *et al.* (2020) desenvolveram um revestimento constituído de micropartículas de  $\text{Cu}_2\text{O}$  com tamanho médio de  $5\ \mu\text{m}$  ligadas a poliuretano (PU). Os autores revestiram diferentes superfícies com uma fina camada de um verniz de PU comercial, transparente e acetinado, seguido da deposição de uma suspensão de  $\text{Cu}_2\text{O}$  10% (m/v em etanol) vertida sobre o substrato (princípio da técnica *drop casting*). Apesar da irregularidade observada por microscopia, o revestimento apresentou atividade virucida sobre o SARS-CoV-2 após 1 hora de contato (Figura 8).

Figura 8 – Fotos de uma maçaneta sem (a) e com o revestimento  $\text{Cu}_2\text{O}/\text{PU}$  (b), e da micrografia da seção transversal do revestimento (c)



Fonte: adaptado de Behzadinasab *et al.* (2020).

Jana *et al.* (2021) desenvolveram um revestimento com matriz polimérica de álcool polivinílico (PVA) incorporado com nanopartículas de cobre e de grafeno (Cu-Gr). Os filmes, contendo concentrações entre 1 e  $5\ \mu\text{M}$  de Cu-Gr e 10 mM de PVA, demonstraram atividade antiviral de até 70% contra o vírus Influenza A. Com base nesses resultados, os autores visaram a produção de um revestimento transparente com ação antiviral. Adaptando as técnicas *dip coating* e *drop casting*, eles mantiveram uma película de proteção de tela de celular imersa na suspensão Cu-Gr-PVA por 24 horas e depois deixaram-na secar naturalmente (Figura 9).

Figura 9 - Película de tela de celular transparente de PVA contendo cobre e grafeno



Fonte: adaptado de Jana *et al.* (2021).

Por *drop casting*, Pulit-Prociak *et al.* (2020) desenvolveram e compararam filmes de PVA incorporados com CuNPs, AgNPs e nanopartículas de óxido de zinco (ZnONPs), além de diversos agentes estabilizantes e aditivos como caseína, sacarose e quitosana. Os autores verificaram que os filmes compósitos com prata responderam melhor contra *E. coli*, enquanto os com cobre apresentaram melhor atividade bactericida frente à *S. aureus*, indicando a influência da estrutura celular bacteriana no mecanismo biocida.

Também fazendo uso da técnica *drop casting*, Hashem *et al.* (2023) desenvolveram filmes para embalagem de alimentos à base de PVA e ZnONPs. Os resultados referentes aos ensaios bactericidas revelaram atividades promissoras frente a bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e fungos multicelulares que causam contaminação no armazenamento de alimentos.

Outras técnicas de deposição também podem ser empregadas para a síntese de filmes poliméricos compósitos. Em uma proposta bastante aplicável, Lemraski *et al.* (2021) desenvolveram curativos antimicrobianos à base de PVA, quitosana e cobre pela técnica *electrospinning*. A atividade bactericida foi comprovada, além de, novamente, ser verificado que bactérias Gram-positivas são mais sensíveis ao cobre em comparação às Gram-negativas. Miranda *et al.* (2020) sintetizaram compósitos de poliuretano termoplástico (TPU) incorporados com partículas de cobre 1% m/v pelo método *melt blending*. Os tamanhos das partículas variaram da escala nanométrica (15-20 nm) até a micrométrica (10 µm). Verificou-se que, independentemente do tamanho das partículas incorporadas na matriz polimérica, houve uma atividade bactericida contra *S. aureus* e *E. coli*.

Diante desse breve estudo da arte, nota-se que o PVA é uma matriz polimérica que vem ganhando destaque. Isso se deve às suas propriedades denominadas *ecofriendly*, devido à sua biocompatibilidade e biodegradabilidade. Outra característica é a sua hidrofiliabilidade, própria dos grupos hidroxila na cadeia principal, tornando-o um candidato atraente para uso no presente trabalho, uma vez que também é mencionado como um material de fácil manipulação para a formação de filmes (Alsaad *et al.*, 2021; Balasubramaniam *et al.*, 2021; Lemraski *et al.*, 2021).

O PVA é um polímero sintético produzido pela polimerização do acetato de vinila. Suas outras propriedades incluem a resistência à tração, alongamento e flexibilidade. Tais características, porém, tornam-no passível de inchamento e de perda de desempenho. Desse modo, a adição de um material inorgânico à matriz polimérica apresenta mais um benefício, o de melhorar suas propriedades químicas, físicas e estruturais (Alsaad *et al.*, 2021; Sakarkar; Muthukumaran; Jegatheesan, 2020).

Tal revisão da literatura também apresenta o cobre como um dos materiais de destaque. Devido ao seu efeito bactericida e virucida intrínsecos, superfícies contendo cobre oferecem um efeito biocida contínuo, ou seja, uma característica autolimpante (Borkow; Gabbay, 2004; Hodek *et al.*, 2016). Assim, embora a prata prevalece como elemento mais utilizado para atividade antimicrobiana (Schio *et al.*, 2021), segundo Bondarenko *et al.* (2013), o efeito da prata em relação a bactérias é comumente superestimado, enquanto em relação a células humanas é subestimado. Em sua pesquisa, foi constatado que, dentre AgNPs, CuONPs e ZnONPs, o material mais tóxico para o meio ambiente são as AgNPs.

Minoshima *et al.* (2016) prepararam compostos de cobre (CuO e Cu<sub>2</sub>O em estado sólido, e CuCl<sub>2</sub> em meio aquoso) e de prata (Ag<sub>2</sub>S em estado sólido e Ag<sub>2</sub>O em meio aquoso). Os autores verificaram a superioridade virucida do Cu<sub>2</sub>O sobre todos os demais compostos. Para Mihut *et al.* (2019), entre revestimentos de cobre e de prata, os de cobre também apresentaram maior eficácia nos ensaios bactericidas.

### 3.3 O COBRE E SEUS DERIVADOS NO COMBATE A MICRORGANISMOS

Cobre e demais compostos à base de cobre são conhecidos como agentes de desinfecção desde a antiguidade. Tem-se como primeiro relato, o texto egípcio Papiro de Edwin Smith, que data de 1650 a. C., relatando o emprego de cobre para tratar desde feridas até água contaminada. O uso de cobre em formulações medicinais continuou ao longo da história e desde o século XIX passou a ser amplamente estudado e empregado no tratamento de doenças como tuberculose, lúpus, sífilis e anemia, até ser substituído por antibióticos no século XX (Grass; Rensing; Solioz, 2011; McEvoy; Zhang, 2014).

O cobre foi o primeiro material de superfície sólida a receber registro pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA, do inglês *Environmental Protection Agency*) devido seu caráter antimicrobiano. Sua aprovação em 2008 reconhece a capacidade do material e de seus derivados, em destruir microrganismos patogênicos. Em 2013, um estudo desenvolvido em hospitais dos EUA verificou uma redução superior a 50% na taxa de infecção bacteriana quando ligas de cobre substituíram superfícies de toque comum (Salgado *et al.*, 2013). Ademais, o cobre também tem sido relatado na literatura por possuir atividade virucida (Behzadinasab *et al.*, 2020; Borkow; Gabbay, 2009; Vincent *et al.*, 2018).

Atualmente, o interesse em materiais bactericidas e virucidas à base de cobre foi renovado e, em 2020, o cobre encontrava-se como o terceiro material mais estudado na área de pesquisa de materiais antivirais, perdendo apenas para a prata e o ouro (Schio *et al.*, 2021). Segundo Peng *et al.* (2017), a produção global anual especificamente de nanopartículas à base de cobre foi estimada em 570 toneladas em 2014 com previsão para 1600 toneladas em 2025, valor este que pode ser ainda maior devido à pandemia de 2019.

O cobre é considerado seguro para os organismos humanos, pois é um elemento essencial à saúde, uma vez que atua nos processos metabólicos. O corpo adulto contém entre 1,4 e 2,1 mg de cobre por kg de peso corporal, sendo recomendada a dose diária de 0,9 mg para adultos. Uma vez atendidas as necessidades nutricionais, o excesso de cobre é liberado na bile e excretado nas fezes (Anvisa, 2005; Borkow; Gabbay, 2005). Comparado com prata e ouro, o cobre é ambientalmente mais benigno, mais abundante e relativamente de baixo custo (Chalayon; Tangwongsan, 2021; Chen *et al.*, 2012; Mihut *et al.*, 2019). Portanto, é um candidato atraente para substituir esses metais nobres nas aplicações bactericidas e virucidas.

O óxido de cobre (I) ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ) e o óxido de cobre (II) ( $\text{CuO}$ ), são semicondutores tipo *p* com banda proibida direta entre 2,0-2,5 e 1,2-1,5 eV (*bulk*, a granel), respectivamente (Chatterjee; Saha; Pal, 2016; Rajendran *et al.*, 2020). Esses materiais também são estudados como bactericidas e virucidas, embora já esteja comprovada a superioridade do  $\text{Cu}_2\text{O}$ , uma vez que o  $\text{CuO}$ , devido à sua maior estabilidade eletrônica, não apresenta resultados expressivos (Imani *et al.*, 2020). Ademais, ambos os óxidos já são aplicados em diversas outras áreas, como em sensores, baterias de lítio e em tintas anti-incrustantes (Borkow; Gabbay, 2005; Zhang *et al.*, 2014). Na odontologia são uma proposta em revestimentos de implantes e de fios odontológicos, enquanto na medicina são estudados no combate a células cancerosas (Pandey *et al.*, 2019; Poggio *et al.*, 2020).

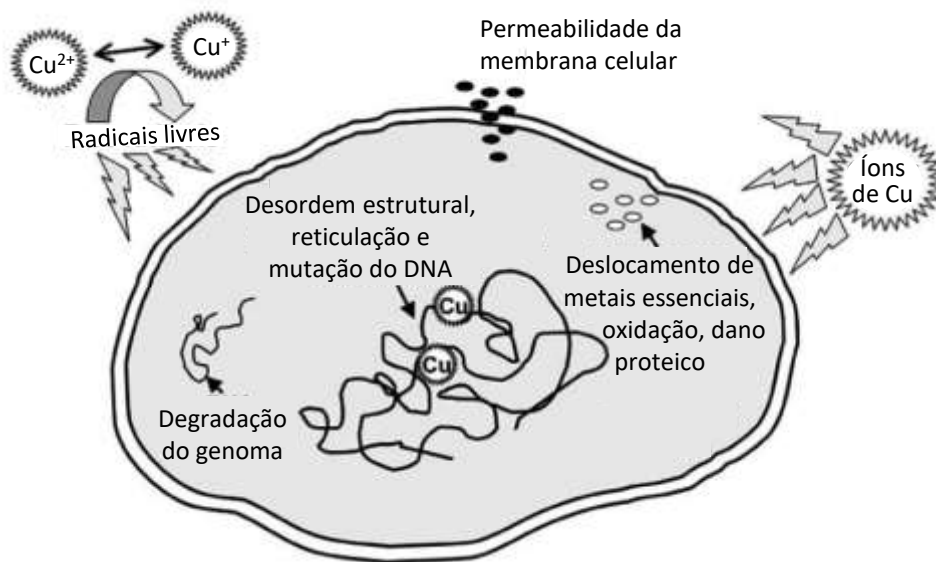
### **3.3.1 Mecanismos de ação bactericida e virucida do cobre e seus derivados**

Muitos autores ressaltam que ainda são poucos os estudos reportando específica e detalhadamente os mecanismos da atividade biocida do cobre e de seus derivados. Todavia, existem três hipóteses principais mais aceitas e relatadas na literatura e que podem ocorrer simultaneamente (Borkow; Gabbay, 2005; Chatterjee; Chakraborty; Basu, 2014; Palza; Quijada; Delgado, 2015; Imani *et al.*, 2020; Pulit-Prociak *et al.*, 2020). Tais mecanismos são:

- (i) dano à membrana celular: a exposição ao cobre acarreta um rápido declínio na integridade da membrana (perda da barreira de permeabilidade) por processos de acúmulo, difusão e dissolução. Tal mecanismo é evidenciado pela liberação de lipopolissacarídeos (LPS) e de proteínas, levando à morte celular;
- (ii) interação com os ácidos nucleicos: a ligação do cobre aos ácidos nucleicos acarreta reações redox cíclicas que geram espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais causam múltiplos danos ao material genético, promovendo assim, sua desnaturalização. Os íons do cobre ( $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ) também promovem subsequente dano oxidativo às estruturas celulares pela sua toxicidade inerente e também por catalisarem a produção de ROS;
- (iii) dano proteico: mecanismo baseado na inibição de proteínas que regulam o crescimento celular, interrompendo a replicação do DNA. Nesse caso, a eficiência do cobre é 200 vezes maior que do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

A Figura 10 apresenta um mecanismo da atividade bactericida do cobre (partícula, íons, e óxidos) proposto no trabalho de Borkow e Gabbay (2005). Observa-se neste modelo que os autores propõem a comunhão dos mecanismos previamente apresentados.

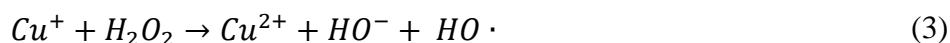
Figura 10 – Mecanismo da atividade bactericida do cobre



Fonte: adaptado de Borkow e Gabbay (2005).

Particularmente, quanto à geração de ROS pelo cobre, duas vias são possíveis. Uma via refere-se à geração de ROS pelo mecanismo fotocatalítico do material, um dos objetivos do presente trabalho, razão pela qual será abordado mais detalhadamente do subtópico seguinte. A

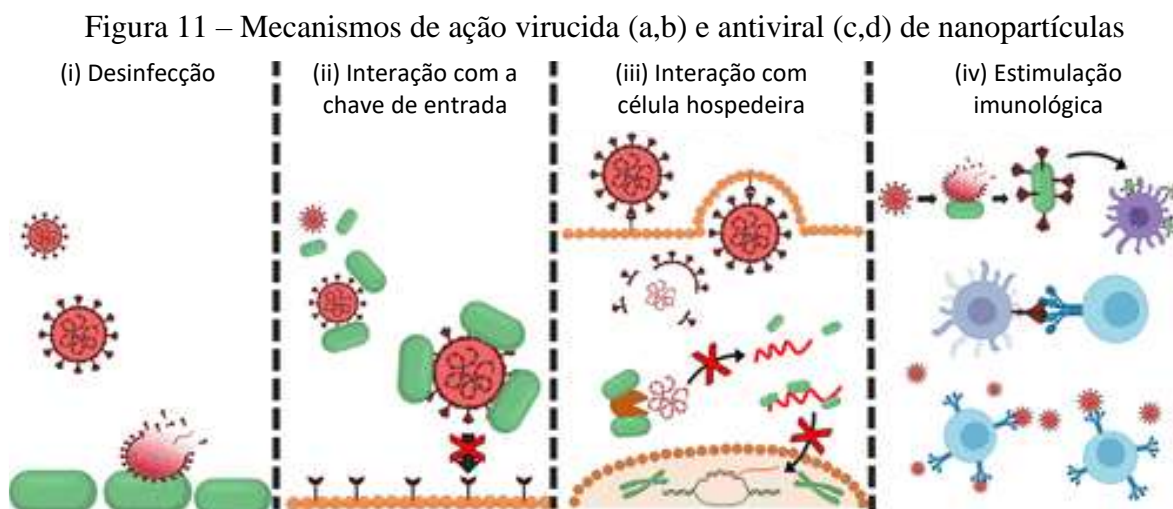
outra via refere-se ao mecanismo de Fenton, também chamado de reação de Fenton (equação 3), sucessora da reação de Haber-Weiss (equação 2) proveniente da reação do íon  $\text{Cu}^+$  com oxigênio (equação 1) que promove a geração do radical hidroxila ( $\text{HO}\cdot$ ). O radical hidroxila apresenta o segundo maior potencial redox conhecido (2,80 V), perdendo apenas para o flúor (3,05 V); logo, causa danos em bactérias e em vírus, devido ao seu elevado poder oxidante que danifica a parede celular dos microrganismos (Colmenares; Xu, 2016; Hasan *et al.*, 2020; Palza; Quijada; Delgado, 2015; Rtimi; Kiwi, 2020).



Quanto à atividade virucida do cobre, os mecanismos de ação podem ocorrer pré-infecção (atividade virucida) e pós-infecção (atividade antiviral, dentro da célula hospedeira). De acordo com os trabalhos de Imani *et al.* (2020), Jana *et al.* (2021), Maduray e Parboosing (2020), Reina *et al.* (2020) e Zhou *et al.* (2020) os principais mecanismos são:

- (i) desinfecção por contato: aderência das partículas de cobre na parede viral rompendo a proteção e desnaturalizando o genoma, semelhante ao primeiro mecanismo bactericida. Ademais, com a geração de ROS e/ou de íons  $\text{Cu}^+$  e  $\text{Cu}^{2+}$  há o dano oxidativo das proteínas do capsídeo (parede viral), destruindo a estrutura e a função das proteínas e dos ácidos nucleicos, impedindo assim, a infecção;
- (ii) interação com a chave de entrada: interação do cobre com a chave de entrada viral (proteína Spike dos envelopados) impedindo a infecção das células;
- (iii) interação com a célula hospedeira: interrupção do ciclo de replicação do material genético, inibindo o brotamento e a disseminação do vírus no hospedeiro;
- (iv) estímulo por mimetismo: quando um vírus começa a infectar as células humanas, o corpo desencadeia uma resposta imunológica de autodefesa que tem como objetivo retardar a replicação viral e “alertar” demais células do sistema imunológico que aumentam a produção de citocinas pró-inflamatórias;

A representação ilustrativa desses mecanismos é apresentada na Figura 11.



Fonte: adaptado de Reina *et al.* (2020).

Segundo os trabalhos de Pigeot-Rémy *et al.* (2011) e de Bogdan, Zarzyńska e Pławińska-czarnak (2015), as ROS têm a capacidade de inativar agentes infecciosos, cuja suscetibilidade pode ser organizada na seguinte ordem: vírus > bactérias Gram-negativas > bactérias Gram-positivas. Posteriormente, com o tempo, a matéria orgânica e as células microbianas ou virais mortas são oxidadas a  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ . Autores relatam que tais características se devem aos vírus não apresentarem tolerância ao cobre ou qualquer mecanismo de resistência como as bactérias (Borkow; Gabbay, 2005, 2009; Chalayon; Tangwongsan, 2021; Imani *et al.*, 2020).

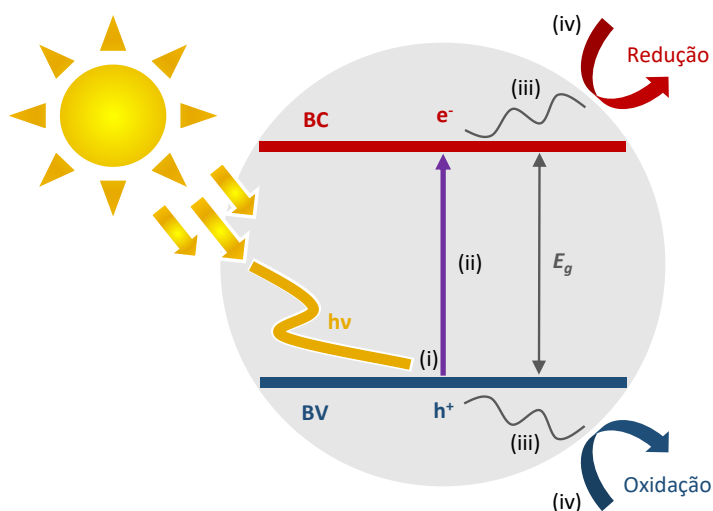
Nesse contexto, embora já existam propostas de mecanismos de destruição e/ou de inibição de vírus e de bactérias em superfícies de cobre, ainda existem áreas a serem exploradas, como por exemplo, a fotoatividade, ou seja, o estudo da influência da luz sobre a atividade bactericida e virucida do cobre e de seus derivados.

### 3.4 LUZ, COBRE E AÇÃO

A partir do objetivo de estudar a fotoatividade bactericida e virucida do cobre, o conceito de fotocatalise deve ser compreendido como um processo que combina a fotoquímica com a catalise heterogênea. Desse modo, faz-se necessária a presença de luz e de um fotocatalisador (comumente um semicondutor) para conduzir a reação química para a geração de ROS visando

a destruição de microrganismos. Existem quatro etapas principais no processo, (i) a absorção da irradiação de luz em comprimentos de onda adequado (com energia suficiente), (ii) a excitação dos elétrons da banda de valência (BV) para a banda de condução (BC) do semiconductor, (iii) o transporte dos pares de elétron-lacuna ( $e^-/h^+$ ) gerados para a superfície do semiconductor, e por fim (iv) as reações de redução e de oxidação que promovem a geração de ROS (Figura 12). Por sua vez, ROS oxidam lipídios, proteínas, lipopolissacarídeos e outros componentes essenciais do patógeno, resultando em um efeito biocida (Parra-Ortiz; Malmsten, 2022). Assim, a relevância da fotocatalise consiste no fato de que um fotocatalisador fornece tanto um ambiente oxidante, como redutivo, simultaneamente, diante da geração de pares  $e^-/h^+$  quando o material é ativado por radiação com energia maior ou igual à sua banda proibida ( $E_g$ , do inglês *energy gap*), ou seja, a diferença de energia entre BV e BC (Ameta *et al.*, 2018; Colmenares; Xu, 2016; Pigeot-Rémy *et al.*, 2011; Rtimi; Kiwi, 2020).

Figura 12 – Representação ilustrativa do mecanismo fotocatalítico por irradiação solar



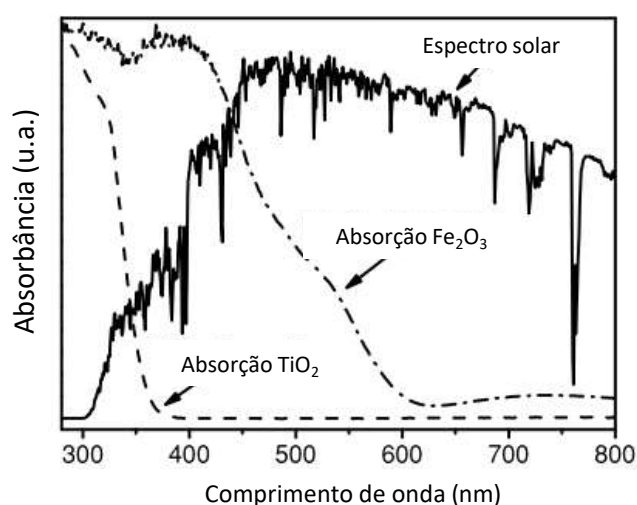
Fonte: adaptado de Colmenares e Xu (2016).

A investigação pioneira sobre o processo fotocatalítico heterogêneo foi em 1972, quando a dupla de pesquisadores japoneses Fujishima e Honda mostraram que um eletrodo de  $TiO_2$  irradiado por luz ultravioleta (UV) em uma célula fotoeletroquímica era capaz de decompor moléculas de água, gerando gás hidrogênio e gás oxigênio (Fujishima; Honda, 1972). Desde então, a fotocatalise vem sendo empregada no tratamento e purificação de água, na desinfecção do ar e enfim, na destruição de microrganismos (Bogdan; Zarzyńska; Pławińska-Czarnak, 2015; Hou; Cronin, 2012).



Desse modo, materiais à base de  $\text{TiO}_2$  tornaram-se dominantes na área da fotocatalise. Todavia, visto que a  $E_g$  do  $\text{TiO}_2$  puro é maior que 3,0 eV, ele só é capaz de absorver luz com comprimento de onda inferior a 400 nm (região UV) e tal porção de fótons corresponde a apenas 3% do espectro solar, limitando suas aplicações (Colmenares; Xu, 2016; Ghosh, 2018; Mathew *et al.*, 2018). A Figura 13 apresenta o espectro de absorção de  $\text{TiO}_2$  e de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  sobrepostos ao espectro solar. Particularmente ao  $\text{TiO}_2$ , apenas 4% dos fótons solares são capturados pelo fotocatalisador, enquanto a hematita ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), que possui uma banda proibida compreendida entre 2,0 e 2,3 eV, captura 10 vezes mais a luz incidente (Hou; Cronin, 2012).

Figura 13 – Comparação entre espectro solar e os espectros de absorção de  $\text{TiO}_2$  e  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ .

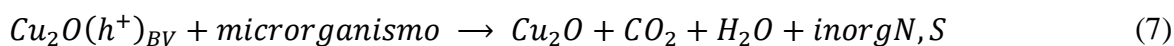
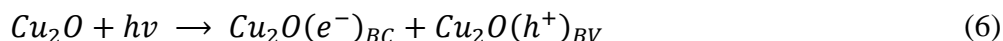
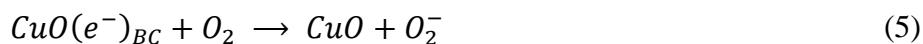
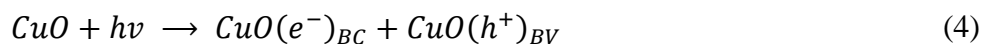


Fonte: adaptado de Hou e Cronin (2012).

Por conseguinte, a procura de sistemas catalíticos assistidos por energia solar e/ou luz visível tem sido alvo constante de pesquisas, objetivando não apenas a redução de custos, mas também a implementação de sistemas operando em grande escala. Os benefícios dessa aplicação incluem a capacidade de danificar microrganismos sem adição de oxidantes químico ou demais compostos e a possibilidade de usar uma fonte de energia renovável e econômica, a energia solar (Colmenares; Xu, 2016; Pigeot-Rémy *et al.*, 2011). Nesse contexto, tem-se mais uma justificativa quanto ao uso do cobre e seus derivados óxidos, visto que suas faixas de banda proibida são promissoras para aplicações visando o uso de luz visível.

Rtimi e Kiwi (2020) e Parra-Ortiz e Malmsten (2022) esclarecem a atividade fotocatalítica do  $\text{CuO}$  a partir da reação do elétron gerado na banda de condução com oxigênio (equação 4) formando a espécie reativa ânion superóxido (equação 5). Já para o  $\text{Cu}_2\text{O}$ , é a lacuna ( $\text{h}^+$ ) gerada na BV do material (equação 6) que interage com os microrganismos,

oxidando-os e formando moléculas de dióxido de carbono, de água e demais espécies inorgânicas contendo nitrogênio e enxofre (equação 7).



Quanto aos metais, incluindo o cobre, estes são definidos como materiais nos quais a faixa de energia superior (BC) é apenas parcialmente preenchida. A energia mais alta alcançada pelos elétrons na banda única resultante é chamada de energia ou nível de Fermi. Semelhante como para os semicondutores, acima da energia de Fermi quase todos os níveis estão vazios; logo, aceitam elétrons excitados de níveis de menor energia. Sendo assim, toda a radiação incidente pode ser absorvida, independentemente do seu comprimento de onda, promovendo também um ambiente redox que acarreta no efeito biocida (Tilley, 2010).

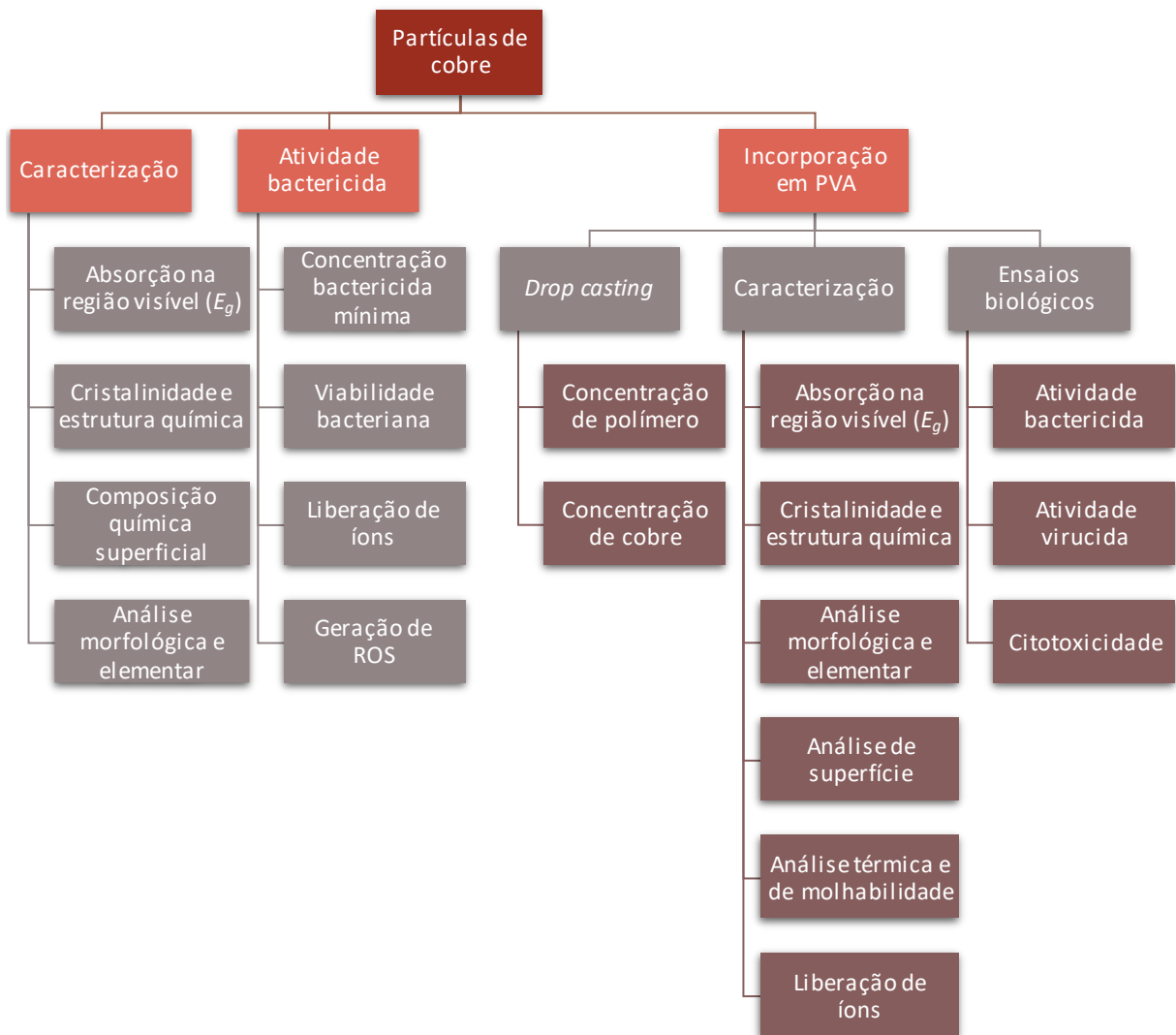
Nos trabalhos de Mathew *et al.* De 2018 e de Hajipour *et al.* de 2021, nanopartículas de TiO<sub>2</sub> foram dopadas com nanopartículas de cobre para avaliação da atividade bactericida fotocatalítica assistida por luz visível. O primeiro verificou que a incorporação de cobre (0,5 mol%) reduziu a banda proibida do compósito em até 0,37 eV, promovendo um efeito sinérgico que resultou em reduções da carga bacteriana de *S. aureus* e *E. coli* superiores a 5 log. No trabalho de Hajipour *et al.* de 2021, CuO nas concentrações de 0,5, 5, 7,5 e 10% foram incorporadas em TiO<sub>2</sub>, o que reduziu a banda proibida do compósito em até 0,59 eV. As amostras com menor concentração de cobre reduziram em 14% a viabilidade bacteriana de *S. aureus* no escuro, enquanto sob iluminação, a redução foi de 77%. Com o aumento da concentração de cobre, houve a inibição completa do crescimento bacteriano, tanto nos ensaios conduzidos no escuro como os submetidos à iluminação com luz visível.

Diante da revisão bibliográfica aqui apresentada, o presente trabalho busca analisar a influência da luz na atividade bactericida de partículas de cobre, e desenvolver filmes compósitos à base de PVA, incorporando essas partículas para nova avaliação da influência da luz na atividade bactericida e virucida.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são apresentadas as partículas de cobre em estudo, as técnicas de caracterização empregadas e os ensaios para avaliação da atividade bactericida das partículas, na ausência de luz e sob iluminação por luz branca. Em seguida, é descrita a metodologia empregada para a obtenção dos filmes compósitos com matriz polimérica para incorporação dessas partículas, e as técnicas de caracterização realizadas. Enfim, são apresentados os ensaios para a avaliação da fotoatividade dos filmes compósitos no combate a bactérias e vírus também sob duas condições de iluminação. A Figura 14 apresenta os principais ensaios.

Figura 14 – Fluxograma da metodologia da presente pesquisa



Fonte: a autora.

#### 4.1 PARTÍCULAS DE COBRE E DE ÓXIDO DE COBRE (I)

Com o objetivo de avaliar a fotoatividade do cobre frente diferentes agentes infecciosos sob duas condições de iluminação, foram adquiridas micro e nanopartículas de cobre metálico e micropartículas de óxido de cobre (I). A Tabela 2 apresenta uma descrição dessas partículas, com dados fornecidos pelo fabricante.

Tabela 2 – Descrição das partículas de cobre e de óxido de cobre (I) avaliadas no trabalho

Partícula	Tamanho médio*	Pureza*	Marca (Fornecedor)	Lote/Código
Cobre metálico, CuMPs	< 44 $\mu\text{m}$	99,5%	Metalpó	D2200065
Cobre metálico, CuNPs	25 nm	99,5%	Merck	774081
Óxido de cobre (I), Cu <sub>2</sub> OMPs	< 7 $\mu\text{m}$	97%	Merck	208825

\* Dados fornecidos pelo fabricante.

Fonte: a autora.

As partículas foram caracterizadas, sem nenhum tratamento prévio, por espectroscopia no ultravioleta visível (UV-Vis), difração de raios X (DRX), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia de Raman, espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS) e por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET).

##### 4.1.1 Determinação da energia da banda proibida das partículas de cobre

As análises de UV-Vis foram realizadas em um equipamento Shimadzu, modelo UV-2600i, localizado no Laboratório de Caracterização de Materiais II da Universidade de Caxias do Sul. Os espectros foram obtidos na faixa de comprimento de onda de 200 a 800 nm com resolução de 1 nm. As partículas foram compactadas no próprio porta amostra do equipamento sem qualquer purificação prévia. Uma amostra de sulfeto de bário (BaSO<sub>4</sub>) foi utilizada como referência padrão.

O valor da banda proibida foi obtido transformando a espectroscopia de reflectância difusa usando a função de Kubelka-Munk (equação 8), onde  $R$  é a razão entre a reflectância da amostra e do padrão, e  $K$  e  $S$  são os coeficientes adimensionais de absorção e de difusão, respectivamente. Com a curva  $(F(R)h\nu)^2$  em função da energia espectral ( $h\nu$ ), aplicou-se o método gráfico de Tauc e a intercepção da linha no eixo das abscissas indicou o valor da banda proibida (Myrick *et al.*, 2011; Rtimi; Kiwi, 2020).

$$F(R) = \frac{K}{S} = \frac{(1 - R)^2}{2R} \quad (8)$$

#### 4.1.2 Determinação da cristalinidade e da estrutura química das partículas de cobre por espectroscopias de DRX, FTIR e Raman

As análises de DRX foram realizadas em um equipamento Shimadzu, modelo LabX XRD-6000, localizado no Laboratório Central de Microscopia (LCMIC) da Universidade de Caxias do Sul. Para as análises das partículas foram empregadas uma radiação Cu  $K\alpha$ ,  $\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$  com passo angular de  $0,05^\circ$  e tempo de contagem de 4 segundos por passo. Os difratogramas foram coletados na faixa de  $20$  a  $80^\circ$  e a voltagem e a corrente do tubo foram ajustadas em  $40 \text{ kV}$  e  $30 \text{ mA}$ , respectivamente.

Ainda, a partir dos difratogramas calculou-se o tamanho de cristalito das partículas utilizando o método gráfico de Williamson-Hall (equação 9), onde  $\beta$  é a largura a meia altura em radianos,  $\theta$  é o ângulo de difração de raios X em radianos,  $K$  é a constante relacionada com a forma cristalina (0,9),  $\lambda$  é o comprimento de onda Cu $K\alpha$  ( $0,15406 \text{ nm}$ ),  $D$  é o tamanho do cristalino em nm,  $\varepsilon$  é a tensão da rede (Javadhesari *et al.*, 2019; Jimenez *et al.*, 2019).

$$\beta \cdot \cos\theta = \frac{K \cdot \lambda}{D} + 4\varepsilon \cdot \sin\theta \quad (9)$$

As análises de infravermelho foram realizadas em um espectrômetro de infravermelho Spectrum 400 da Perkin Elmer com um acessório de reflectância total atenuada (ATR-FTIR) empregando um cristal de diamante. Os espectros foram obtidos na faixa de  $400$  a  $4000 \text{ cm}^{-1}$ ,

com resolução de  $1\text{ cm}^{-1}$  e 32 varreduras para o branco (*background*, cristal limpo e vazio) e para a amostra. Este ensaio foi realizado no Laboratório de Caracterização de Materiais II da Universidade de Caxias do Sul.

As análises de Raman foram realizadas em um equipamento Horiba, modelo LabRAM HR Evolution, localizado no Laboratório de Caracterização de Materiais I da Universidade de Caxias do Sul. Os espectros foram obtidos na faixa de 100 a  $900\text{ cm}^{-1}$  com linha de laser em 633 nm com potência de 10%.

#### **4.1.3 Análise da composição química superficial das partículas de cobre por XPS**

As análises de espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS) foram realizadas na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), no Laboratório de Pesquisas Fotovoltaicas do Instituto de Física “Gleb Wataghin” (IFGW). Os ensaios foram conduzidos em um espectrômetro de fotoelétrons Thermo Alpha 110 Hemispherical Analyzer equipado com uma fonte de radiação Al  $K\alpha$  de 10 kV. Os espectros foram obtidos a partir de 40 varreduras com resolução de 0,05 eV. Os resultados foram avaliados usando o *software* CasaXPS (Fairley *et al.*, 2021). O ajuste da linha de base dos espectros foi realizado utilizando linha de fundo do tipo Shirley. As áreas integradas dos picos deconvoluídos foram usadas para determinar as concentrações relativas de espécies de cobre presentes na superfície das partículas considerando os fatores de sensibilidade de 0,25 para C 1s, 0,66 para O 1s e 6,3 para Cu 2p. Os desvios médios dos fatores de sensibilidade derivados são de aproximadamente 12% para as deconvoluções de 1s e 2p (Wagner *et al.*, 1981).

#### **4.1.4 Análise morfológica, tamanho de partícula e composição elementar das partículas de cobre por microscopia eletrônica**

As partículas de cobre e de óxido de cobre (I) com dimensões micrométricas foram avaliadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) em um microscópio da marca Shimadzu, modelo SSX-550 Superscan, localizado no Laboratório Central de Microscopia da Universidade de Caxias do Sul. Para esses ensaios, as amostras em pó foram fixadas sobre uma fita dupla face de carbono e cobertas com uma fina camada de ouro por um metalizador de

bancada Denton Vacuum, modelo Desk V. O tempo de deposição do ouro foi de 30 s. O *software* de processamento e análise de imagens ImageJ foi usado para a análise da distribuição do tamanho de partícula a partir das micrografias obtidas (Schneider; Rasband; Eliceiri, 2012).

As nanopartículas de cobre foram avaliadas por Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo (MEV-FEG) em um microscópio de alto desempenho da Marca Tescan, modelo MIRA3, localizado no Laboratório Central de Microscopia da Universidade de Caxias do Sul. Para esses ensaios, as nanopartículas foram fixadas sobre uma fita dupla face de carbono e cobertas com uma fina camada de ouro por um metalizador de bancada Denton Vacuum, modelo Desk V. O tempo de deposição do ouro foi de 30 s. O software de processamento e análise de imagens ImageJ foi usado para a análise da distribuição do tamanho de partícula a partir das micrografias obtidas (Schneider; Rasband; Eliceiri, 2012).

As nanopartículas de cobre ainda foram avaliadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) em um equipamento JEM-1200 EX II, localizado no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina. As nanopartículas foram dispersas em etanol 99,8% na concentração de  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , a qual foi sonicada por 15 minutos em banho ultrassônico. Em seguida,  $10 \mu\text{L}$  da suspensão foram adicionados sobre um grid de cobre com filme de Formvar de 200 Mesh. Após a remoção de excesso do meio líquido com papel filtro, o grid foi mantido por 24 horas em um dessecador a vácuo até a realização da análise (Schneider; Rasband; Eliceiri, 2012).

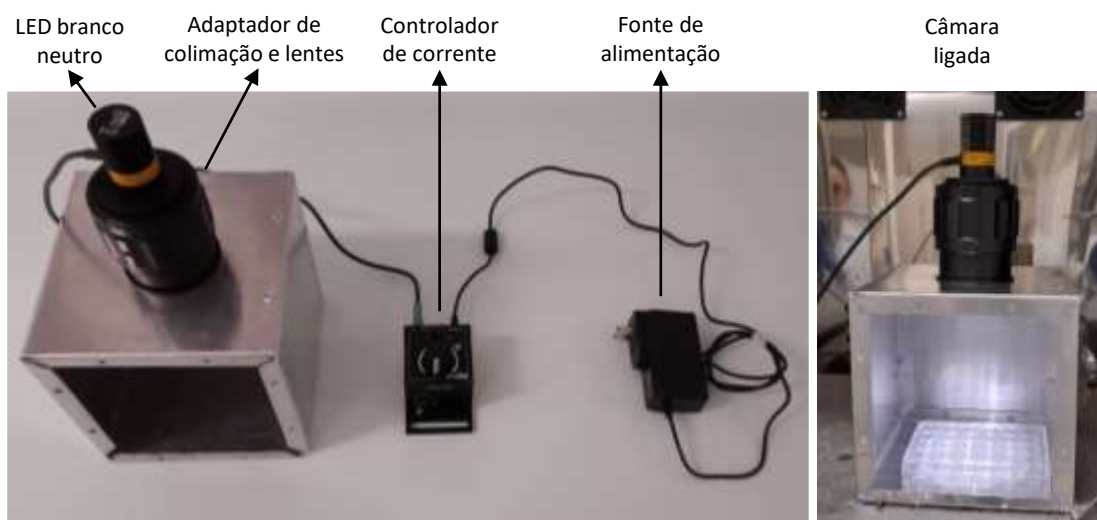
#### 4.2 CONDIÇÃO DE ILUMINAÇÃO PARA OS ENSAIOS BACTERICIDAS E VIRUCIDAS

A fonte de luz utilizada nos ensaios para estudo da fotoatividade das partículas e dos filmes compósitos nesta pesquisa foi um LED branco neutro da ThorLabs Vendas de Fotônicos Ltda (modelo MNWHL4). Desse modo, cada material, partícula e filme, foi avaliado em duas condições, na ausência de luz (escuro) e sob iluminação do LED com comprimento de onda correspondente à faixa visível e intensidade de  $7,7 \mu\text{W mm}^{-2}$  quando a 20 cm de distância, de acordo com o fornecedor, com corrente ajustada em 0,7 A. Tal configuração garante uma iluminação entre 550 e 650 lux (unidade derivada do Sistema Internacional de Unidades que representa o fluxo luminoso por unidade de área, também conhecida como iluminância) correspondendo a valores aproximados dos oferecidos por lâmpadas convencionais de

iluminação interna. Essas medições comparativas foram realizadas com um luxímetro, modelo Extech LT-45.

Para a condução desses ensaios foi desenvolvida uma câmara em alumínio. Acoplou-se à câmara um adaptador óptico de colimação junto a uma lente esférica condensadora. Com o encaixe do LED, este é acionado por uma fonte de alimentação conectada a um controlador de corrente para LED, fornecendo uma iluminação com luz branca. Uma foto do equipamento e uma ilustração da iluminação no interior da câmara adaptada são apresentados na Figura 15. Para os ensaios, a câmara foi fechada com uma tampa, também de alumínio.

Figura 15 – Fotos do sistema de iluminação adaptado para análise da atividade fotocatalítica bactericidas e virucidas das amostras



Fonte: a autora.

#### 4.3 CARACTERIZAÇÃO DA FOTOATIVIDADE BACTERICIDA DAS PARTÍCULAS DE COBRE

Os ensaios conduzidos para caracterização e estudo da fotoatividade bactericida das partículas de cobre foram concentração bactericida mínima (MBC), seguida de plaqueamento e de viabilidade celular a partir da densidade celular observada por microscopia de fluorescência. Para ambos os ensaios, os microrganismos indicadores foram a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (*S. aureus*, bactéria Gram-positiva) e a *Escherichia coli* ATCC 25922 (*E. coli*, bactéria Gram-negativa). Cada ensaio foi realizado em triplicata. Esses



ensaios foram conduzidos no Laboratório de Toxicologia Aplicada e Bioprodutos (LTAB) no Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul.

#### **4.3.1 Testes de suscetibilidade bacteriana por Concentração Bactericida Mínima**

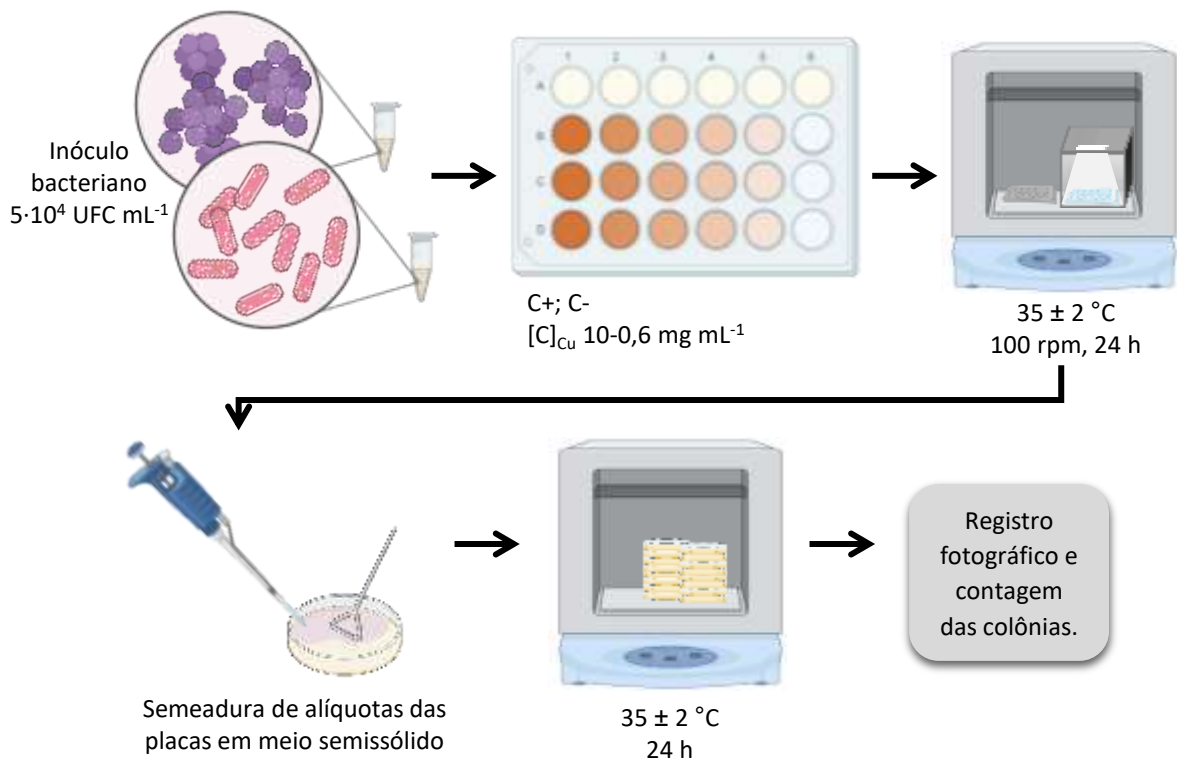
Para o ensaio de concentração bactericida mínima (CBM) utilizou-se o método de diluição em caldo, conforme protocolo M7-A6 do Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI), com modificações (CLSI, 2015). O teste foi conduzido com o objetivo de determinar a concentração mínima de agente necessária para inibir e/ou causar a morte dos microrganismos (Sjollema *et al.*, 2018).

Diferentemente do ensaio de concentração inibitória mínima (CIM), o qual é definido como a menor concentração do agente antimicrobiano capaz de inibir 100% o crescimento microbiano comparando a absorbância dos meios em relação aos controles negativos, no CBM, alíquotas são removidas dos poços e semeadas em placas de Petri contendo ágar para determinar a menor concentração de material capaz de impedir o crescimento bacteriano visível. Na maioria dos casos o CBM é maior que o CIM, porém também pode ser igual ao CIM (Azam *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2012; Pulit-Prociak *et al.*, 2020). Ressalva-se que, sempre que a contagens das colônias mostrava-se inviável, realizavam-se diluições seriadas das suspensões bacterianas tratadas para garantir uma contagem precisa de UFC (Madigan *et al.*, 2019).

Inicialmente preparou-se o inóculo bacteriano, ajustado à turbidez de 0,5 McFarland ( $1\cdot 2\cdot 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>, sendo UFC a sigla para Unidades Formadoras de Colônias), em caldo Mueller Hinton (MH). A partir dessa solução, preparou-se uma solução diluída na concentração de  $5\cdot 10^4$  UFC mL<sup>-1</sup> para o ensaio. Em paralelo, preparou-se uma suspensão das partículas de cobre na concentração 10 mg mL<sup>-1</sup> em caldo MH. A partir dessa suspensão, realizaram-se diluições seriadas para obtenção das concentrações de 5, 2,5, 1,25 e 0,625 mg mL<sup>-1</sup>. O ensaio foi conduzido em microplacas estéreis de 24 cavidades. Nos controles positivo e negativo foram adicionados 400 µL do caldo MH, enquanto nas demais cavidades foram adicionados 400 µL das suspensões com partículas em ordem decrescente de concentração. Ressalta-se que, para cada pipetagem das suspensões com partículas, estas eram previamente homogêneas em um agitador tipo vórtex de bancada para prevenir a precipitação das partículas. Em seguida, em cada cavidade, exceto nas de controle negativo, foram adicionados 20 µL da suspensão bacteriana previamente preparada na concentração de  $5\cdot 10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>.

Após o preparo das placas, estas foram incubadas com agitação de 130 rpm a  $35 \pm 2$  °C. Considerando que os ensaios na ausência de luz e sob iluminação foram, necessariamente, sempre conduzidos simultaneamente, uma placa sempre foi revestida com papel alumínio para evitar qualquer iluminação, enquanto outra foi submetida à câmara de iluminação, também alocada no interior da incubadora. Após 24 horas de incubação, duas alíquotas de 10  $\mu$ L de cada cavidade das placas foram semeadas em placas de Petri de 90 mm contendo meio de crescimento sólido, seguindo uma metodologia já difundida na literatura. Decorrido o período de 24 horas de incubação a  $35 \pm 2$  °C, as placas foram analisadas com registro fotográfico e realizou-se a contagem de UFC a partir das fotografias das placas, com o auxílio do *software* ImageJ (Figura 16) (Hajipour *et al.*, 2021; Mathew *et al.*, 2018; Sharifahmadian *et al.*, 2013).

Figura 16 – Representação esquemática dos ensaios para avaliação da fotoatividade bactericida das partículas de cobre



Fonte: a autora.

Para reportar as alterações observadas após a incubação, a atividade bactericida do material em estudo foi expressa fazendo uso da escala de redução logarítmica (equação 10), onde *A* e *B* são o número de UFC contadas das amostras sem tratamento (controle positivo) e com tratamento, respectivamente. A Redução logarítmica (do inglês *Log reduction*) é um termo

matemático usado para expressar o número relativo de microrganismos que são eliminados após exposição ao tratamento. Espera-se de um produto eficaz uma redução mínima de 3 log para o período de incubação de 24 horas (EPA, 2012; Weber; Rutala, 2012).

$$\text{Redução logarítmica} = \log_{10} \left( \frac{A}{B} \right) \quad (10)$$

Assim, a partir do valor da Redução logarítmica (RL), obtém-se o valor da redução percentual de UFC, conforme apresentado pela Tabela 3.

Tabela 3 – Redução logarítmica em termos de redução percentual da carga bacteriana

Redução logarítmica	Redução percentual
1	90%
2	99%
3	99,9%
4	99,99%
5	99,999%
6	99,9999%

Fonte: a autora.

Os valores de redução de log foram representados como média  $\pm$  desvio padrão (DP) e todas as análises estatísticas por análise de variância unidirecional (ANOVA) com testes de Tukey post-hoc foram realizadas usando o *software* Jamovi versão 2.3 (Jamovi, 2022). A diferença entre a condição de iluminação foi considerada significativa quando o valor de probabilidade foi menor que 5% ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3.2 Viabilidade por contagem de células bacterianas utilizando kit LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability

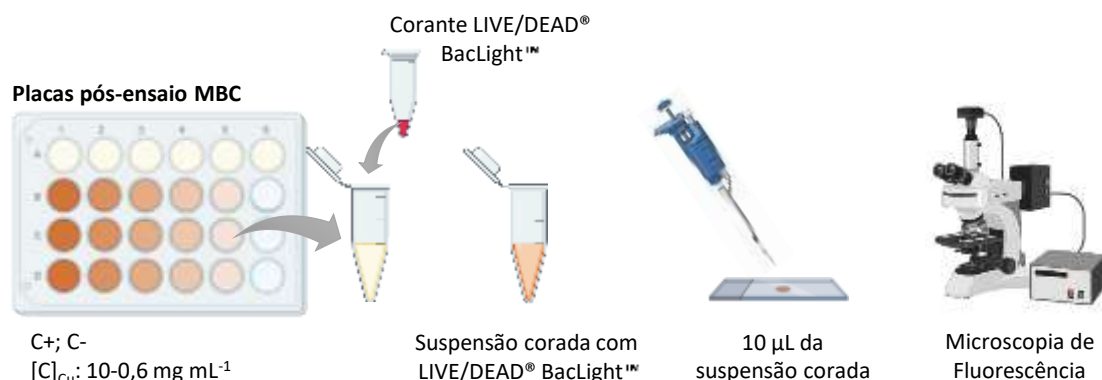
O ensaio para estudo da viabilidade bacteriana foi realizado utilizando o kit LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability, da Invitrogen. O kit é composto por dois corantes de ácido nucleico: SYTO® 9 (fluorescente verde) e iodeto de propídio (fluorescente vermelho). Este kit é usado para avaliar a viabilidade de população bacteriana em função da integridade da membrana celular, uma vez que o SYTO® 9 é capaz de entrar nas células viáveis

e corar o DNA, viabilizando a contagem de células vivas, enquanto o iodeto de propídio entra apenas nas células com a membrana citoplasmática danificada, pois é incapaz de permear a membrana (Rtimi; Kiwi, 2020; Sjollem *et al.*, 2018). Essa análise foi realizada nos casos em que foi possível observar diferença entre os resultados dos ensaios de MBC conduzidos na ausência e presença de luz.

A fluorescência das amostras foi monitorada em um microscópio de fluorescência Olympus e as imagens foram processadas usando o *software* cellSens utilizando comprimentos de onda de excitação/emissão de 485/498 nm e 535/617 nm para fluorescência verde e vermelha, respectivamente. As imagens de fluorescência verde e vermelha foram obtidas individualmente e sobrepostas com o auxílio do *software* ImageJ. Para todas as amostras foram registrados três campos microscópicos diferentes e em dois aumentos, resultando na avaliação de 400 a 1000 células por micrografia. O resultado observado pela microscopia de fluorescência é a visualização de células com a membrana comprometida, consideradas mortas, as quais apresentam fluorescência vermelha, enquanto as células com uma membrana intacta, células vivas viáveis, apresentam fluorescência verde. A contagem de células foi realizada utilizando o *software* ImageJ.

O protocolo para a coloração foi conduzido de acordo com o fornecido pelo fabricante. A partir das placas dos ensaios de CBM das partículas, 200  $\mu\text{L}$  da solução de cada cavidade (decorridas as 24 horas de incubação) foram corados com 0,2  $\mu\text{L}$  da solução corante. Essa solução foi previamente preparada, a partir da mistura de volumes iguais de SYTO<sup>®</sup> 9 e iodeto de propídio. Por fim, pipetou-se 10  $\mu\text{L}$  da suspensão corada sobre lâminas de microscopia e esta foi coberta com uma lamínula para avaliação no microscópio de fluorescência (Figura 17).

Figura 17 – Representação do ensaio de viabilidade por contagem de células bacterianas utilizando kit LIVE/DEAD BacLight



Fonte: a autora.

### 4.3.3 Quantificação da liberação de íons de cobre e da geração de ROS das partículas de cobre

As amostras de ensaios MBC que apresentaram atividade bactericida diferente entre os ensaios realizados no escuro e sob iluminação foram avaliadas por espectrômetro de absorção atômica (AAS) para estimar a concentração de íons de cobre liberados ao meio. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Análises e Pesquisas Ambientais (LAPAM) da Universidade de Caxias do Sul em um espectrofotômetro Perkin Elmer, modelo AAnalyst 200. As amostras foram digeridas e analisadas de acordo com os Métodos padrão para o exame de água e esgoto (SMWW, do inglês *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*) 3030-E e 3111-B, respectivamente.

Por fim, a concentração intracelular de ROS foi avaliada em um citômetro de fluxo (FACSCalibur, Becton-Dickinson) utilizando o canal FL1 (488/670). As amostras foram tratadas com  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  de 2'-7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH, Sigma Aldrich) e incubadas no escuro por 30 minutos em temperatura ambiente. Os ensaios foram desenvolvidos no Laboratório de Enologia e Microbiologia Aplicada (LEMA), do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul.

## 4.4 SÍNTESE DOS FILMES COMPÓSITOS

A síntese dos filmes foi baseada na incorporação das partículas de cobre em uma matriz polimérica de PVA ( $85.000-124.000 \text{ g mol}^{-1}$ , +99% hidrolisado, Sigma Aldrich) com base nos trabalhos precitados na revisão. A obtenção dos filmes foi avaliada explorando a técnica de deposição *drop casting*. Em paralelo, a concentração do polímero (2, 5 e 10 % m/v) e das partículas incorporadas (2, 4 e 6% m/v) também foram avaliadas com base nos mesmos trabalhos.

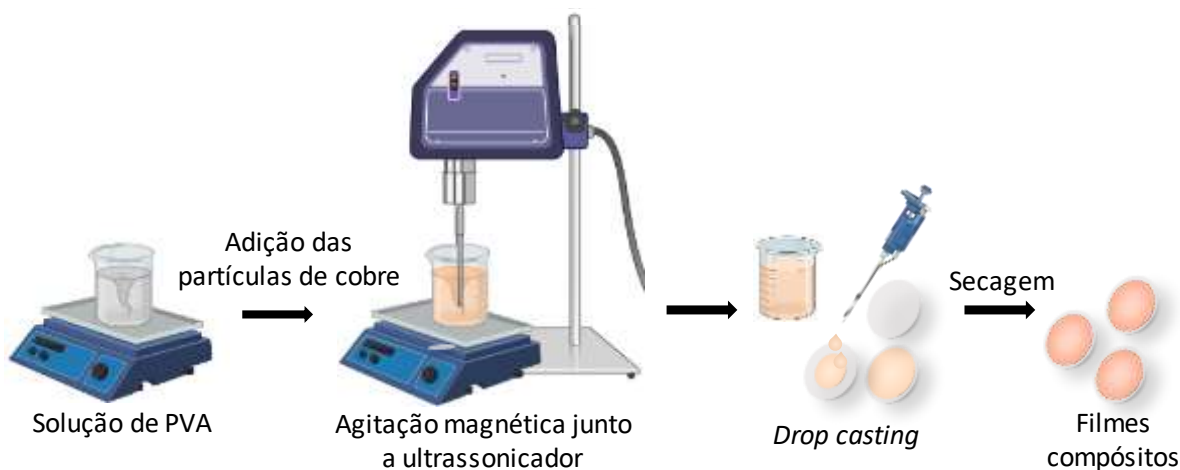
Com o objetivo principal de avaliar a influência da iluminação na atividade bactericida e virucida das partículas de cobre, foram utilizadas lâminas e lamínulas de vidro como substrato devido a suas propriedades translúcida e transparente. As lâminas possuem dimensão retangular de 75 x 25 mm com 1 mm de espessura, enquanto as lamínulas são circulares com 13 mm de diâmetro e 0,1 mm de espessura. Essas duas dimensões de amostras foram utilizadas para comportar os diferentes ensaios de caracterização realizados. Especificamente para a análise de

Microscopia Eletrônica de Varredura utilizou-se *wafer* de silício 10 x 10 mm como substrato, e para Espectroscopia de Emissão Óptica por Descarga Luminescente (GDOES), utilizou-se chapas de aço inoxidável 40 x 40 mm.

Os substratos foram sempre lavados em banho de ultrassom. O primeiro agente utilizado no banho foi uma solução de Extran 10% v/v (Extran<sup>®</sup> MA 02, Merck) por 5 minutos. Em seguida, a lavagem foi intercalada com enxágue abundante de água destilada e deionizada para realização de um banho de 10 minutos em álcool isopropílico. Por fim, os substratos foram secos a 100 °C por 1 hora.

Para a síntese dos filmes compósitos, inicialmente preparou-se a solução de PVA em diferentes concentrações. A solução foi mantida em aquecimento a 80 °C sob agitação constante por 4 horas. Após esse tempo, a solução foi mantida em repouso até atingir a temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se as partículas metálicas em diferentes concentrações. Para promover maior dispersão, a solução foi mantida sob agitação magnética leve (minimizando a geração de bolhas) concomitantemente a ultrassonicador (Hielscher, UP400St, sonotrodo S24d3) com amplitude de 80% por 10 minutos. Por fim, 150 µL da solução foram pipetados sobre os substratos, os quais foram posteriormente submetidos à secagem em estufa a 70 °C por 1 hora (Figura 18). Esse procedimento foi baseado nos trabalhos de Jana *et al.* (2021) e de Sakarkar, Muthukumaran e Jegatheesan (2020).

Figura 18 – Esquema representativo da síntese dos filmes compósitos por *drop casting*



Fonte: a autora.

Antes da caracterização dos filmes compósitos, filmes com micropartículas de cobre metálico nas concentrações de 2, 4 e 6% (m/v), foram avaliados quanto a suas propriedades

bactericidas partindo da metodologia apresentada no tópico 4.3.1. Definida a concentração ótima de partículas a ser incorporada na matriz poliméricas, filmes com CuNPs e Cu<sub>2</sub>OMPs também foram sintetizados e caracterizados.

#### 4.5 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES COMPÓSITOS

Assim como para as partículas, os filmes compósitos foram caracterizados por espectroscopia no UV-visível (utilizando um suporte para filmes próprio do equipamento e o filme de PVA puro como branco), DRX, FTIR, além da caracterização morfológica e estrutural por MEV e MEV-FEG seguida de EDS. Em todos os ensaios foram empregados os mesmos parâmetros de análise utilizados para a caracterização das partículas de cobre.

Complementando a caracterização dos filmes, realizou-se a análise de composição química elementar por Espectroscopia de emissão óptica por descarga luminescente (GDOES), a análise da rugosidade por Microscopia de força atômica (AFM), e as análises termogravimétrica (TGA) e de molhabilidade via medição do ângulo de contato. Ainda, a liberação de íons de cobre dos filmes foi avaliada por Espectrometria de absorção atômica (AAS) sob os mesmos parâmetros conduzidos para a análise da liberação de íons das partículas.

##### 4.5.1 Composição elementar dos filmes compósitos por GDOES

A composição química elementar dos filmes compósitos e do filme de PVA puro foi determinada pelo equipamento GD-Profilier 2, da Horiba Scientific, localizado no Laboratório de Caracterização de Superfícies em Nanoescala da Universidade de Caxias do Sul. Conhecida a espessura dos filmes pela microscopia avaliada por MEV da cratera promovida pela técnica, os gráficos foram gerados relacionando a composição elementar em função da profundidade.

##### 4.5.2 Rugosidade dos filmes compósitos por AFM

A análise da rugosidade dos filmes compósitos e do filme de PVA puro por microscopia de forma atômica (AFM) foi realizada em um equipamento Shimadzu, modelo SPM 9700,

localizado no Laboratório de Caracterização de Materiais II da Universidade de Caxias do Sul. As amostras foram escaneadas por uma sonda piramidal de silício com raio de ponta menor que 10 nm (Nanosensors PPP-LFMR) utilizando o modo *tapping*. A força normal foi de aproximadamente 5 nN (ponto de operação de 0,5 V) com uma constante de mola de aproximadamente 0,2 N m<sup>-1</sup>. As imagens de 1 μm<sup>2</sup> com 512 x 512 pixels de resolução foram obtidas a uma taxa de varredura de 6 μm s<sup>-1</sup>.

#### **4.5.3 Caracterização do comportamento térmico dos filmes compósitos por análise termogravimétrica (TGA)**

A análise da estabilidade térmica dos filmes compósitos, bem como do filme de PVA puro, foi realizada em um equipamento da marca Shimadzu, modelo TGA-50, no Laboratório de Polímeros (LPOL) da Universidade de Caxias do Sul. As amostras, com aproximadamente 5 mg, foram aquecidas da temperatura ambiente até 500 °C com uma taxa de aquecimento de 10 °C min<sup>-1</sup>. A análise foi realizada em atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo constante de 40 mL min<sup>-1</sup>.

#### **4.5.4 Molhabilidade da superfície dos filmes compósitos por ângulo de contato**

A análise da molhabilidade dos filmes foi realizada por medição do ângulo de contato via deposição de 3 gotas de água destilada (~50 μL cada) em áreas distintas das amostras. As medições dos ângulos de contato foram realizadas em um analisador de ângulo de contato da marca Phoenix, modelo P150. Medições foram coletadas a cada 10 minutos. A partir das fotografias obtidas, com o auxílio do *software* Surfaceware, obteve-se o valor do ângulo de contato. Essas análises foram realizadas no Laboratório de Caracterização de Materiais I da Universidade de Caxias do Sul. Considera-se como uma superfície hidrofílica quando o ângulo de contato é inferior a 90°, e hidrofóbica quando superior a 90° (Balasubramaniam *et al.*, 2021; Sharifahmadian *et al.*, 2013).

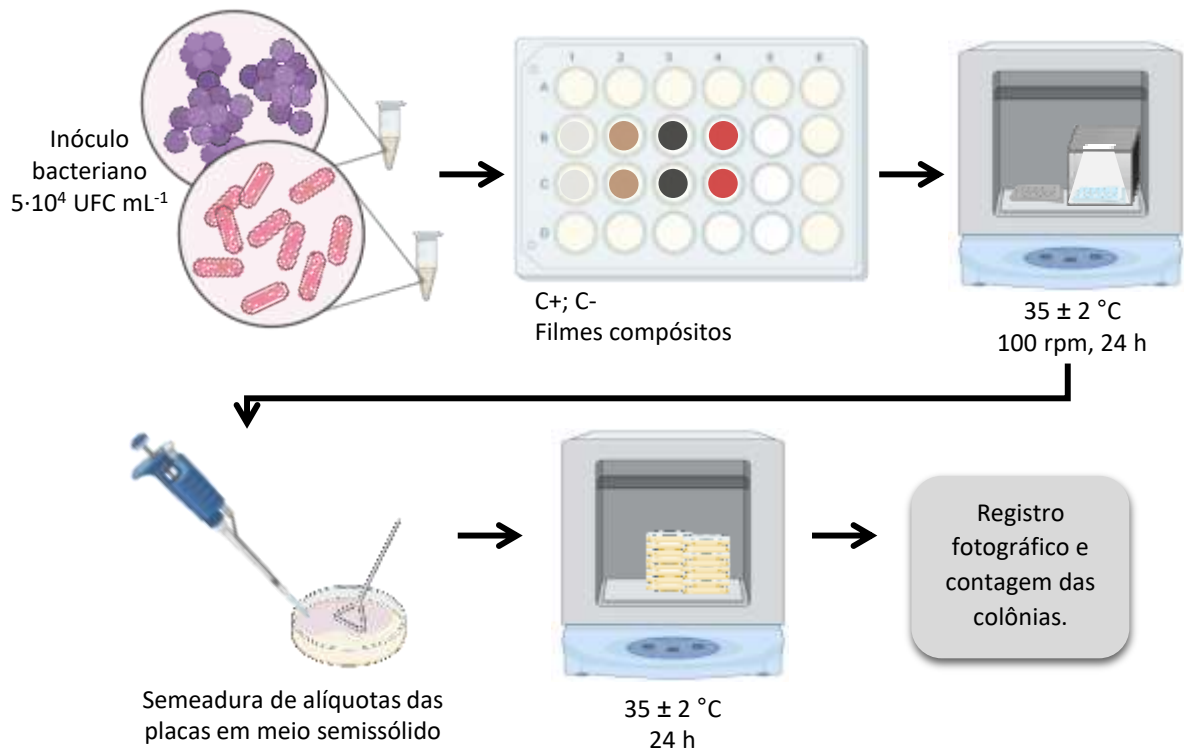


#### 4.6 CARACTERIZAÇÃO DA FOTOATIVIDADE BACTERICIDA DOS FILMES COMPÓSITOS

Assim como nos ensaios com as partículas de cobre, os filmes compósitos foram avaliados adaptando o método de diluição em caldo conforme protocolo M7-A6 (CLSI, 2015). Os microrganismos foram os mesmos utilizados nos ensaios com as partículas em suspensão e cada ensaio foi realizado em triplicata.

Inicialmente preparou-se o inóculo bacteriano, ajustado à turbidez de 0,5 McFarland ( $1-2 \cdot 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) em caldo Mueller Hinton (MH). A partir desta solução, preparou-se uma solução diluída na concentração de  $5 \cdot 10^4$  UFC mL<sup>-1</sup> para o ensaio. Utilizando placas de 24 cavidades, amostras das lamínulas circulares revestidas com os filmes compósitos foram depositadas no fundo das placas (com o filme voltado para cima) e sobre elas, adicionou-se 400 µL do caldo MH mais 20 µL da suspensão bacteriana ajustada na concentração  $5 \cdot 10^4$  UFC mL<sup>-1</sup> (Figura 19). As etapas de incubação, de plaqueamento e de análise foram realizadas conforme descrito anteriormente para os ensaios com as partículas de cobre.

Figura 19 – Representação esquemática dos ensaios para avaliação da fotoatividade bactericida dos filmes compósitos



Fonte: a autora.

Os valores de redução de log foram representados como média  $\pm$  desvio padrão (DP) e todas as análises estatísticas por análise de variância bidirecional (ANOVA) com testes de Tukey post-hoc foram realizadas usando o *software* Jamovi versão 2.3 (Jamovi, 2022). As diferenças entre os filmes e a condição de iluminação foram consideradas significativas quando o valor de probabilidade foi menor que 5% ( $p < 0,05$ ).

#### 4.7 CARACTERIZAÇÃO DA FOTOATIVIDADE VIRUCIDA DOS FILMES COMPÓSITOS

Para os ensaios virucidas utilizou-se a linhagem de fibroblastos de camundongo L929 (ATCC CCL-1) e o coronavírus murino, vírus envelopado da hepatite murina tipo 3 (MHV-3, do inglês *murine hepatitis virus type 3*). A linhagem celular foi definida por ser permissiva ao vírus em análise, com receptores suscetíveis. Quanto ao vírus, segundo Dev Kumar *et al.* (2020), diferentes países europeus recomendam o uso do coronavírus murino para ensaios virucidas. Todos os ensaios foram realizados com réplica e em triplicata no Laboratório de Virologia Aplicada (LVA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

##### 4.7.1 Condições do cultivo celular da linhagem L929 e da propagação viral do MHV-3

A linhagem celular L929, estocada em tubo criogênico de nitrogênio líquido e congelada a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  em meio essencial mínimo (MEM, Gibco), foi descongelada em temperatura ambiente e transferida para uma garrafa de cultura celular estéril de  $75\text{ cm}^2$  com MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Sigma-Aldrich). A garrafa foi transferida para uma estufa a  $37 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  em atmosfera com 5% de  $\text{CO}_2$ , na qual permaneceu por 48 horas.

Após o período de 48 horas, foram preparadas suspensões das linhagens celulares contendo, aproximadamente,  $3,3 \cdot 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$ . Para isso, a monocamada celular da garrafa foi lavada duas vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS) para a adição de  $500\text{ }\mu\text{L}$  de tripsina (Sigma Aldrich, código T4799). A garrafa foi incubada por 5 minutos em estufa a  $37 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  com 5% de  $\text{CO}_2$ , e  $10\text{ }\mu\text{L}$  foram corados com  $10\text{ }\mu\text{L}$  de azul de tripano (Invitrogen, código T10282) para contagem das células viáveis em um contador automatizado Countess<sup>TM</sup> (Invitrogen). Assim, preparou-se placas de 24 cavidades com tapete celular  $2,5 \cdot 10^5$  células por

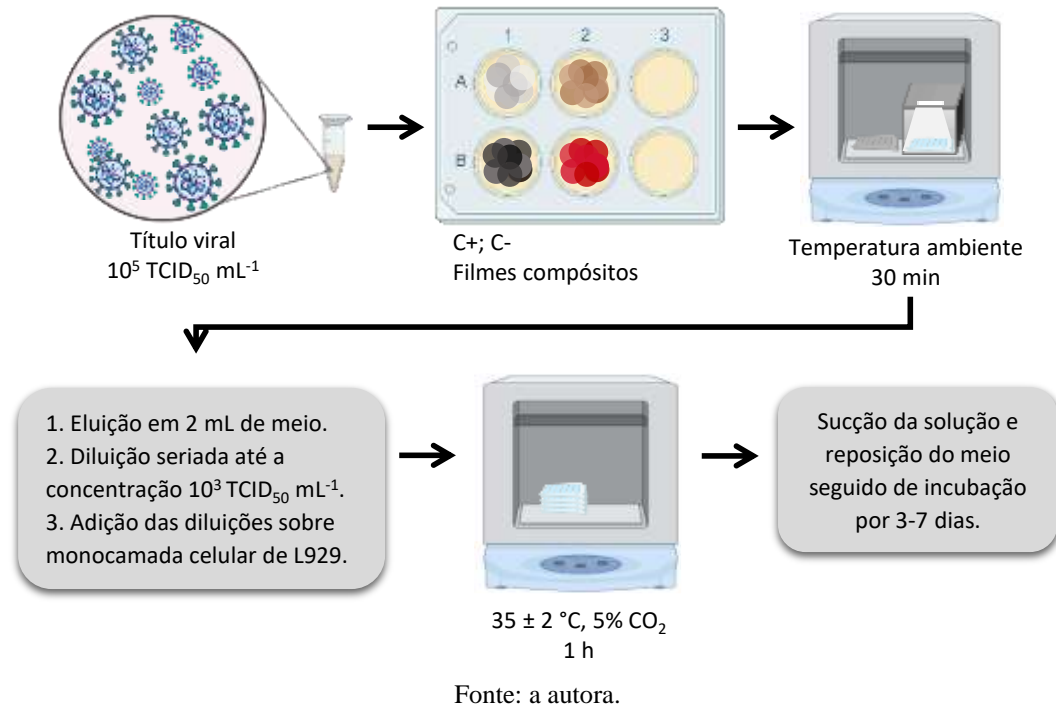
cavidade. Após 24 horas de incubação na estufa com 5% de CO<sub>2</sub>, é obtido o tapete celular para a titulação viral.

O estoque viral de MHV-3, também armazenado a -80 °C, foi descongelado em temperatura ambiente. Para avaliação do título viral da solução, foi realizado o cálculo pela dose infecciosa para 50% da cultura de tecidos (TCID<sub>50</sub>), utilizando o método de Reed-Muench (Reed; Muench, 1938). Como o próprio nome sugere, esse método indica a diluição do vírus que resulta na infecção de 50% das replicatas de inoculação, expressa em TCID<sub>50</sub> mL<sup>-1</sup> (Flint *et al.*, 2015). No ensaio, alíquotas do estoque viral foram submetidas a diluições seriadas de base 10 em meio MEM sem SFB e cada diluição foi inoculada nas placas de 24 cavidades, previamente preparadas. As placas foram incubadas na estufa a 37 ± 2 °C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> e observadas após 3-5 dias em microscópio invertido. Foram contadas as cavidades infectadas, ou seja, com efeito citopático (ECP) evidente, e as não infectadas, para ser calculada a porcentagem de infecção de cada diluição. Enfim, o título da suspensão viral foi determinado pelo método de Reed-Muench (Reed; Muench, 1938; Chen *et al.*, 2016),

#### **4.7.2 Ensaio virucida**

O ensaio para avaliação da fotoatividade virucida dos filmes compósitos foi desenvolvido conforme esquema representativo da Figura 20 com base na ISO 21702 de 2019 com modificações (ISO 21702, 2019). Essa norma especifica métodos para a determinação da atividade virucida de plásticos e outras superfícies não porosas e por isso foi adaptada para se adequar aos objetivos do trabalho. Antes de cada ensaio, todas as amostras foram esterilizadas em câmara com irradiação UV por 2 horas em cada lado da superfície.

Figura 20 – Esquema do ensaio para avaliação da fotoatividade virucida dos filmes compósitos



O método consistiu no contato direto entre o filme de PVA e os filmes compósitos e a suspensão viral com título  $10^5 \text{ TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$  de MHV-3 durante 30 minutos na ausência de luz e sob iluminação com luz branca em temperatura ambiente. Decorrido esse tempo, a solução da suspensão viral foi eluída e diluída em 2 mL de meio essencial mínimo (MEM) não suplementado. A partir dessa solução eluída ( $10^4 \text{ TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$ ), realizou-se uma diluição seriada 1:10 para obter uma segunda concentração viral,  $10^3 \text{ TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$ .

Com essas soluções prontas, bem como as do controle viral, alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  foram adicionadas nas placas de 24 cavidades previamente preparadas com uma monocamada de  $3,3 \cdot 10^5$  células por cavidade. Após 1 hora em estufa a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  com 5% de  $\text{CO}_2$ , a solução de cada cavidade foi aspirada e as placas incubadas novamente com 750  $\mu\text{L}$  de meio MEM suplementado com 10% de SFB e sem PSA.

No período entre 3 e 5 dias de incubação, as placas foram avaliadas em microscópio invertido para avaliação efeito citopático (ECP) seguido de registrado fotográfico. O ECP se apresenta via alterações estruturais nas células hospedeiras devido infecção viral, logo, a ausência dele indica atividade virucida do material em teste.

Com as amostras que se mostraram promissoras, realizou-se o ensaio de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) de transcrição reversa quantitativa integrada à cultura celular

(ICC-RT-qPCR, do inglês *Integrated Cell Culture and Reverse Transcription Quantitative PCR*), também no LVA da UFSC. Nesse teste, a partir da placa de 24 cavidades tratada, o sobrenadante foi aspirado e a monocamada celular lavada três vezes com PBS. Em seguida, adicionou-se 200 µL de tripsina em cada cavidade e a placa foi incubada em estufa com CO<sub>2</sub> por 2 minutos. Após esse tempo, adicionou-se 500 µL de MEM em cada cavidade para ressuspender as células, as quais foram, em sequência, submetidas à centrifugação por 2 minutos a 2000 rpm. Em seguida, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se as células em 200 µL de MEM para a extração dos ácidos nucleicos. A extração foi conduzida utilizando *beads* magnéticas e seguindo o protocolo próprio do kit de extração RNAdvance Viral Bind (Beckman Coulter).

Após a extração, a quantificação de ácidos nucleicos das amostras foi realizada com auxílio de um espectrofotômetro NanoVue (Avantor) para, em sequência, ser realizado o PCR quantitativo de transcrição reversa (RT-qPCR do inglês *Reverse Transcription PCR*) com o kit QuantiNova Probe™ RT PCR (Qiagen).

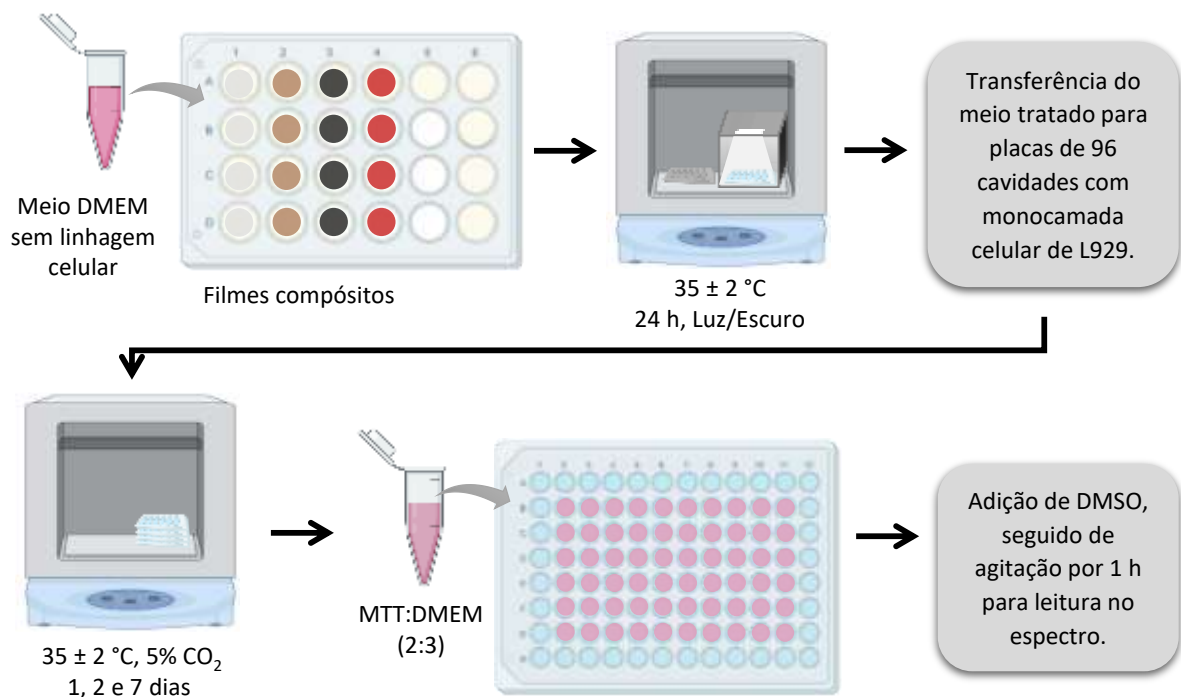
#### 4.8 CITOTOXICIDADE DOS FILMES COMPÓSITOS

A biocompatibilidade e a citotoxicidade dos filmes compósitos foram avaliadas por dois métodos: a avaliação da atividade mitocondrial (método indireto) e por microscopia eletrônica de varredura (método direto). Para os ensaios utilizou-se a linhagem celular de fibroblastos de camundongo L929. Os ensaios foram realizados em triplicata no Laboratório de Toxicologia Aplicada e Bioprodutos (LTAB) no Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul. Os ensaios foram conduzidos conforme a ISO 10993-5 de 2019 com modificações (ISO 10993-5, 2009).

Para a análise da citotoxicidade indireta, 100 µL de suspensão celular foram adicionados em 2 placas estéreis de 96 cavidades com uma densidade de semeadura de  $5 \cdot 10^4$  células por cavidade, as quais foram posteriormente incubadas a  $35 \pm 2$  °C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Em paralelo, em 2 placas de 24 cavidades, 220 µL de meio DMEM (Gibco, baixa glicose) suplementado com 10% de SFB e 1% de PSA foram adicionados sobre os filmes de PVA puro e os compósitos, e ambas foram incubadas a  $35 \pm 2$  °C por 24 horas, uma no escuro e outra sob iluminação por luz visível.

Decorrido esse primeiro dia de teste, o meio das placas de 96 poços foi aspirado, e adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  da solução do meio tratado com os filmes poliméricos. Essas placas foram novamente incubadas em estufa com 5% de  $\text{CO}_2$  (ambas no escuro) e após decorridas 24 horas, o meio foi novamente aspirado para a adição de 100  $\mu\text{L}$  da solução de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio) diluída em meio DMEM na proporção 2:3 (v/v). As células tratadas permanecem em contato com o MTT por 2 horas em estufa com  $\text{CO}_2$ , e por fim, a solução foi aspirada e adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido (DMSO) para, após 20 minutos de agitação, ser realizada a leitura de absorbância das soluções (Figura 21). Os valores de absorção foram medidos a 570 nm usando um leitor de microplacas (Multiskan FC, Thermo Fischer). A viabilidade celular representa a razão entre as células tratadas viáveis (amostra) e o controle (células não tratadas com os filmes) (Díaz-Puertas *et al.*, 2023; ISO 10993-5, 2009; Loutfy *et al.*, 2020; Mosmann, 1983).

Figura 21 – Esquema do ensaio para avaliação da citotoxicidade indireta dos filmes compósitos

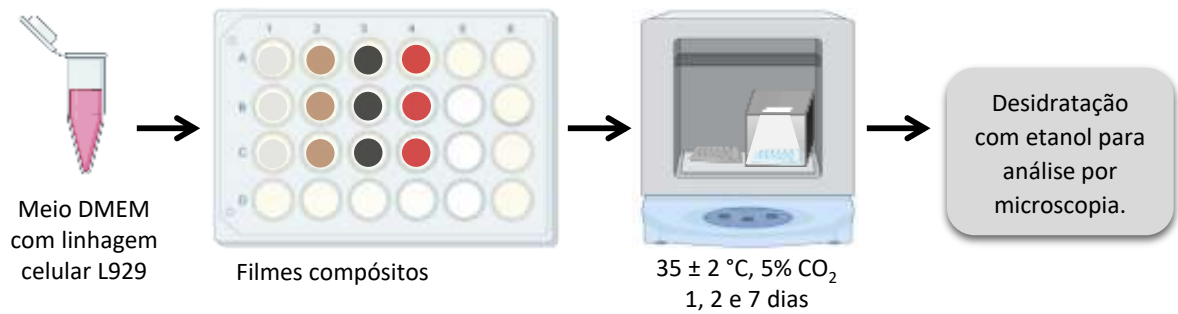


Fonte: a autora.

Para a análise da citotoxicidade direta, 220  $\mu\text{L}$  da linhagem L929 na concentração de  $5 \cdot 10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$  em meio DMEM suplementado com 10% de SFB e 1% de PSA foram incubadas em contato direto com os filmes compósitos em estufa a  $35 \pm 2$   $^{\circ}\text{C}$  com 5% de  $\text{CO}_2$ .

Após o período de 1, 2 e 7 dias, o meio foi aspirado e as células foram fixadas sobre os filmes com uma solução de glutaraldeído 3% (v/v em PBS) por 10 minutos. Em seguida, foi realizado o processo de desidratação das amostras a partir de imersões dos filmes por 10 minutos em soluções de etanol 30, 50, 70, 90 e 100% (v/v). Em seguida, as amostras foram encaminhadas para análise por MEV-FEG (Figura 22) (ISO 10993-5, 2009; Rodrigues *et al.*, 2019).

Figura 22 – Esquema do ensaio para avaliação da citotoxicidade direta dos filmes compósitos



Fonte: a autora.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados os resultados das caracterizações das partículas de cobre, bem como de sua atividade bactericida na ausência e na presença de luz. Em seguida, são descritos os parâmetros de síntese dos filmes compósitos, bem como os resultados de suas caracterizações por diferentes técnicas. Enfim, são relatados os resultados referentes à fotoatividade bactericida e virucida dos filmes, bem como à sua citotoxicidade.

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS DE COBRE

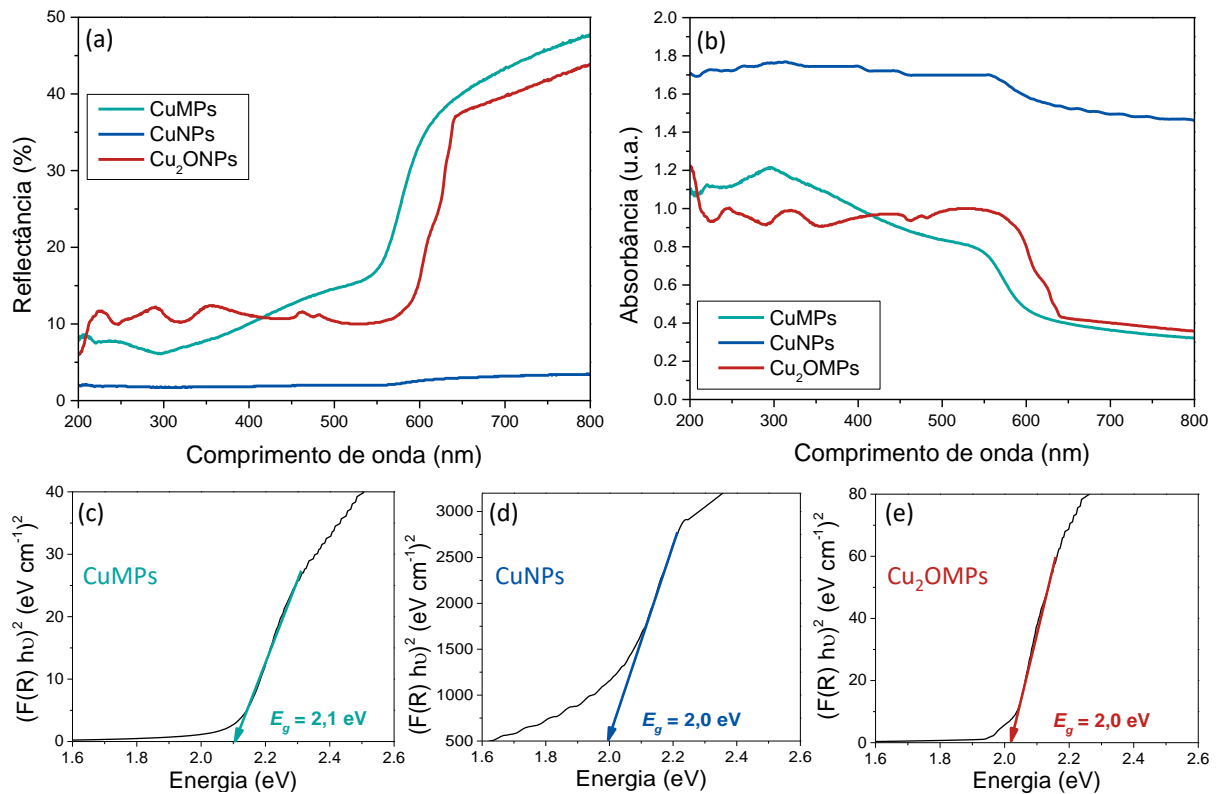
A caracterização das partículas de cobre e de óxido de cobre (I), tanto na micro como na nanoescala, foi realizada por técnicas espectroscópicas e por microscopias eletrônicas de varredura e de transmissão.

#### 5.1.1 Banda proibida das partículas de cobre

A partir dos espectros de reflectância difusa (Figura 23a) obtidos por espectroscopia de absorção molecular na região do ultravioleta e do visível, foram gerados os gráficos dos espectros de absorbância de Kubelka-Munk (Figura 23b). Quanto aos gráficos das partículas metálicas (CuMPs e CuNPs), não foi observado um único pico de absorção, como é esperado para o metal livre de oxidação. Logo, esse resultado indica a presença de óxidos de cobre na superfície do material, uma vez que o cobre metálico é suscetível à oxidação superficial. De acordo com Chan *et al.* (2007), a exposição à atmosfera, em temperatura ambiente, promove sua oxidação a Cu<sub>2</sub>O predominantemente, seguido de óxido de cobre(II) (CuO), ambos semicondutores. Aplicando o método gráfico de Tauc, pela extrapolação de uma linha na parte linear da curva da função Kubelka-Munk até o eixo das abscissas, obteve-se o valor de banda proibida de 2,1, 2,0 e 2,0 eV para as CuMPs, CuNPs e Cu<sub>2</sub>OMPs, respectivamente (Figura 23c-e) (Chatterjee; Saha; Pal, 2016; Huang *et al.*, 2014; Rajendran *et al.*, 2020). A maior reflectância das micropartículas pode ser atribuída ao melhor espalhamento dos feixes de luz por elas transmitido devido ao maior tamanho de cristalito (Akgul *et al.*, 2014).



Figura 23 – Espectros de refletância (a) convertidos em espectros de absorvância (b) para determinação da energia proibida das CuMPs (c), CuNPs (d) e Cu<sub>2</sub>OMPs (e).



Fonte: a autora.

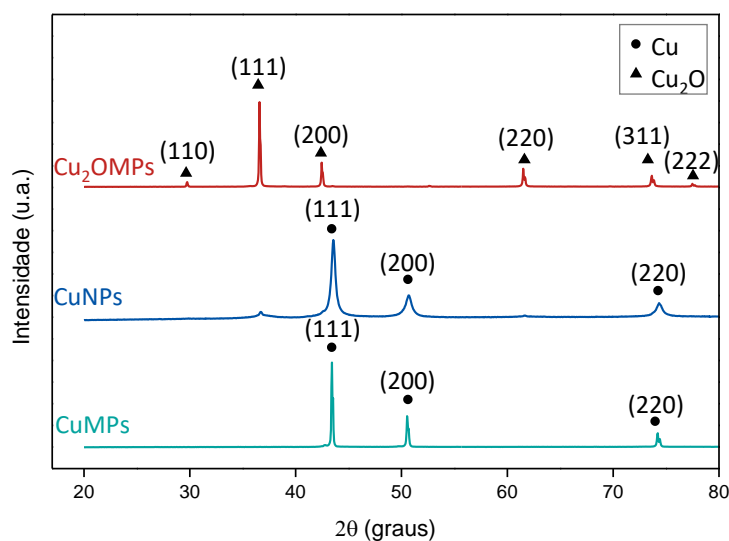
Visto que no presente trabalho pretende-se avaliar o efeito da luz branca sobre a atividade bactericida e virucida das partículas, o valor da banda proibida terá influência direta para tal aplicação fotocatalítica, pois deve-se considerar que a energia radiada é absorvida quando for menor que a energia da banda proibida do material, e transmitida quando for maior. Ambos os valores obtidos são corroborados pela literatura e encontram-se na região visível do espectro, sendo assim, um resultado promissor para o objetivo do trabalho (Tilley, 2010). Quanto à possível oxidação das partículas, as técnicas de DRX, FTIR, Raman e XPS vêm em auxílio.

### 5.1.2 Difractogramas de DRX e espectros de FTIR e de Raman das partículas de cobre

Os resultados obtidos da análise de DRX das partículas de cobre são apresentados na Figura 24. Com o difratograma das partículas de cobre na micro e na nanoescala, CuMPs e CuNPs, os picos de difração em 43,44°, 50,56° e 74,25° foram respectivamente indexados aos

planos (111), (200) e (220) e a estrutura cristalina foi identificada como cúbica de face centrada. Quanto ao difratograma das partículas de óxido de cobre (I), Cu<sub>2</sub>OMPs, os picos de difração em 29,75°, 36,60°, 42,49°, 61,55°, 73,70 e 77,55° foram respectivamente indexados aos planos (110), (111), (200), (220), (311) e (222), também representando por uma estrutura cúbica, mas particularmente à estrutura cuprita. Esses resultados são consistentes com a literatura e com os valores disponíveis no Centro Internacional de Dados de Difração (ICDD, do inglês *International Centre for Diffraction Data*) pelos códigos 04-0836 para cobre metálico e 05-0667 para óxido de cobre (I) (Huo *et al.*, 2020; Kociołek-Balawejder *et al.*, 2019; Ma *et al.*, 2022; Sawant; Bhagwat; Mahajan, 2016). Nenhuma outra fase foi observada em ambos os espectros. Os tamanhos médios de cristalito foram calculados aplicando o método gráfico de Williamson-Hall, resultando nos valores de 347, 11 e 462 nm para as amostras CuMPs, CuNPs e Cu<sub>2</sub>OMPs, respectivamente.

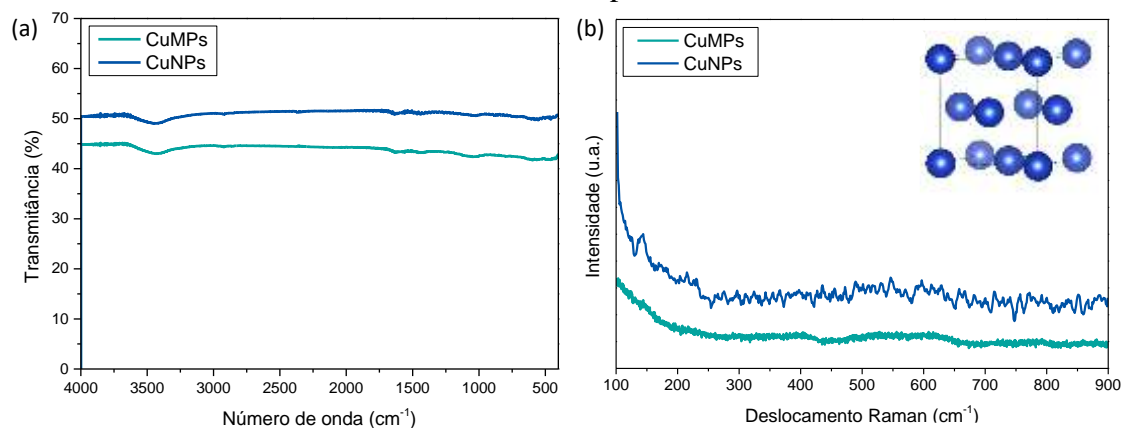
Figura 24 – Difratogramas obtidos por DRX das partículas de cobre



Fonte: a autora.

O cobre metálico, conforme identificado por DRX, possui uma estrutura cristalina cúbica de face centrada (Dey; Mitra; Taraphder, 2018). Uma vez que as técnicas ATR-FTIR e Raman se baseiam na energia e na frequência vibracional das ligações químicas dos materiais, a presença de partículas de cobre metálico puro não pode ser determinada a partir delas. Todavia, esses ensaios de caracterização foram desenvolvidos com o objetivo de verificar a possível oxidação e/ou contaminação das amostras CuMPs e CuNPs, o que não foi observado.

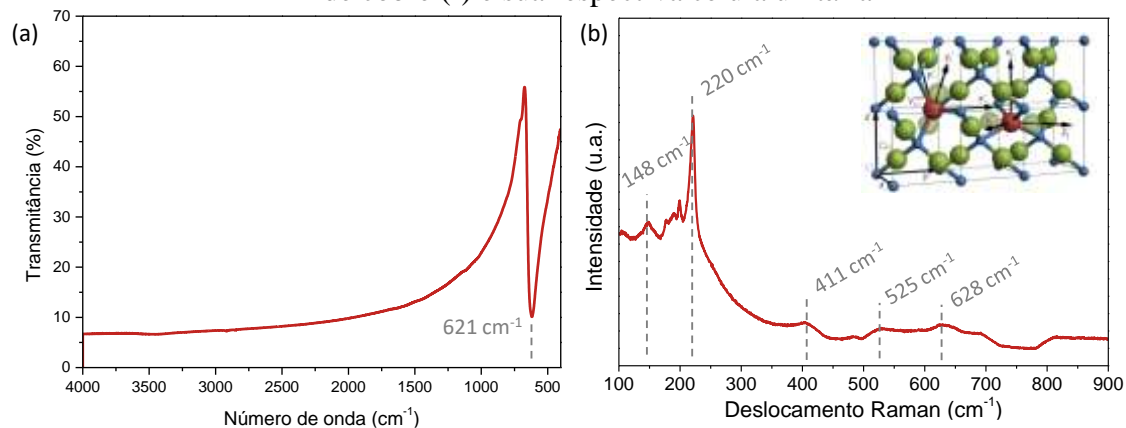
Figura 25 – Espectros obtidos por ATR-FTIR (a) e Raman (b) das micro e nanopartículas de cobre metálico e sua respectiva célula unitária



Fonte: a autora.

O óxido de cobre (I) apresenta célula unitária primitiva com duas unidades moleculares, ou seja, seis átomos. Cada átomo de cobre é coordenado linearmente com dois átomos de oxigênio, enquanto cada átomo de oxigênio é coordenado tetraedricamente com quatro átomos de cobre. O  $\text{Cu}_2\text{O}$  monocristalino tem dois modos ativos infravermelhos e apenas um modo ativo Raman. De acordo com o espectro obtido por ATR-FTIR das  $\text{Cu}_2\text{O}$ MPs, a banda de absorção observada em  $621\text{ cm}^{-1}$  é característica das vibrações de estiramento da ligação Cu–O na fase  $\text{Cu}_2\text{O}$  (Figura 26a). O outro modo ativo no infravermelho se apresenta nas regiões entre  $140$  e  $160\text{ cm}^{-1}$  e não pôde ser observado no presente espectro devido à limitação do equipamento (Sahai *et al.*, 2016; Sawant; Bhagwat; Mahajan, 2016). O espectro de Raman da amostra apresentou os cinco sinais característicos do  $\text{Cu}_2\text{O}$ , em  $148$ ,  $220$ ,  $411$ ,  $525$  e  $628\text{ cm}^{-1}$ . O pico em  $525\text{ cm}^{-1}$  é atribuído ao modo ativo Raman, enquanto os demais são atribuídos a modos inativos (Figura 26b) (Huang *et al.*, 2014; Sahai *et al.*, 2016; Sander *et al.*, 2014).

Figura 26 – Espectros obtidos por ATR-FTIR (a) e Raman (b) das micropartículas de óxido de cobre (I) e sua respectiva célula unitária



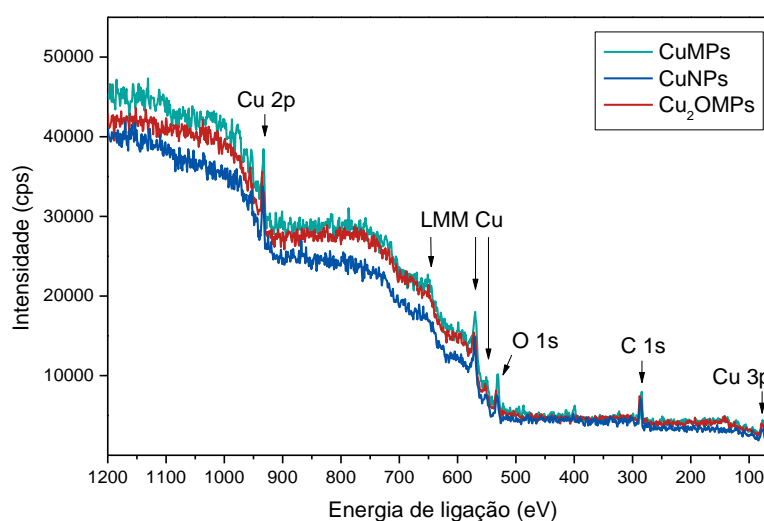
Fonte: a autora.

### 5.1.3 XPS das partículas de cobre

A técnica XPS é frequentemente utilizada para investigar compostos constituídos por metais de transição com orbitais  $d$  na camada de valência. Com número atômico igual a 29, o cobre possuiria a seguinte distribuição eletrônica:  $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 4s^2 3d^9$  (teórica). Entretanto, uma vez que sua terminação é  $d^9$  e os subníveis  $4s$  e  $3d$  possuem energias próximas, um elétron do subnível  $s$  é promovido para o subnível  $d$ , de modo a garantir maior estabilidade ao átomo. Assim, a configuração eletrônica final do cobre é  $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 4s^1 3d^{10}$ . Destaca-se todavia que, quando oxidado, o cobre em CuO ( $\text{Cu}^{2+}$ ) existe em estado bivalente como  $[\text{Ar}] 4s^2 3d^9$ , enquanto em  $\text{Cu}_2\text{O}$  ( $\text{Cu}^+$ ) apresenta a camada  $3d$  completa (Biesinger, 2017; Rtimi; Kiwi, 2020; Tilley, 2010; Yin *et al.*, 2005). Contudo, embora o  $\text{Cu}_2\text{O}$  apresente os orbitais completamente preenchidos, ele é considerado menos estável que o CuO (Camacho-Espinosa *et al.*, 2018).

Desse modo, uma vez que a técnica XPS é sensível à superfície, observou-se e quantificou-se a presença dos óxidos de cobre nas amostras, bem como do hidróxido de cobre ( $\text{Cu}(\text{OH})_2$ ). Essas fases são transições de estado oxidativo associadas a condições de envelhecimento do metal que envolvem umidade, temperatura e a própria irradiação de luz (Camacho-Espinosa *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2014; Jana *et al.*, 2021). A Figura 27 apresenta o espectro de XPS das partículas de cobre CuMPs, CuNPs e  $\text{Cu}_2\text{OMP}$ s na faixa de 1200 a 50 eV. No espectro, são observados cobre (elétrons 2p, 3p e linhas Auger “LLM”), oxigênio (elétrons 1s) e carbono (elétrons 1s).

Figura 27 – Espectro total de XPS das partículas de cobre



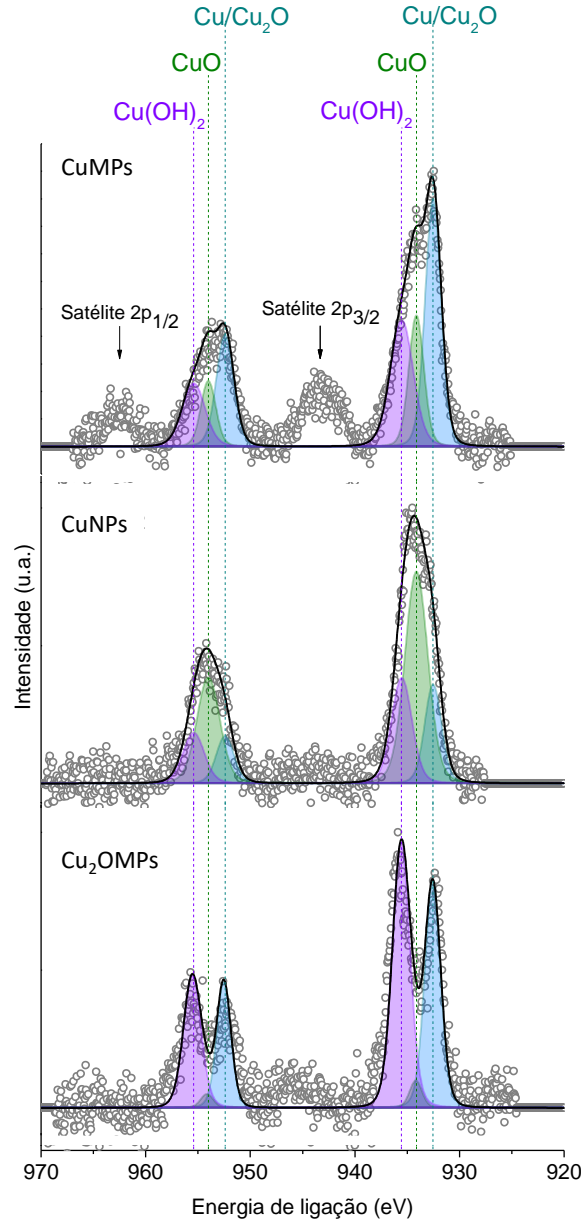
Fonte: a autora.

Na análise do Cu 2p, observou-se o desdobramento dos elétrons 2p do cobre em duas contribuições (do inglês *spin-orbit splitting*), correspondendo ao  $2p_{3/2}$  e  $2p_{1/2}$ . Nota-se que a área do sinal  $p_{1/2}$  é sempre a metade da área do sinal  $p_{3/2}$  correspondente. A distância entre eles é de aproximadamente 19,9 eV, em acordo com a literatura (Biesinger, 2017; Camacho-Espinosa *et al.*, 2018; Moulder *et al.*, 1992). Os resultados foram deconvoluídos com base nos trabalhos de Biesinger (2017) e Camacho-Espinosa *et al.* (2018), conforme Figura 28, considerando as seguintes contribuições:

- a) os picos em 932,5 eV ( $2p_{3/2}$ ) e em 952,4 eV ( $2p_{1/2}$ ) podem corresponder tanto ao cobre metálico ( $\text{Cu}^0$ ) quanto ao acoplamento spin-orbita no  $\text{Cu}_2\text{O}$  ( $\text{Cu}^+$ ). Todavia, a observação de picos satélites (em 943 e 963 eV) é verificada apenas quando há óxidos de cobre presentes na amostra, evidenciando assim, a presença da fase  $\text{Cu}_2\text{O}$  na mesma, mas sem subjugar a presença do cobre metálico;
- b) os picos em 934,1 eV ( $2p_{3/2}$ ) e em 954,0 eV ( $2p_{1/2}$ ) são referentes ao acoplamento spin-orbita no  $\text{CuO}$  ( $\text{Cu}^{2+}$ ), o óxido de cobre no estado mais estável e comumente observado em amostras particuladas de cobre;
- c) os picos em 935,5 eV ( $2p_{3/2}$ ) e 955,4 eV ( $2p_{1/2}$ ) correspondem ao acoplamento spin-orbita no  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ . Tal composto é comumente citado como produto intermediário da reação de formação do  $\text{Cu}_2\text{O}$  no processo oxidativo.

Quanto aos picos de satélite, estes são originados pelas interações múltiplas e simultâneas de fotoelétrons de saída com um elétron de valência. Tal processo resulta em uma menor energia cinética para alguns dos fotoelétrons excitados do núcleo 2p, resultando em satélites com energias de ligação aparentemente superiores. Esse comportamento é característico dos óxidos de cobre, mas principalmente da fase  $\text{CuO}$ ; logo, os sinais de satélites nos espectros de Cu 2p são indícios da presença de  $\text{CuO}$  na camada superficial das amostras (Akgul *et al.*, 2014; Bojestig; Cao; Nyborg, 2020; Camacho-Espinosa *et al.*, 2018).

Figura 28 – Deconvoluções dos espectros de XPS na região Cu 2p das partículas de cobre



Fonte: a autora.

Concluídas as deconvoluções dos espectros de XPS na região Cu 2p das partículas de cobre, a partir das áreas integradas de cada pico, foi calculada a concentração de cada fase de cobre nas amostras. A Tabela 4 apresenta os valores obtidos. Desse modo, verifica-se que a amostra CuMPs, encontra-se parcialmente oxidada nas fases Cu<sup>2+</sup>. A amostra CuNPs, devido à maior área de superfície, conseqüentemente, maior contato com a atmosfera, 56% da superfície já se encontra completamente oxidada. Por fim, a amostra Cu<sub>2</sub>OMPs, 55% do Cu<sub>2</sub>O já se apresenta oxidado a Cu(OH)<sub>2</sub> na superfície, enquanto 4% já oxidou por completo. Tais resultados, justificam os espectros obtidos por UV-vis.

Tabela 4 – Concentrações estimadas das fases de cobre na superfície das partículas de cobre

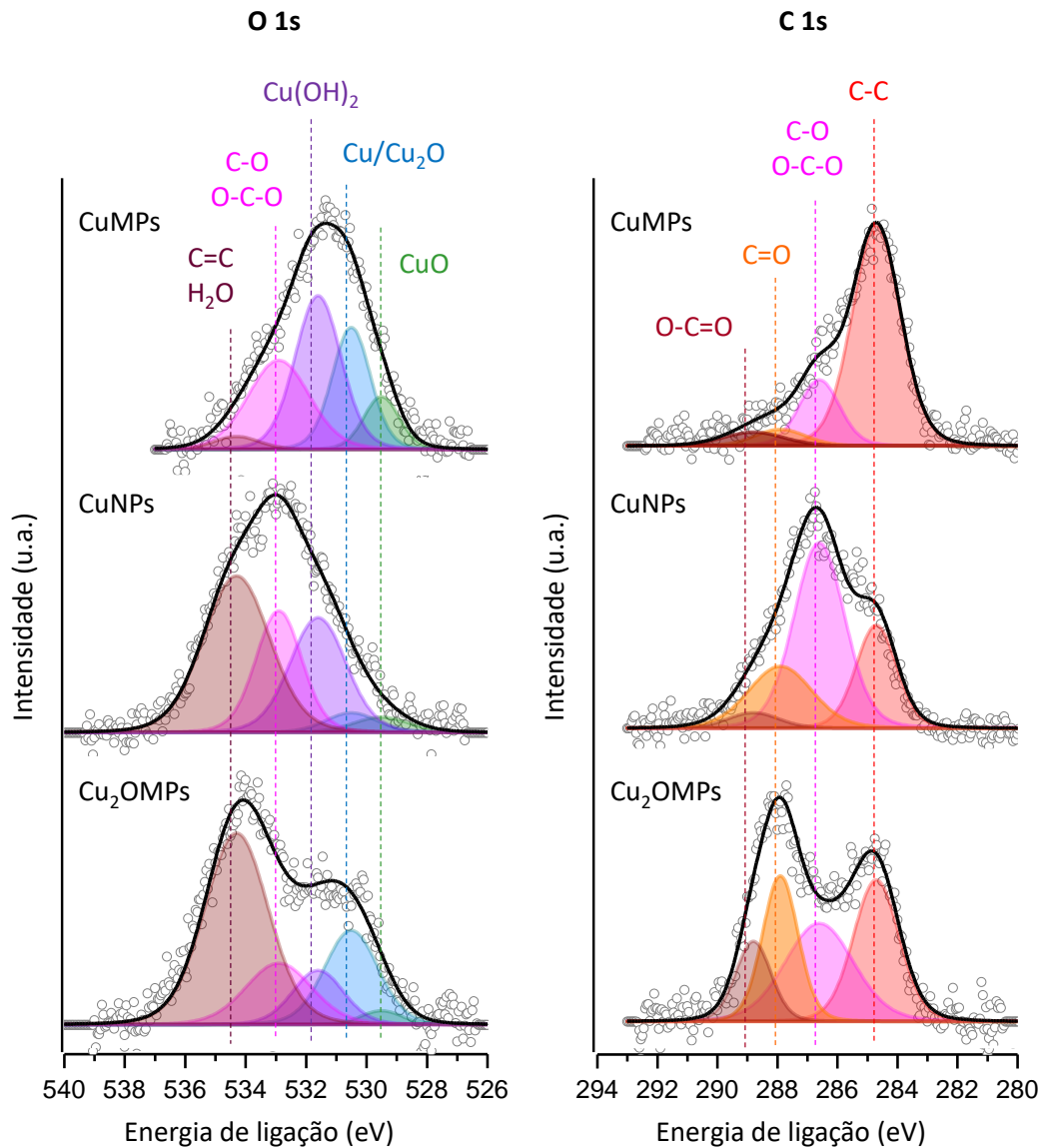
Amostra	Cu/Cu <sub>2</sub> O	CuO	Cu(OH) <sub>2</sub>
CuMPs	45%	22%	33%
CuNPs	19%	56%	25%
Cu <sub>2</sub> OMPs	42%	4%	55%

Fonte: a autora.

Na análise dos sinais de O 1s (Figura 29), as mesmas contribuições com oxigênio observadas nos espectros de Cu 2p foram encontradas. De acordo com a literatura, o pico em 529,5 eV é indexado ao CuO, em 530,5 eV tem-se o Cu<sub>2</sub>O, e em 531,6 eV o Cu(OH)<sub>2</sub>. Por fim, foram observadas em 532,9 eV as ligações C—O e O—C—O, e ainda, em 534,3 eV as ligações C=O e H<sub>2</sub>O, correspondendo às espécies contaminantes também observadas nos espectros de C 1s (Au; Roberts, 1981; Biesinger, 2022; Bojestig; Cao; Nyborg, 2020).

Carbono foi observado devido à fita dupla face de carbono utilizada para a fixação do material particulado. Ademais, a maior parte de amostras metálicas que são expostas à atmosfera apresenta uma quantidade detectável de contaminação provinda por carbono, como CO<sub>2</sub> e gorduras. Para esse elemento, as ligações detectadas foram C—C em 284,7 eV, C—O e O—C—O em 286,6 eV, C=O em 287,9 eV e O—C=O em 288,8 eV, ambos de acordo com a literatura (Biesinger, 2017, 2022; Camacho-Espinosa *et al.*, 2018; Fernandez *et al.*, 2020; Sahai *et al.*, 2016). A Figura 28 também apresenta as deconvoluções dos espectros de XPS das partículas de cobre na região C 1s.

Figura 29 – Deconvoluções dos espectros de XPS nas regiões O 1s e C 1s das partículas



Fonte: a autora.

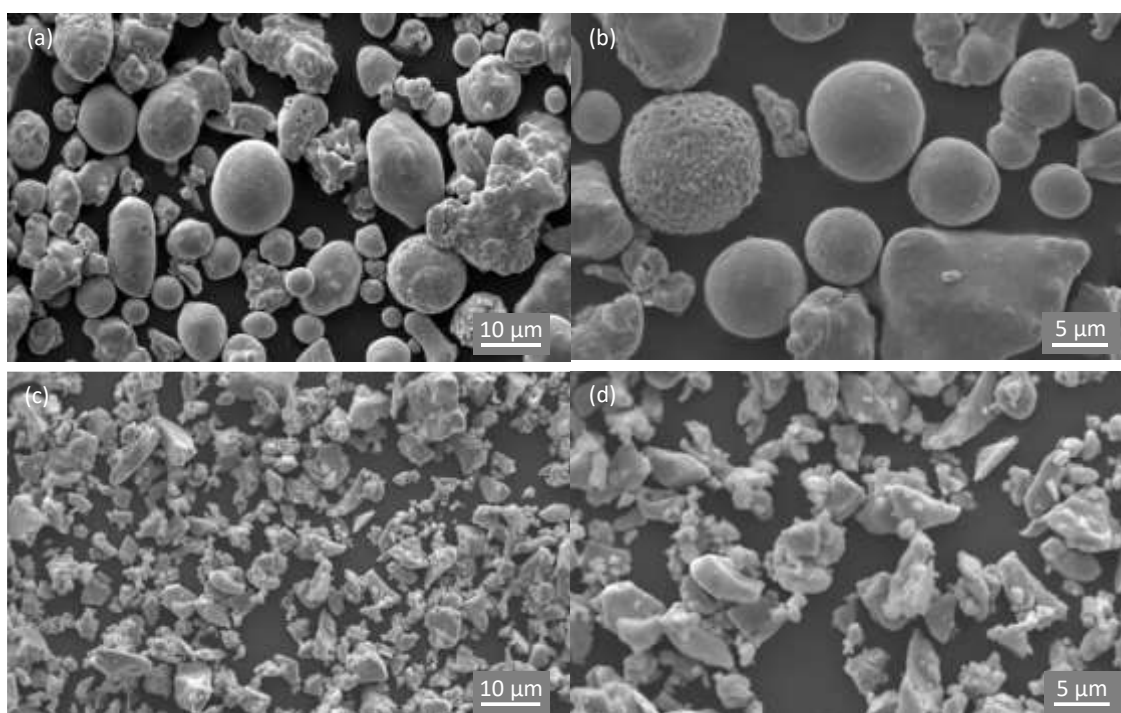
Todos os resultados, bem como a indexação dos picos são compatíveis com demais trabalhos da literatura (Biesinger, 2017; Bojestig; Cao; Nyborg, 2020; Camacho-Espinosa *et al.*, 2018; Fernandez *et al.*, 2020; Sahai *et al.*, 2016). Ainda, o fato dos difratogramas obtidos por DRX e dos espectros de FTIR e Raman não terem apresentado evidências das fases oxidadas, indica que estas estão presentes apenas na superfície do material particulado, formando uma fina camada externa em escala nanométrica, pois XPS é uma técnica altamente sensível à superfície e só pode obter as informações de composição das primeiras monocamadas na superfície das amostras em análise (Akgul *et al.*, 2014; Fernandez *et al.*, 2020; Yin *et al.*, 2005).



### 5.1.4 Micrografias das partículas de cobre e respectivos EDS

As micrografias obtidas por MEV das micropartículas de cobre metálico (Figura 30a,b) revelaram uma heterogeneidade do material, tanto em dimensão como em forma, uma vez que são observadas esferas de diferentes diâmetros e partículas com morfologias diversas. Em paralelo, as micrografias do óxido de cobre (I) (Figura 30c,d) apresentam ainda maior heterogeneidade, visto que todas as partículas apresentam uma morfologia sem definição.

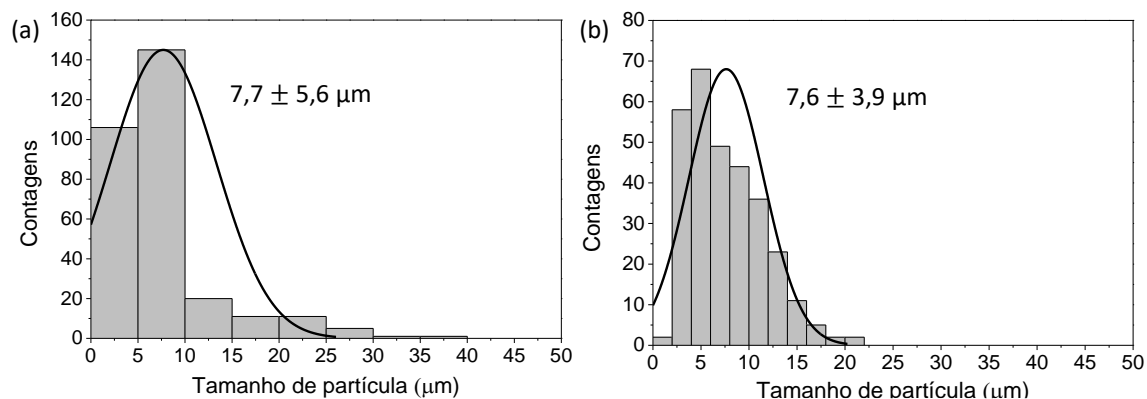
Figura 30 – Micrografias obtidas por MEV das amostras CuMPs (a,b) e Cu<sub>2</sub>OMPs (c,d)



Fonte: a autora.

Diante disso, utilizando o *software* ImageJ, realizou-se uma avaliação dimensional das partículas. Foram mensuradas 300 partículas aleatórias a partir de três micrografias com magnificação de 500 vezes. Para as partículas sem uma morfologia definida foi medida a aresta de maior dimensão. A partir dessas medições, gerou-se o gráfico de distribuição de tamanho de partícula (histograma) para obtenção do tamanho médio e seu desvio padrão. Apesar da aglomeração, verificou-se que as partículas de cobre metálica apresentam um tamanho médio inferior do descrito pelo fornecedor, pois possui um tamanho médio similar às de óxido de cobre (I), as quais apresentaram um tamanho médio condizente com o apresentado pelo fornecedor ( $<7\mu\text{m}$ ). Em resumo, as partículas CuMPs apresentaram um tamanho médio de  $7,7 \pm 5,6 \mu\text{m}$  (Figura 31a) e as Cu<sub>2</sub>OMPs,  $7,6 \pm 3,9 \mu\text{m}$  (Figura 31b).

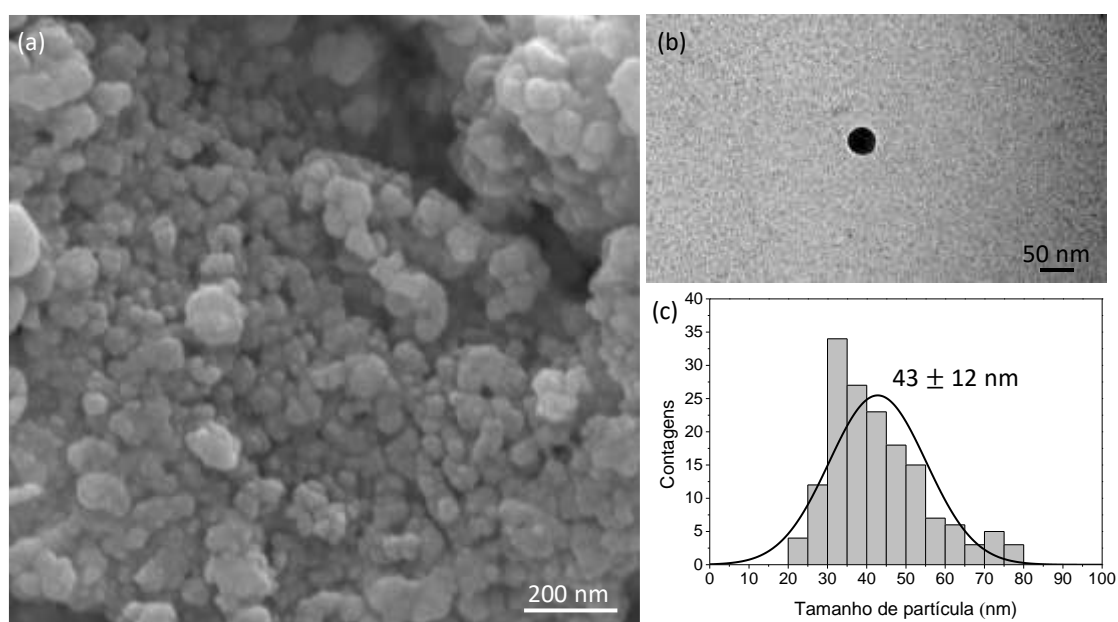
Figura 31 – Histogramas de distribuição de tamanho das CuMPs (a) e Cu<sub>2</sub>OMPs (b)



Fonte: a autora.

As nanopartículas de cobre, CuNPs, foram avaliadas por MEV-FEG (Figura 32a) e MET (Figura 32b). Apesar da aglomeração e agregação das partículas, a escala nanométrica da amostra pôde ser comprovada. Utilizando o *software* ImageJ, realizou-se uma avaliação dimensional da amostra pela mensura de 100 partículas aleatórias a partir de três micrografias obtidas por MEV-FEG com magnificação de 200 mil vezes. A partir dessas medições, verificou-se que as nanopartículas de cobre metálico apresentam um tamanho médio de  $43 \pm 12 \text{ nm}$ . Quanto às micrografias obtidas por MET, apesar da tendência a aglomeração característica de suspensões de nanopartículas, partículas isoladas puderam ser observadas, como apresentado na Figura 32b.

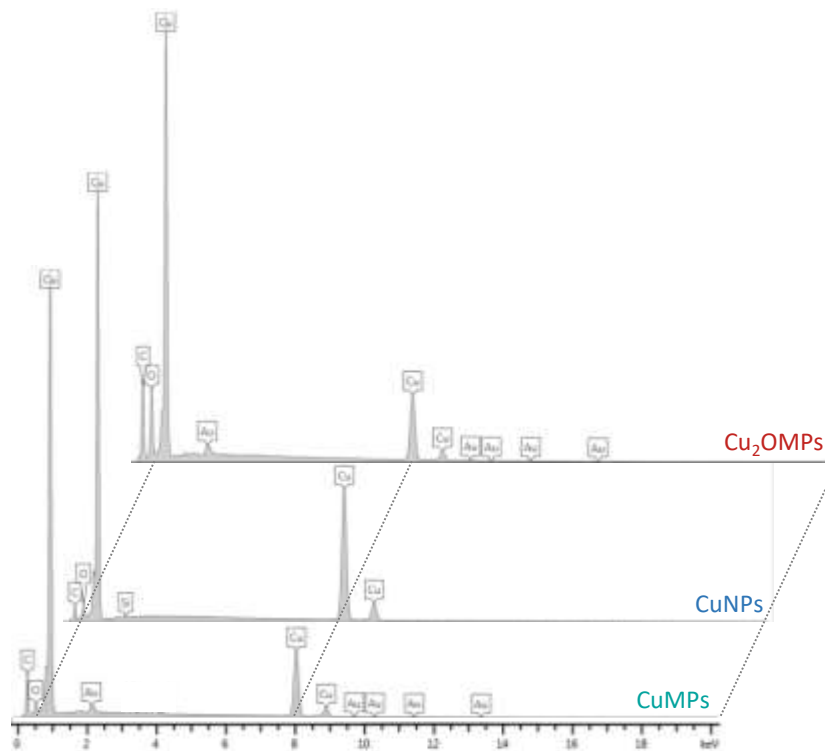
Figura 32 – Micrografias obtidas por MEV-FEG (a) e por MET (b) da amostra CuNPs e seu respectivo histograma (c)



Fonte: a autora.

A análise da composição elementar do espectro de EDS das partículas de cobre (Figura 33), indicou a presença de cobre, carbono, oxigênio e ouro, sendo o pico mais intenso representado pelo cobre. O pico do carbono é referente à fita de carbono utilizada para fixação do material sobre o suporte da amostra, e o ouro, refere-se ao metal utilizado para recobrimento da amostra para análise. Há a presença de oxigênio em ambas as amostras, mais evidente na amostra de  $\text{Cu}_2\text{O}$ . A presença de oxigênio na amostra de cobre metálico pode representar um indício de oxidação do material, já verificado pela análise de XPS. Os valores de energia verificados nos espectros são compatíveis com os reportados na literatura, de acordo com o trabalho de Bearden de 1967, em que os valores teóricos para o cobre são 0,930 e 8,028 keV, para carbono 0,277 keV e para oxigênio 0,525 keV.

Figura 33 – Espectros de EDS e mapa elementar das partículas de cobre



Fonte: a autora.

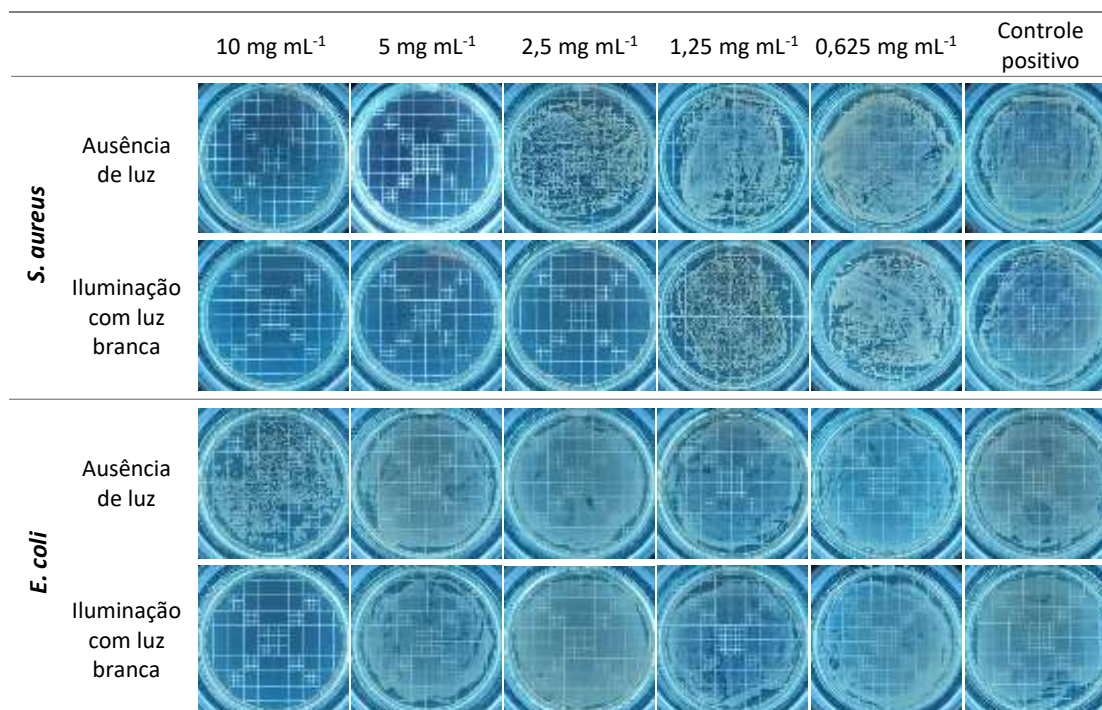
## 5.2 EFEITO DA LUZ NA ATIVIDADE BACTERICIDA DAS PARTÍCULAS DDE COBRE

Após a caracterização das partículas de cobre, foram realizados os ensaios para avaliação da fotoatividade bactericida desses materiais. Todos os ensaios foram reproduzidos, simultaneamente, na ausência de luz e sob iluminação por luz branca.

### 5.2.1 Teste de suscetibilidade bacteriana por Concentração Bactericida Mínima

Para análise da CBM de partículas de cobre, foi realizada a contagem de UFC das placas incubadas em meio semissólido. Quando necessário, foram realizadas diluições seriadas para a viabilização da contagem. A Figura 34 apresenta uma foto das placas semeadas, sem diluição, de um dos ensaios realizados em triplicata, referente à fotoatividade das CuMPs, apresentando uma resposta dose-dependente.

Figura 34 – Fotografias dos ensaios referentes à fotoatividade bactericida das CuMPs sobre *S. aureus* e *E. coli*



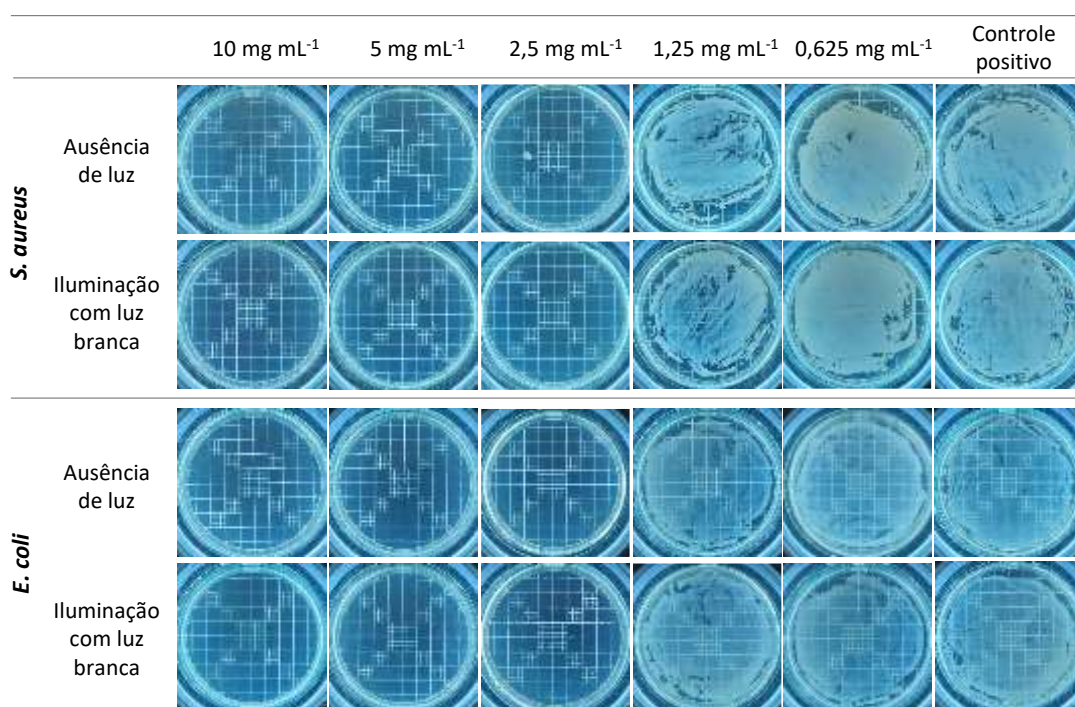
Fonte: a autora.

Para ambos os ensaios com *S. aureus* e com *E. coli*, observou-se a superioridade da ação bactericida das CuMPs quando iluminadas por luz visível (Figura 34). No ensaio com *S. aureus*, a suspensão de partículas com concentração de 2,5 mg mL<sup>-1</sup> promoveu uma redução da carga bacteriana superior a 99,9999% sob iluminação, enquanto na ausência de luz, milhares de colônias foram contabilizadas. Desse modo, a CBM de CuMPs sobre *S. aureus* é de 2,5 mg mL<sup>-1</sup> se iluminadas por luz branca, e de 5 mg mL<sup>-1</sup> quando na ausência de luz.

No ensaio com *E. coli*, observou-se relação semelhante, porém nas amostras com concentração de 10 mg mL<sup>-1</sup>. Apenas nos ensaios cujas amostras foram iluminadas por luz branca essa concentração apresentou ação bactericida significativa. Assim, a CBM de CuMPs sobre *E. coli* é de 10 mg mL<sup>-1</sup> se iluminadas por luz branca. Na ausência de luz, nessa concentração, a redução bacteriana foi de 99,9%. Como 10 mg mL<sup>-1</sup> foi a maior concentração em análise, não foi possível quantificar a CBM para a condição na ausência de luz.

O ensaio de CBM, com as mesmas condições, foi realizado com suspensões de CuNPs. A Figura 35 apresenta uma foto das placas semeadas de cada um dos ensaios realizados em triplicata referente à ação antimicrobiana da amostra CuNPs. Nesse caso, observou-se atividade bactericida satisfatória para ambos os ensaios com *S. aureus* e com *E. coli*, e em ambas as condições de iluminação, na concentração de 2,5 mg mL<sup>-1</sup>. Nenhuma colônia foi observada nessas placas, com exceção das placas referentes ao ensaio na ausência de luz para o teste com *S. aureus*, o qual apresentou 2 colônias. Todavia, tal valor não representa uma diferença significativa em relação aos demais testes. Desse modo, a CBM da amostra CuNPs sobre *S. aureus* e *E. coli* é 2,5 mg mL<sup>-1</sup> para ambas as condições de iluminação, indicando a superioridade do material nanoparticulado, o qual subjugou a influência da iluminação. Assim, além da resposta dose-dependente, observa-se a influência do tamanho de partícula (no inglês, *size-dependent response*) na atividade bactericida do cobre metálico. Isso já era esperado uma vez que o tamanho nanométrico facilita a interação do cobre com a superfície das bactérias, sendo assim, mais reativo. Assim, de modo geral é relatado na literatura que, na nanoescala, os materiais têm propriedades aprimoradas em comparação ao seu *bulk*, devido à maior razão entre área superficial e volume, além do confinamento de elétrons na nanoescala (Bondarenko *et al.*, 2013; Javadhesari *et al.* (2019); Mazurkova *et al.*, 2010; Palza; Quijada; Delgado, 2015). Giannousi *et al.* (2014) também avaliaram a atividade bactericida de nanopartículas à base de cobre e mostraram que as nanopartículas de cobre induzem a degradação do DNA de maneira dose-dependente, tanto em Gram-positivos como em Gram-negativos.

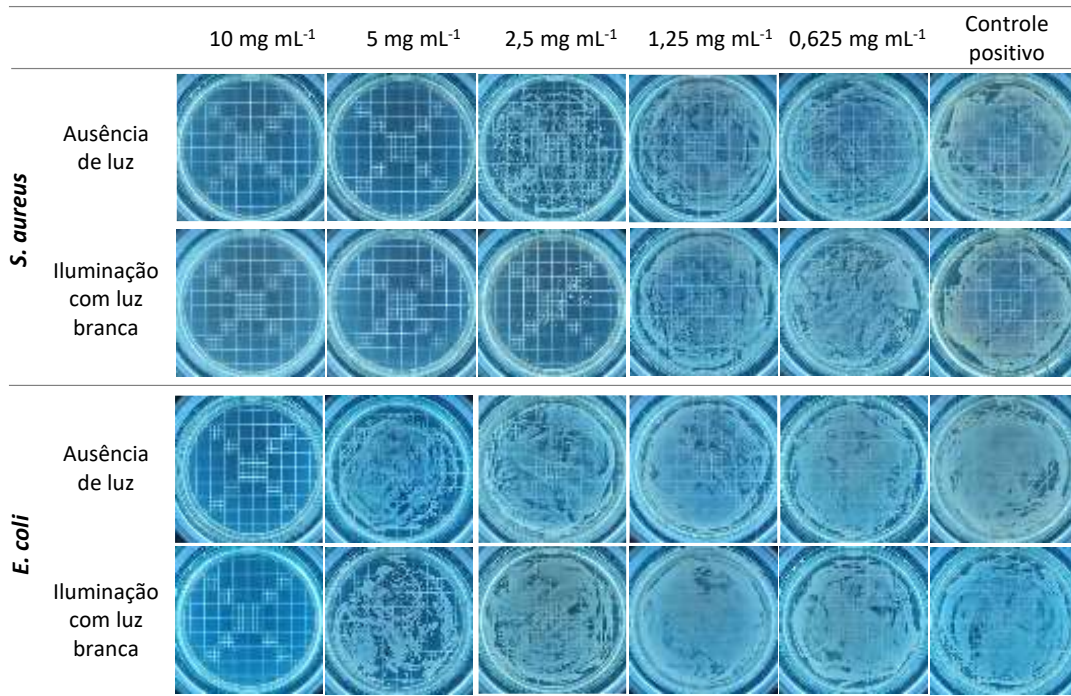
Figura 35 – Fotografias dos ensaios referentes à fotoatividade bactericida das CuNPs sobre *S. aureus* e *E. coli*



Fonte: a autora.

Nos ensaios utilizando as micropartículas de óxido de cobre (I) novas conclusões foram geradas (Figura 36). Sobre *S. aureus*, os resultados foram similares aos encontrados utilizando suspensões de CuMPs. A concentração de 2,5 mg mL<sup>-1</sup> de Cu<sub>2</sub>OMPs reduziu a população bacteriana de *S. aureus* em até 99,9999%, em ambas as condições de iluminação, porém, de modo menos eficiente que as CuMPs, pois ainda houve o crescimento de UFC. Todavia, nos ensaios com *E. coli*, a suspensão de 10 mg mL<sup>-1</sup> de Cu<sub>2</sub>OMPs foi superior que a de CuMPs, promovendo significativa atividade bactericida também no escuro.

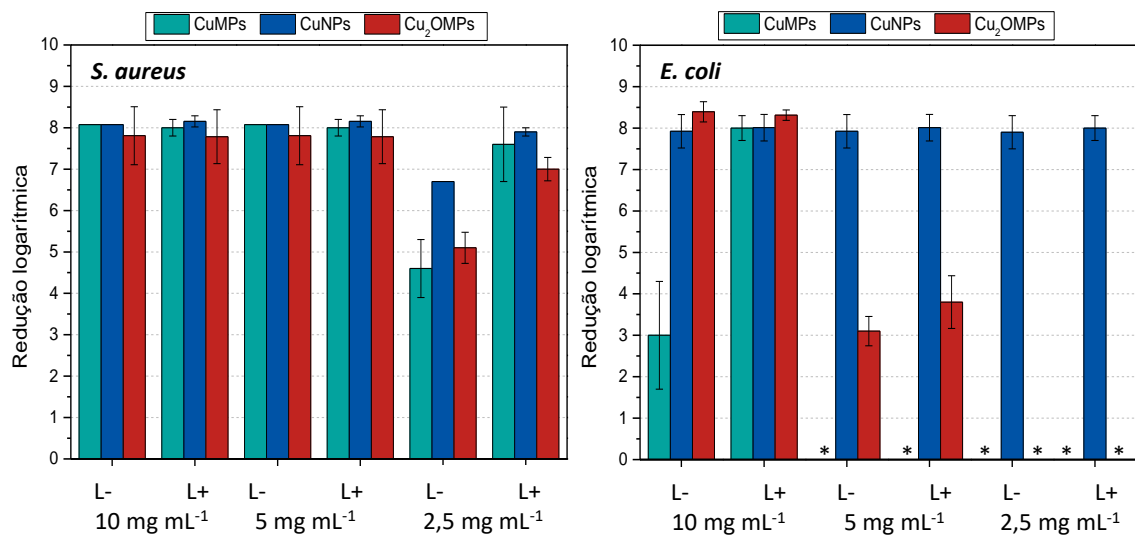
Figura 36 – Fotografias dos ensaios referentes à fotoatividade bactericida de Cu<sub>2</sub>OMPs sobre *S. aureus* e *E. coli*



Fonte: a autora.

A partir da contagem das colônias, foi gerado um gráfico apresentando a redução logarítmica da população microbiana na ausência (L-) e na presença de luz visível (L+). A Figura 37 apresenta os resultados frente à *S. aureus* e *E. coli* utilizando suspensões das partículas nas concentrações de 2,5, 5 e 10 mg mL<sup>-1</sup>.

Figura 37 – Redução logarítmica da população bacteriana de *S. aureus* e *E. coli* frente as partículas de cobre na ausência (L-) e presença de luz (L+)

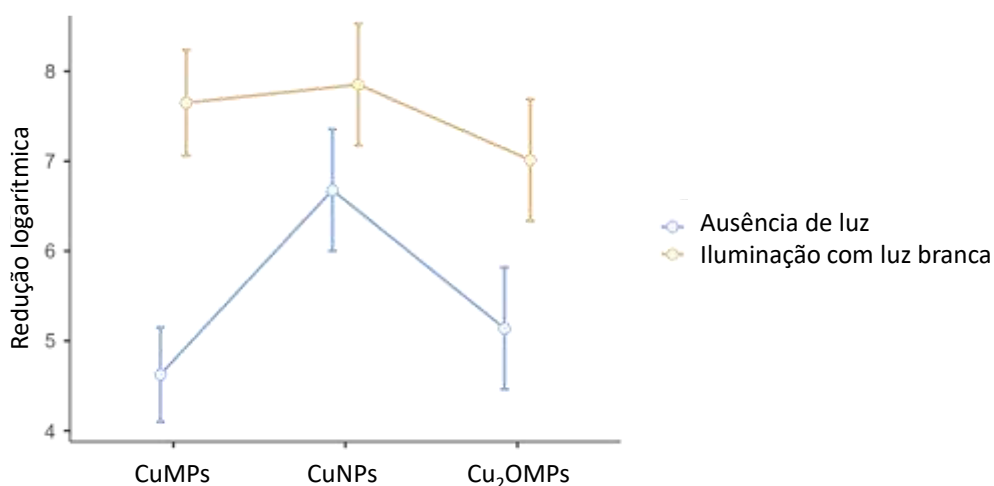


Fonte: a autora.

Verifica-se que, para *S. aureus*, as três partículas em análise apresentaram atividade bactericida satisfatória (acima de 3 log) em todas as concentrações acima de 2,5 mg mL<sup>-1</sup>. Estatisticamente, há diferença significativa tanto entre as partículas ( $p = 0,002$ ) como entre as condições de iluminação ( $p < 0,001$ ), exceto para as CuNPs. Pelo gráfico das médias marginais estimadas (Figura 38), na concentração de 2,5 mg mL<sup>-1</sup>, dentre os 15 casos conclui-se haver diferença estatística na atividade bactericida entre as CuMPs na ausência de luz e as CuNPs em ambas condições de iluminação; entre as CuMPs na ausência de luz e as Cu<sub>2</sub>OMPs sob iluminação (e vice-versa); por fim, entre as CuNPs em ambas condições de iluminação e as Cu<sub>2</sub>OMPs também na ausência de luz.

Em valores de redução logarítmica, é possível inferir que a atividade bactericida, frente à *S. aureus*, das suspensões de 2,5 mg mL<sup>-1</sup> de CuMPs, CuNPs e Cu<sub>2</sub>OMPs foi 66 ( $p < 0,001$ ), 18 ( $p = 0,154$ ) e 37% ( $p = 0,009$ ) superior, respectivamente, quando sob iluminação por luz visível. Nessa concentração, ressalva-se que, particularmente para as micropartículas, quando irradiadas, os resultados não apresentaram diferença estatística aos das CuNPs, logo, a proposta do uso de material microparticulado de cobre como agente bactericida ganha força, principalmente quando vinculado ao fator econômico, uma vez CuMPs custam até 3000 vezes menos do que CuNPs.<sup>1</sup>

Figura 38 – Médias marginais estimadas dos ensaios bactericidas contra *S. aureus* utilizando suspensão de 2,5 mg mL<sup>-1</sup> de partículas de cobre



Fonte: a autora.

<sup>1</sup> Estimativa realizada com base no custo dos materiais em questão, ofertados pela Merck, fornecedora global líder para o setor de ciências biológicas (Disponível em <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt>. Acesso em 21 de julho de 2024).



Para *E. coli*, houve maiores diferenças entre a atividade bactericida das partículas. Somente as suspensões de CuNPs promoveram a redução da carga bacteriana nas três concentrações  $\geq 2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ . Estatisticamente, apenas a suspensão de  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  de CuMPs apresentou diferença significativa entre as condições de iluminação ( $p < 0,001$ ), indicando uma redução logarítmica 167% superior quando sob iluminação por luz visível. A suspensão de Cu<sub>2</sub>OMPs na concentração de  $5 \text{ mg mL}^{-1}$  também apresentou diferença, embora não significativa, pois promoveu uma redução logarítmica de 3,1 e 3,8 na ausência e na presença de luz, respectivamente. Tal atividade foi superior à da CuMPs, comportamento já relatado na literatura e justificado pela rápida e fácil liberação de íons  $\text{Cu}^{2+}$  do Cu<sub>2</sub>O, os quais se sobressaem sobre os  $\text{Cu}^+$  em questão de toxicidade (Chalayan; Tangwongsan, 2021; Palza; Quijada; Delgado, 2015).

Esses resultados comprovam o mecanismo de ação fotocatalítico das micropartículas no combate a microrganismos. Ademais, frente a ambas as bactérias, nos ensaios conduzidos com iluminação as micropartículas apresentaram resultados competitivos em relação às CuNPs. Tais resultados são importantes para o ramo de pesquisas de materiais, pois o uso generalizado de nanopartículas tem sido tema de diversos debates, uma vez que o descarte e a lixiviação delas podem representar uma ameaça a organismos "não-alvo", como organismos aquáticos, além da sua relativa difícil recuperação (Bondarenko *et al.*, 2013; Mihut *et al.*, 2019; Reina *et al.*, 2020). Ainda, devido à alta reatividade, a aglomeração das nanopartículas em solução é inevitável, o que, reduz sua área de contato e, conseqüentemente, sua atividade biocida. Tais desvantagens são fatores que incentivam a imobilização de NPs em matrizes poliméricas (Jana *et al.*, 2021; Kociołek-Balawejder *et al.*, 2019). Ainda, segundo Reina *et al.* (2020), uma vantagem do uso de micropartículas metálicas também consiste na lenta liberação dos íons metálicos, levando a uma atividade biocida constante e de maior durabilidade.

Os resultados também indicam que a *E. coli* apresentou maior resistência ao cobre metálico em comparação à *S. aureus*, o que já foi citado por outros autores e justificado pelas suas morfologias. Como Gram-negativa, a parede celular da *E. coli* é composta por uma camada relativamente estreita de peptidoglicano, porém, com uma membrana externa com lipopolissacarídeos, resultando em uma estrutura mais complexa e semirrígida comparada às Gram-positivas cuja espessura da membrana é até 10 vezes menor (Pulit-Prociak *et al.*, 2020; Tortora; Finke; Case, 2019; Tranquillo; Bollino, 2020). Por isso, Palza, Quijada e Delgado (2015) alegam ocorrer a diminuição do fluxo dos íons, o que, conseqüentemente, diminui a atividade biocida. Desse modo, observando que a *E. coli* se mostrou mais resistente

nos ensaios conduzidos na ausência de luz, concebe-se a ideia de que o cobre microparticulado age sobre a camada de peptidoglicano, porque uma vez que a *E. coli* possui essa camada “escondida” sob uma membrana lipídica externa, o alcance é dificultado, enquanto as paredes celulares Gram-positivas deixam o peptidoglicano exposto (Li *et al.*, 2013; Palza; Quijada; Delgado, 2015; Parra-Ortiz; Malmsten, 2022). Pulit-Prociak *et al.* (2020) citam diversos trabalhos que, observando o mesmo comportamento, verificaram a necessidade de maiores concentrações de agente biocida para enfrentar bactérias Gram-negativas, em comparação com as Gram-positivas.

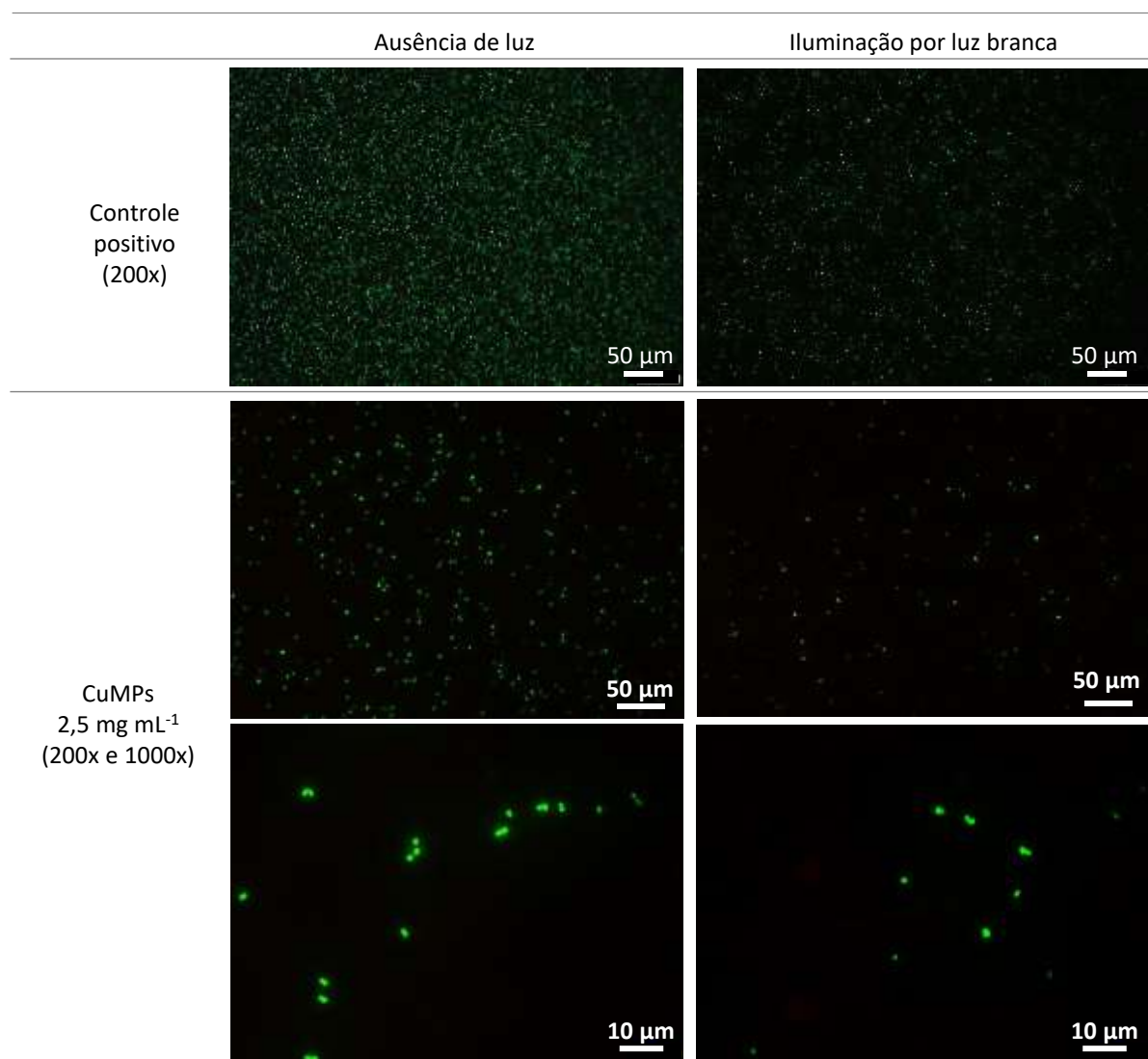
Utilizando o mesmo método de contagem de colônias, o trabalho de Ma *et al.* (2022) avaliou a fotoatividade bactericida de CuNPs em fulerenol na concentração de 1 mg mL<sup>-1</sup>. Na ausência de luz, o compósito não apresentou efeito bactericida satisfatório contra *S. aureus* ou *E. coli* (abaixo de 66% de eficácia). Com irradiação de luz com comprimento de onda de 660 nm, a inibição subiu para 98,1% e 97,6% contra *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente. Todavia, em escala logarítmica, mais usual para essas análises, esses valores encontram-se abaixo de 2 log, também sendo considerados insatisfatórios.

### **5.2.2 Viabilidade por contagem de células bacterianas utilizando kit LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability**

A partir dos resultados obtidos nos ensaios de MBC, a análise da viabilidade por contagem de células foi realizada para as amostras específicas. Primeiro, realizou-se das suspensões de CuMPs nas concentrações de 2,5 mg mL<sup>-1</sup> e 10 mg mL<sup>-1</sup> sobre *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente; e em seguida, das suspensões de Cu<sub>2</sub>OMPs nas concentrações de 2,5 mg mL<sup>-1</sup> e 5 mg mL<sup>-1</sup> sobre *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente. Os resultados observados por microscopia de fluorescência corroboraram os referentes à fotoatividade bactericida das amostras observados no ensaio MBC.

A Figura 39 apresenta as micrografias obtidas por microscopia de fluorescência referentes ao ensaio com *S. aureus*. As alíquotas foram preparadas a partir das cavidades cuja concentração de partículas era de 2,5 mg mL<sup>-1</sup> (CBM). Assim, pelas imagens obtidas com magnificação de 200x foi possível confirmar a atividade bactericida do material, bem como a superioridade dessa ação quando as partículas são iluminadas por luz branca, ou seja, pelo processo fotocatalítico.

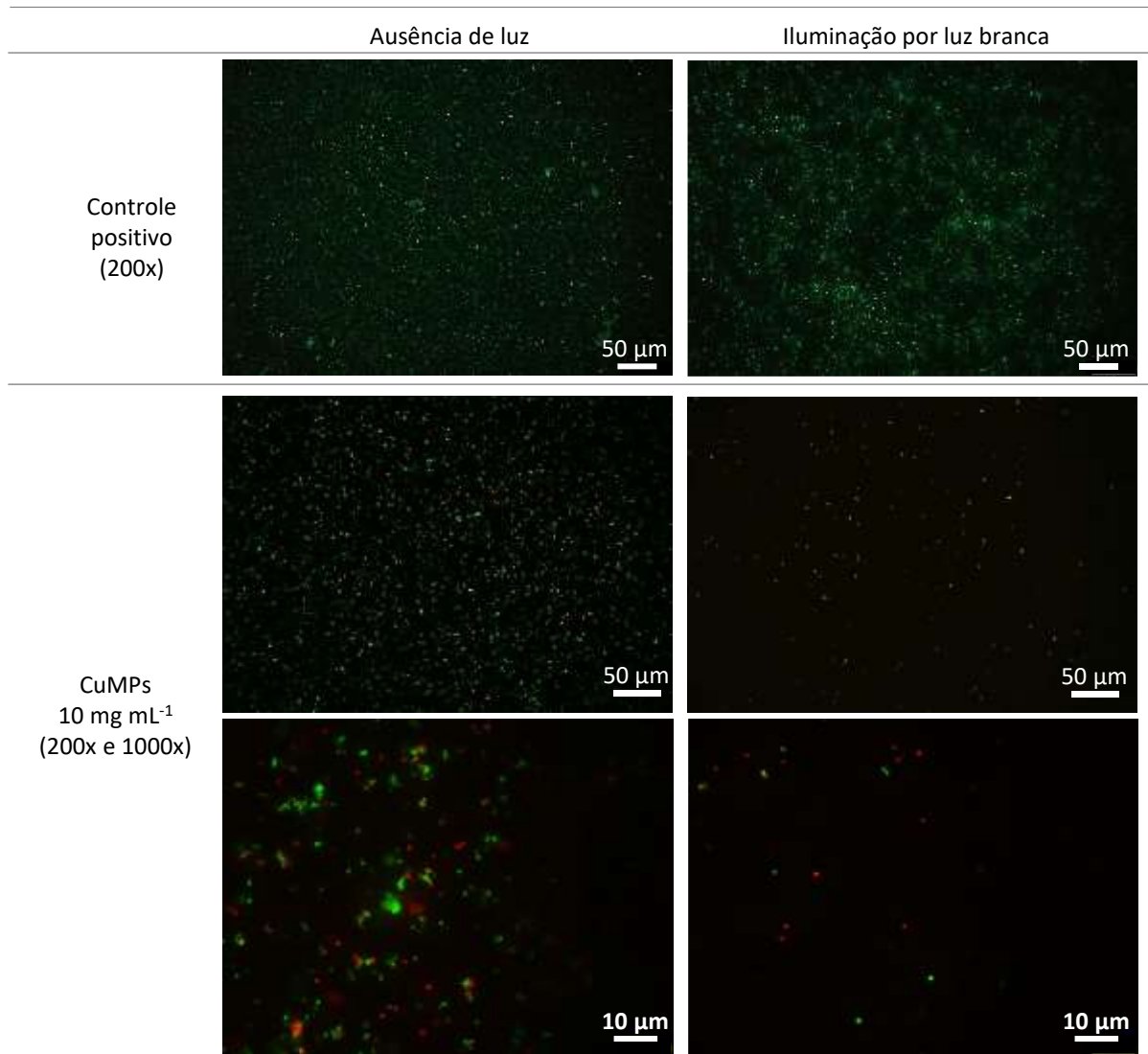
Figura 39 – Micrografias observadas por microscopia de fluorescência com aumentos de 200 e 1000x dos ensaios com *S. aureus* usando suspensões de  $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$  de CuMPs na ausência de luz e sob iluminação de luz visível



Fonte: a autora.

A Figura 40 apresenta as micrografias obtidas por microscopia de fluorescência referentes ao ensaio com *E. coli*. As alíquotas foram preparadas a partir das cavidades cuja concentração de partículas era de  $10 \text{ mg mL}^{-1}$ . Assim, pelas micrografias com magnificação de 200x também foi possível confirmar a superioridade da atividade bactericida do material quando iluminado por luz branca.

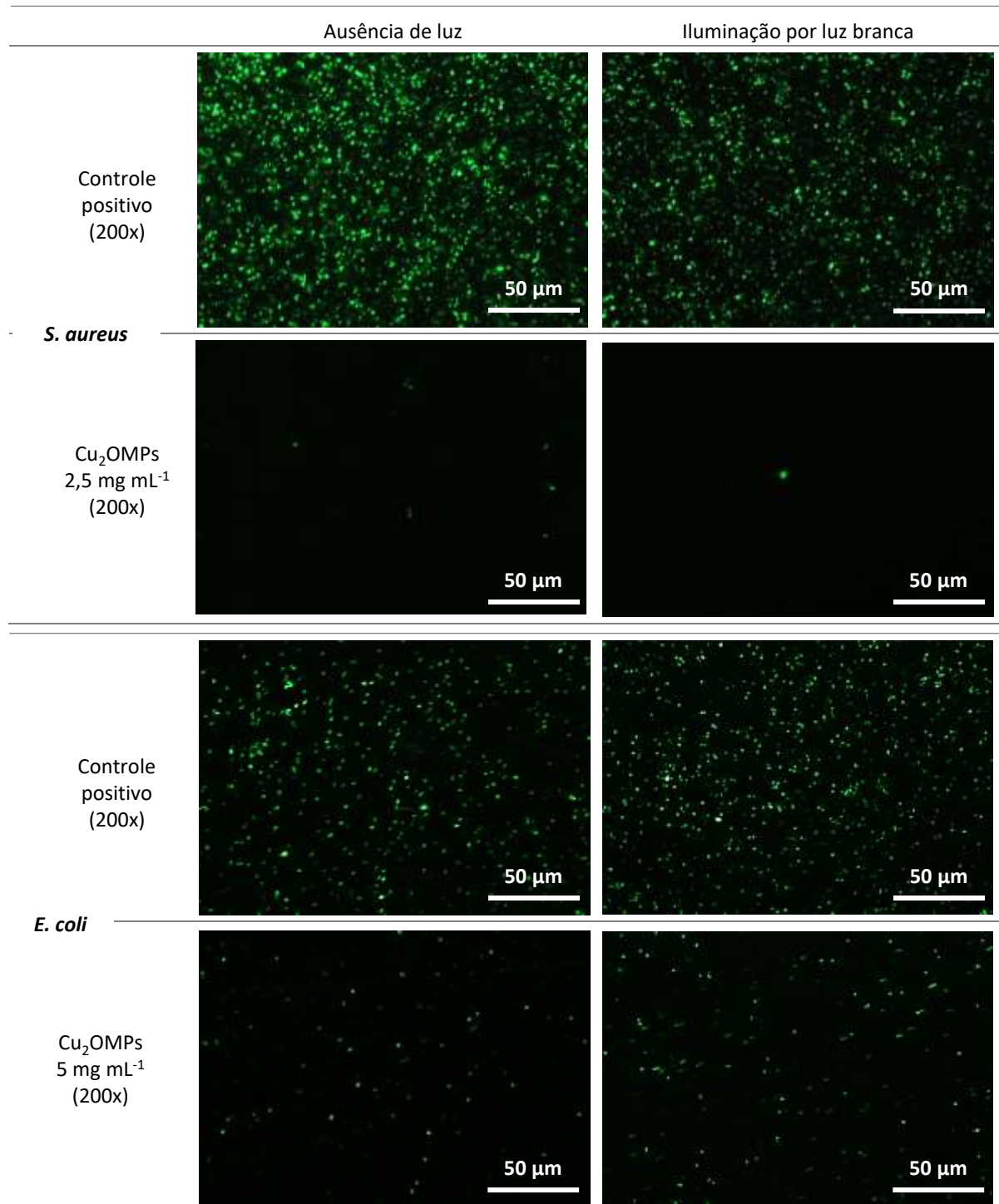
Figura 40 – Micrografias observadas por microscopia de fluorescência com aumentos de 200 e 1000x dos ensaios com *E. coli* usando suspensões de  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  de CuMPs na ausência de luz e sob iluminação de luz visível



Fonte: a autora.

A Figura 41 apresenta as micrografias obtidas por microscopia de fluorescência referentes ao ensaio com *S. aureus* e *E. coli* com suspensão de partículas de  $\text{Cu}_2\text{OMP}$ s de 2,5 e  $5 \text{ mg mL}^{-1}$ , respectivamente.

Figura 41 – Micrografias observadas por microscopia de fluorescência com aumentos de 200x dos ensaios com *S. aureus* e *E. coli* usando suspensões de 2,5 e 5 mg mL<sup>-1</sup> de Cu<sub>2</sub>OMPs, respectivamente, na ausência de luz e sob iluminação de luz visível

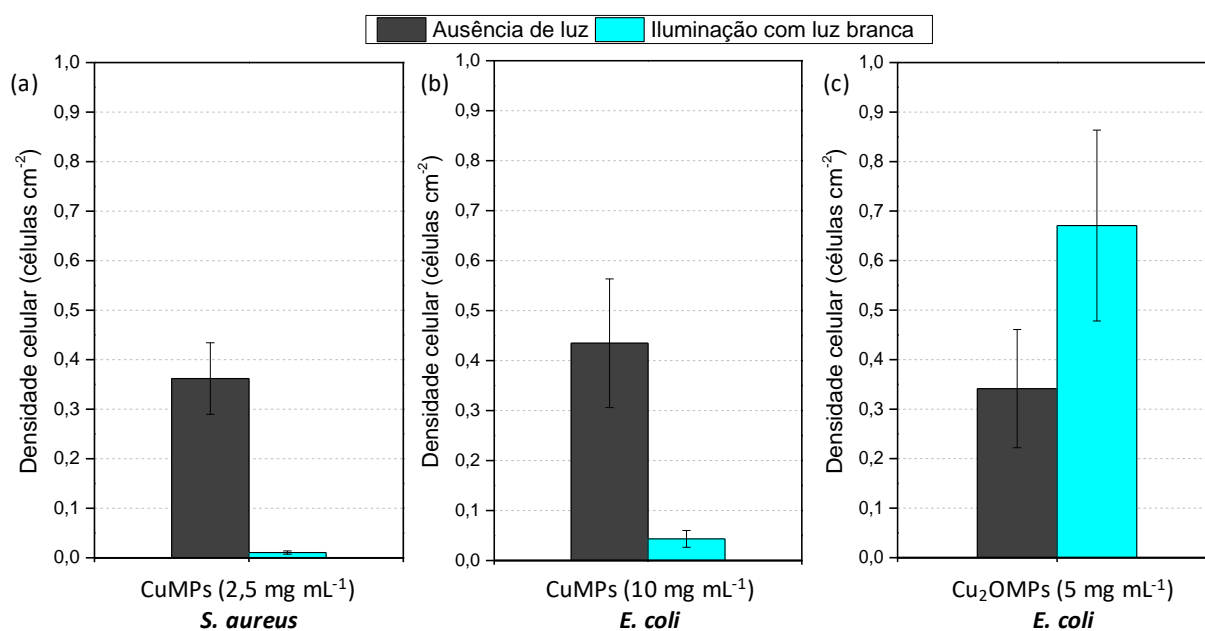


Fonte: a autora.

A partir de três dessas micrografias de fluorescência, como o auxílio do *software* ImageJ, as bactérias vivas foram contabilizadas, uma vez que poucas células mortas puderam ser visualizadas. Aplicando uma conversão de unidades, foi calculada a densidade

celular das amostras, conforme apresentado na Figura 42. Observa-se que, para ambas as bactérias testadas, os ensaios com CuMPs na ausência de luz apresentaram maior densidade celular, ou seja, uma menor atividade bactericida. Para os ensaios com *S. aureus* na presença de luz, a densidade celular diminuiu 90% em relação aos no escuro, enquanto para a *E. coli* o decréscimo foi de 90%. Tais resultados são novamente corroborados pelos demais já apresentados nos ensaios de MBC. Quanto à suspensão de Cu<sub>2</sub>OMPs frente à *E. coli*, embora a redução em log da população bacteriana tenha sido superior da luz em relação ao escuro, neste ensaio verificou-se maior densidade celular, justificado pela falta de diferença estatística significativa verificada anteriormente.

Figura 42 – Densidade celular das amostras submetidas à incubação na ausência de luz e sob iluminação de luz visível com CuMPs para *S. aureus* (a) e *E. coli* (b) e Cu<sub>2</sub>OMPs para *E. coli* (c)



Fonte: a autora.

A concentração de 2,5 mg mL<sup>-1</sup> é relativamente alta quando comparada com estudos que, trabalhando com um material com tamanho médio abaixo de 50 nm, alcançam uma atividade bactericida de CuONPs e/ou Cu-TiO<sub>2</sub>NPs em concentrações de até 200 µg mL<sup>-1</sup> (Azam *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2012; Hajipour *et al.*, 2021). Em contrapartida, há estudos que, mesmo como materiais nanométricos, a CIM, para as mesmas bactérias, é superior. No trabalho de Javadhesari *et al.* (2019), a concentração mínima inibitória de nanopartículas de óxido de cobre (II), sobre *E. coli* e *S. aureus* foram 3,75 e 2,50 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

Pajares-Chamorro *et al.* (2019) trabalharam com micropartículas cerâmicas dopadas com prata e, nos ensaios sobre MRSA, a CIM foi de 2,5 mg mL<sup>-1</sup>. Zhong *et al.* (2020) trabalharam com concentrações ainda mais elevadas, de 20 a 200 mg mL<sup>-1</sup> de microesferas de quitosana dopadas com nanopartículas de óxido de zinco para provar a atividade do material.

Assim, a partir desses resultados, é possível inferir sobre as propriedades fotocatalíticas da amostra CuMPs. A maior atividade bactericida quando submetida à iluminação, representa a ação fotocatalítica do material pelo possível aumento da geração de ROS, o qual foi avaliado na sequência.

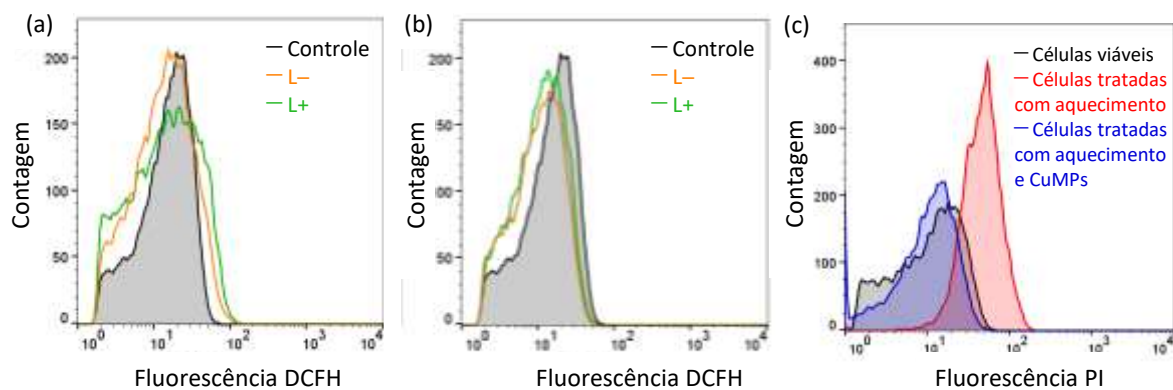
### 5.2.3 Concentração dos íons de cobre liberados e da geração de ROS

Pelos resultados da AAS constatou-se que a liberação de íons cobre da suspensão de CuMPs na concentração de 2,5 mg mL<sup>-1</sup> passou de 12,3 para 13,20 mg Cu L<sup>-1</sup>, quando foram realizados os ensaios sob iluminação com luz visível, um aumento de 7,7% na liberação de íons. Ao aumentar a concentração para 10 mg mL<sup>-1</sup> houve um aumento na liberação de íons cobre superior a 54% quando a solução era irradiada por luz visível. A quantidade de cobre dos ensaios no escuro foi de 78,95 mg Cu L<sup>-1</sup>, mas atingiu 122,1 mg Cu L<sup>-1</sup> quando sob iluminação. Isso significa que, ao aumentar quatro vezes a concentração das suspensões de CuMPs, houve um aumento de quase dez vezes na liberação de íons. Nos ensaios com suspensão de Cu<sub>2</sub>OMPs na concentração de 2,5 mg mL<sup>-1</sup> identificou-se um aumento de 31% na liberação de íons nos ensaios conduzidos sob iluminação (66,1 mg Cu L<sup>-1</sup>) em comparação com os ensaios na ausência de luz. Já no ensaio com CuNPs a 2,5 mg mL<sup>-1</sup>, foi medido um aumento de 7,8% de liberação de íons nos ensaios realizados sob iluminação em comparação aos conduzidos no escuro.

Por fim, foi realizada a citometria de fluxo, mas não foi observada diferença entre as células de controle e as células tratadas com CuMPs ou com CuNPs, uma vez que ambas apresentaram a mesma fluorescência (Figura 43a,b). Para avaliar a possível causa da ausência dos íons de cobre, células de *E. coli* não tratadas (viáveis), tratadas com aquecimento por 10 minutos, e tratadas com calor seguido da adição de uma suspensão de CuMPs na concentração de 2,5 mg mL<sup>-1</sup>, foram coradas com iodeto de propídio (PI) e avaliadas por citometria de fluxo. Observou-se que as células tratadas apenas termicamente apresentaram alta intensidade de fluorescência, indicando alto número de células mortas, enquanto as tratadas por

calor e partículas de cobre apresentaram a mesma baixa intensidade de fluorescência das células viáveis (Figura 43c). Esses resultados confirmam o efeito de “sequestro” das ROS pelos íons de cobre uma vez que ambas as células tratadas estão mortas, logo, deveriam apresentar alta fluorescência de PI. Tal comportamento já foi relatado na literatura (Liu; Wang; Han, 2017; Weaver *et al.*, 2010) e justifica a baixa observação de células mortas por fluorescência no ensaio precitado.

Figura 43 – Gráficos de citometria de fluxo de acúmulo intracelular de ROS utilizando CuMPs (a) e CuNPs (b). Gráfico de citometria de fluxo da viabilidade de células de *E. coli* com e sem tratamento (c)



Fonte: a autora.

### 5.3 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES COMPÓSITOS

A partir de diferentes ensaios com avaliação visual, definiu-se por utilizar a concentração de 5% de PVA, uma vez que o filme com 2% m/v se mostrou de difícil manuseio devido a alta aderência a si mesmo, enquanto o de 10% apresentou-se opaco, o que não é interessante diante da proposta do trabalho que busca observar a influência da luz, sendo mister o uso de uma matriz transparente e translúcida. Com essa definição, foram preparados os filmes compósitos com diferentes concentrações de partículas de CuMPs incorporadas na matriz polimérica para aplicação no ensaio bactericida.

Aplicando a metodologia descrita no tópico 4.6 para observar a atividade bactericida dos filmes compósitos, verificou-se que, para o período de incubação de 24 horas, os três filmes compósitos de CuMPs (concentrações de 2, 4 e 6% m/v) apresentaram atividade bactericida similar frente à *S. aureus*, promovendo uma desinfecção acima 8 log. Sendo assim, as concentrações de 4 e 6% m/v de material particulado foram descartadas para os próximos testes



e preparou-se os filmes compósitos PVA-CuNPs e PVA-Cu<sub>2</sub>OMPs na concentração de 2% m/v. A Tabela 5 apresenta a denominação dos filmes compósitos obtidos. Filmes de PVA puro, na concentração de 5%, também foram utilizados nos ensaios como branco.

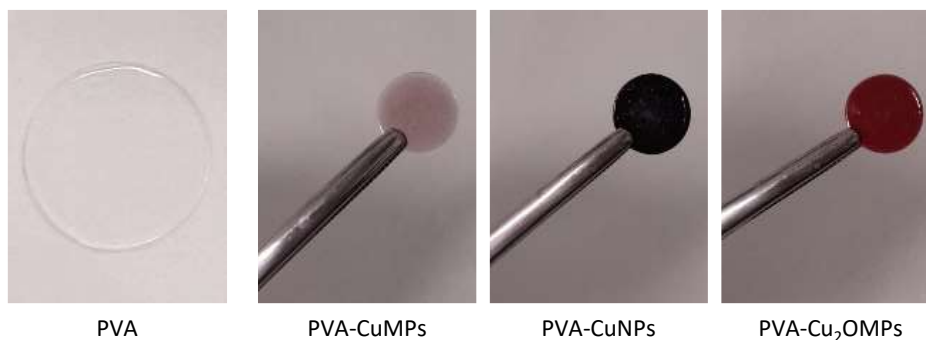
Tabela 5 – Descrição dos filmes compósitos obtidos por *drop casting*

Matriz polimérica	Concentração (% m/v)	Partículas incorporadas	Concentração (% m/v)	Filme compósito
PVA	5	CuMPs	2	PVA- CuMPs
PVA	5	CuNPs	2	PVA-CuNPs
PVA	5	Cu <sub>2</sub> OMPs	2	PVA-Cu <sub>2</sub> OMPs

Fonte: a autora.

A Figura 44 apresenta uma fotografia dos filmes de PVA 5% puro (PVA), e dos filmes PVA-CuMPs, PVA-CuNPs e PVA-Cu<sub>2</sub>OMPs depositados sobre lamínulas de vidro circulares de 13 mm de diâmetro.

Figura 44 – Foto das lamínulas de vidro com filme PVA 5% puro (PVA) e dos filmes compósitos com 2% m/v de partículas incorporadas



Fonte: a autora.

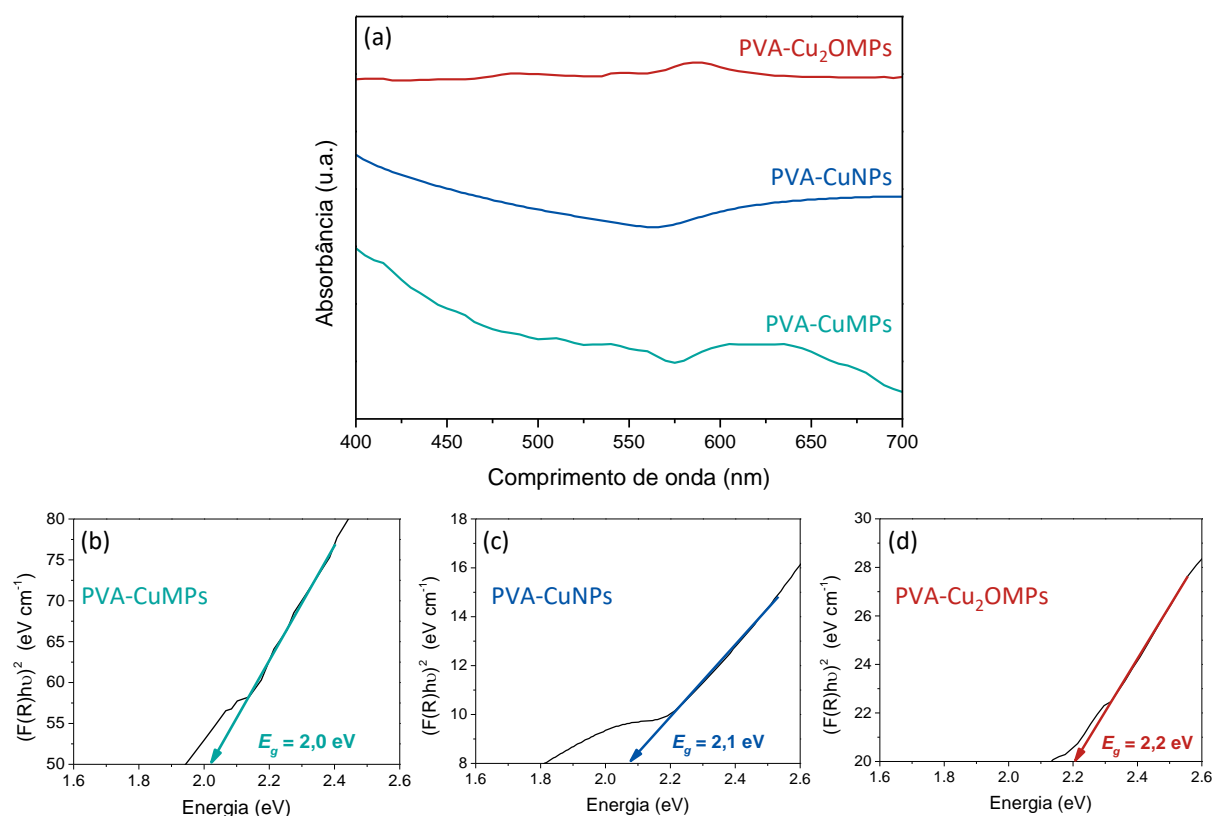
Muitos trabalhos que reportam a atividade bactericida e virucida de filmes compósitos de cobre apresentam concentrações variando entre 1 e 20% m/v. Kociołek-Balawejder *et al.* (2019) trataram 1 mL de cultura bacteriana na concentração de  $10^5$  UFC mL<sup>-1</sup> com 64 mg de uma resina de poliestireno dopada com micropartículas de Cu<sub>2</sub>O para obter redução significativa da carga bacteriana de *Enterococcus faecalis* (bactéria Gram-positiva do sistema digestivo de mamíferos). Ribeiro *et al.* (2019) incorporaram micropartículas cobre sobre estireno-etileno-butileno-estireno (SEBS), um elastômero termoplástico, nas concentrações 1, 2 e 4% m/v por extrusão. Nos ensaios contra *S. aureus* e *E. coli* verificou-se a redução

logarítmica da população bacteriana variando entre 3,8 e 4,4 log, respectivamente. Behzadinasab *et al.* (2020) partiram de uma concentração de 10% de  $\text{Cu}_2\text{O}$  para deposição sobre o PU para obter atividade virucida contra o SARS-CoV-2. Demais trabalhos podem ser conhecidos pelos trabalhos de revisão de Bagueri *et al.* (2023), Balasubramaniam *et al.* (2021) e Soni *et al.* (2022), os quais apresentam diversas pesquisas de materiais compósitos com propriedades bactericidas e virucidas.

### 5.3.1 Caracterização dos filmes compósitos por espectroscopia UV-Vis

A partir da técnica gráfica de Tauc sobre os gráficos de absorção obtidos por UV-Vis, foi obtida a banda proibida dos filmes compósitos. Utilizando o filme de PVA puro como branco, as bandas proibidas dos filmes PVA-CuMPs, PVA-CuNPs e PVA-Cu<sub>2</sub>OMPs foram definidas em 2,0, 2,1 e 2,2 eV (Figura 45). Esses valores são próximos aos das próprias partículas, logo, os filmes mantiveram tal propriedade promissora para a promoção de fotoatividade bactericida e virucida aguçadas por iluminação na faixa do visível.

Figura 45 – Espectros de absorção (a) e gráficos de Tauc dos filmes PVA-CuMPs (b), PVA-CuNPs (c) e PVA-Cu<sub>2</sub>OMPs (d)

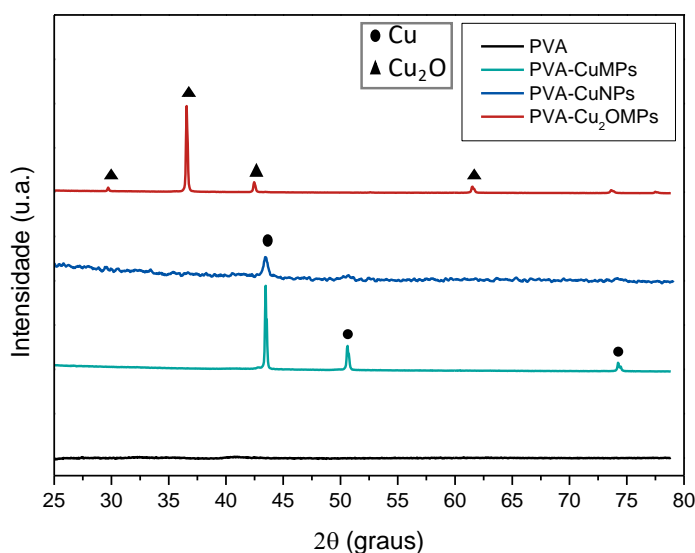


Fonte: a autora.

### 5.3.2 Difratomogramas de DRX e espectros de FTIR dos filmes compósitos

Os difratogramas de DRX dos filmes compósitos (Figura 46), apresentaram os mesmos picos de difração referentes às partículas de cobre puras, uma vez que o PVA é um material amorfo. Nenhuma outra fase e/ou contaminação foi observada. Observa-se, contudo, que no difratograma do filme PVA-CuNPs dois picos referentes à fase metálica do cobre foram suprimidos. Essa característica ocorre devido à nanoescala das partículas, a qual promove a obtenção de picos de DRX mais largos do que na escala micrométrica devido ao tamanho reduzido dos cristalitos, o que se torna ainda mais evidente após o processo de normalização do sinal.

Figura 46 – Difratomogramas obtidos por DRX dos filmes compósitos

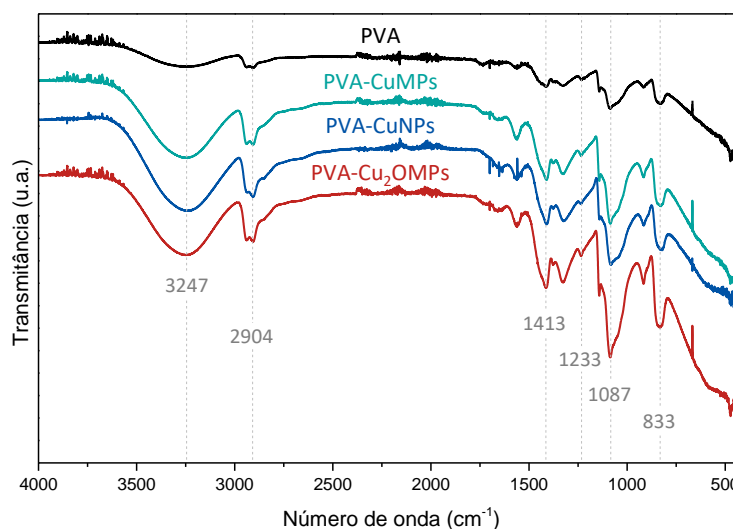


Fonte: a autora.

De acordo com o espectro obtido por ATR-FTIR (Figura 47), poucas mudanças são observadas diante da adição das partículas de Cu e de Cu<sub>2</sub>O, pois o FTIR detecta principalmente modos vibracionais associados a ligações covalentes e algumas ligações iônicas em vez de ligações metálicas, as quais se encontram entre 400 e 600 cm<sup>-1</sup>. Desse modo, as principais bandas observadas, em todos os espectros, referem-se majoritariamente ao PVA. A banda de absorção observada em 3247 cm<sup>-1</sup> é característica das vibrações de estiramento da ligação O–H, enquanto as em 2940 e 2904 cm<sup>-1</sup> referem-se ao estiramento assimétrico e simétrico do CH<sub>2</sub>, respectivamente. As bandas em 1413 e 1325 cm<sup>-1</sup> são referentes às vibrações de

estiramento angular do CH<sub>2</sub>. A banda em 1233 cm<sup>-1</sup> pode ser caracterizada pela vibração de estiramento da ligação C–O. Por fim, as bandas observadas em 916 e 833 cm<sup>-1</sup> são atribuídas às vibrações de deformação angular do CH<sub>2</sub>. A banda em 1660 cm<sup>-1</sup> indica a água adsorvida no filme por umidade (Alsaad *et al.*, 2021; Lemraski *et al.*, 2021; Pulit-Prociak *et al.*, 2020).

Figura 47 – Espectros obtidos por ATR-FTIR dos filmes compósitos

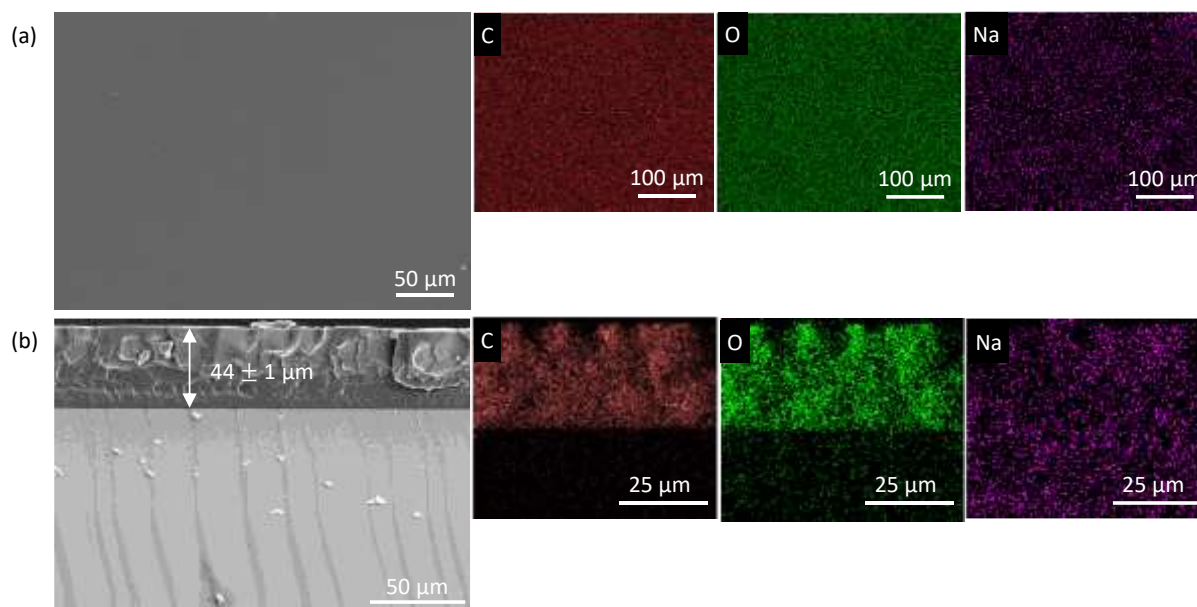


Fonte: a autora.

### 5.3.3 Micrografias das seções longitudinais e transversais dos filmes compósitos seguidas de análise por EDS

As micrografias obtidas por MEV (seções longitudinal e transversal) e os respectivos mapas de distribuição de elementos dos filmes compósitos são apresentados a seguir. Para a seção transversal, os filmes foram clivados sob nitrogênio líquido. O filme PVA puro na concentração de 5% m/v (Figura 48) apresentou uniformidade superficial com composição elementar composta majoritariamente por carbono e oxigênio, mas também sódio (Na), possivelmente presente como residual do processo de produção do PVA. A espessura média do filme é de  $44 \pm 1 \mu\text{m}$ .

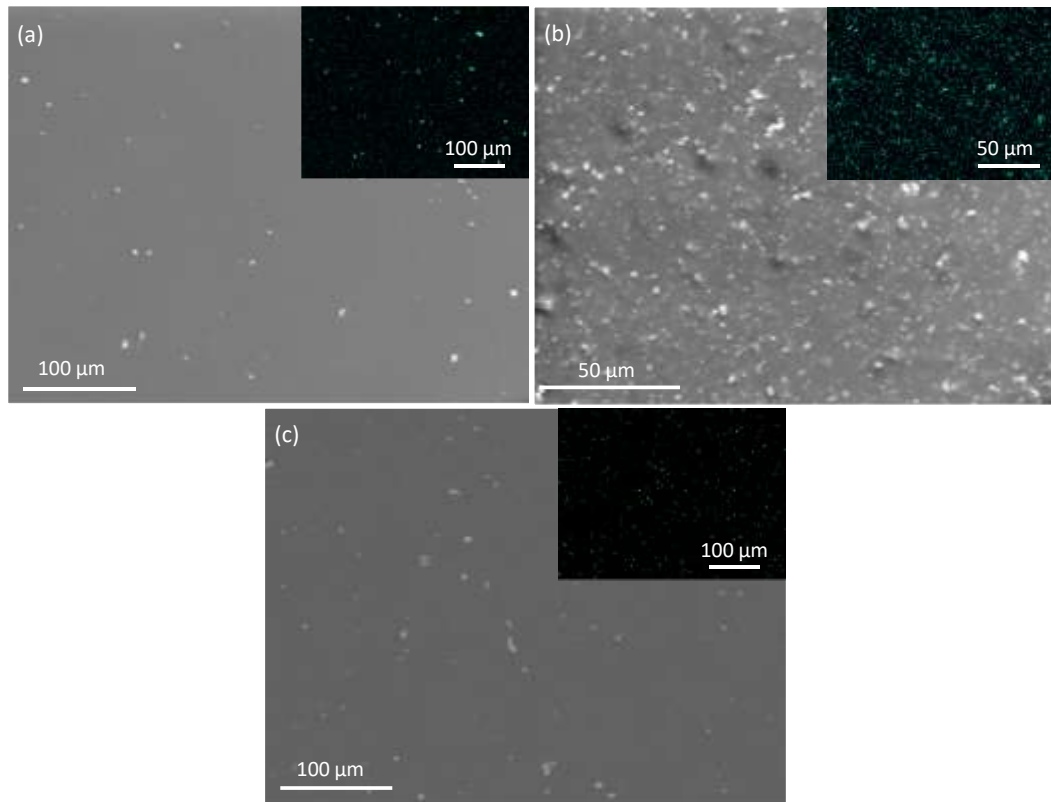
Figura 48 – Micrografias e mapas de distribuição de elementos do filme de PVA puro na seção longitudinal (a) e na seção transversal (b)



Fonte: a autora.

Os filmes compósitos (Figura 49) perderam a uniformidade diante da incorporação das partículas, a qual teve sua presença confirmada ao longo do filme, junto do carbono, oxigênio e sódio da matriz polimérica. As micrografias da seção longitudinal dos filmes de PVA-CuMPs (Figura 49a) e PVA-Cu<sub>2</sub>OMPs (Figura 49c) apresentam partículas dispersas na superfície, enquanto os mapas EDS mostraram a presença de cobre ao longo de toda a área da superfície. Essa diferença se deve ao fato de que a análise EDS não é apenas superficial, porque o feixe de elétrons pode penetrar até ~1 μm na amostra, capturando sinais de partículas de cobre que estão sob a matriz polimérica. Quanto ao filme PVA-CuNPs (Figura 49b), uma quantidade consideravelmente maior de partículas de cobre pode ser observada em sua superfície tanto na micrografia quanto no mapa EDS. As nanopartículas têm uma relação superfície-volume significativamente maior quando comparadas às micropartículas, o que as torna mais suscetíveis a interações com o meio de dispersão, minimizando a taxa de sedimentação. Esses fatores favoreceram a maior dispersão das nanopartículas ao longo do processo de obtenção do filme compósito PVA-CuNPs (JAVADHESARI *et al.*, 2019; MAJUMDAR *et al.*, 2019).

Figura 49 – Micrografias da seção longitudinal dos filmes compósitos com CuMPs (a), CuNPs (b) e Cu<sub>2</sub>OMPs (c) e seus respectivos mapas de distribuição de cobre obtidos por EDS (*inset*)

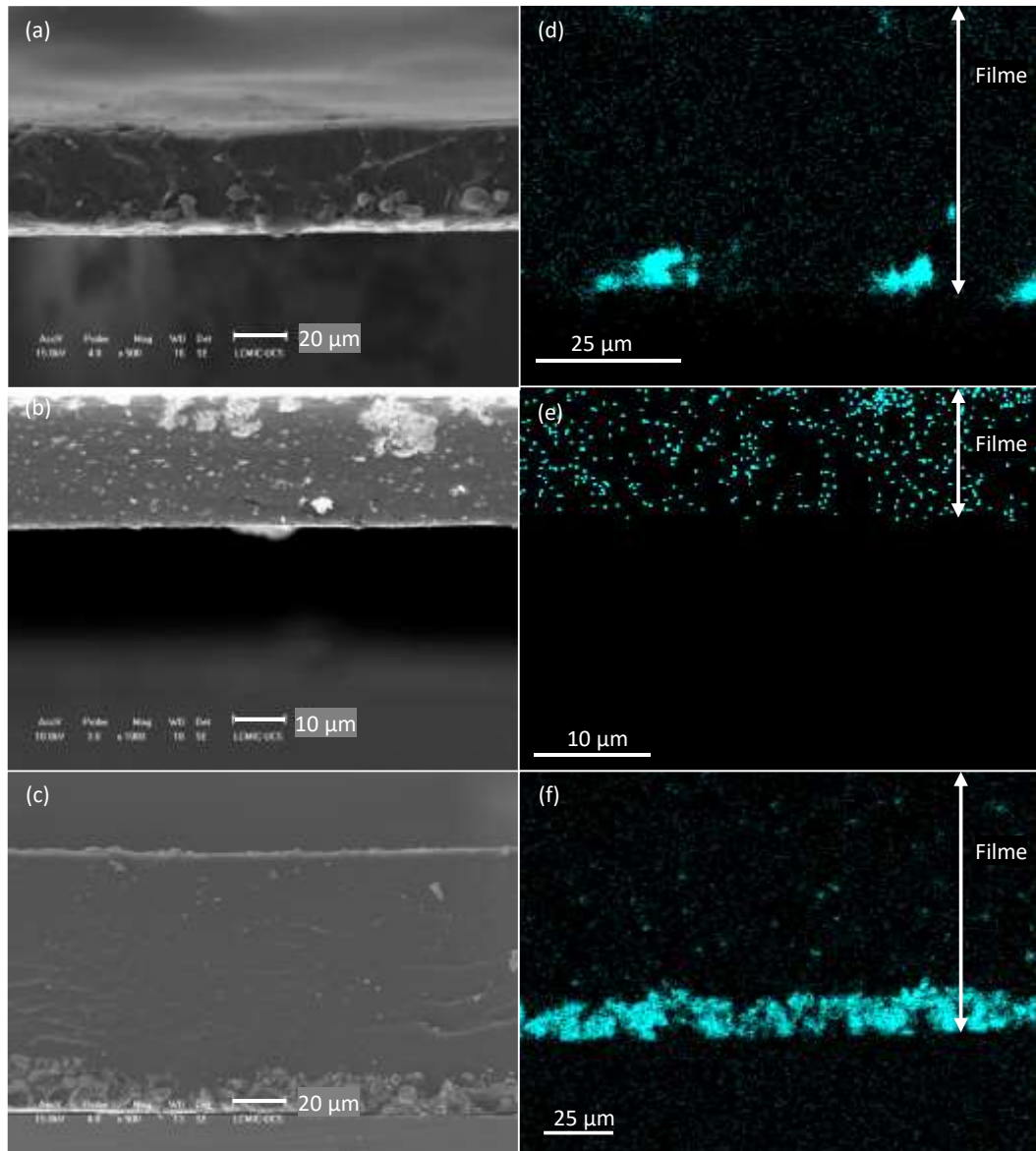


Fonte: a autora.

A Figura 50 apresenta imagens de MEV da seção transversal dos filmes compósitos, PVA-CuMPs (a), PVA-CuNPs (b) e PVA-Cu<sub>2</sub>OMPs (c) e os mapas de distribuição de cobre obtidos por EDS, PVA-CuMPs (d), PVA-CuNPs (e) e PVA-Cu<sub>2</sub>OMPs (f), de outra área dos filmes, pois, como um material orgânico, o feixe de elétrons utilizado no MEV causa aquecimento e degradação química da matriz de PVA, distorcendo a área sob análise. Em relação ao filme de PVA-CuMPs (Figura 50a,d), apesar de partículas dispersas serem confirmadas ao longo da espessura, também é observada a presença de micropartículas aglomeradas na base do filme, indicando possível decantação do material, o que é evidenciado também no filme de PVA-Cu<sub>2</sub>OMPs (Figura 50c,f) e confirmado pelos mapas de distribuição de cobre. A micrografia do filme PVA-CuNPs (Figura 50b,e) indica, novamente, melhor distribuição das partículas, embora ainda seja observado um possível acúmulo delas, desta vez no topo do filme, uma vez que o tamanho nanométrico das partículas induz uma suspensão mais homogênea do que aquelas com micropartículas.

A espessura média dos filmes PVA-CuMPs, PVA-CuNPs e PVA-Cu<sub>2</sub>OMPs é de  $49 \pm 5 \mu\text{m}$ ,  $28 \pm 4 \mu\text{m}$  e  $48 \pm 2 \mu\text{m}$ , respectivamente. Esses valores também foram confirmados com o auxílio de um micrômetro.

Figura 50 – Micrografias da seção transversal dos filmes compósitos com CuMPs (a), CuNPs (b) e Cu<sub>2</sub>OMPs (c) e mapas de distribuição de cobre obtidos por EDS de outra área dos filmes com CuMPs (d), CuNPs (e) e Cu<sub>2</sub>OMPs (f)

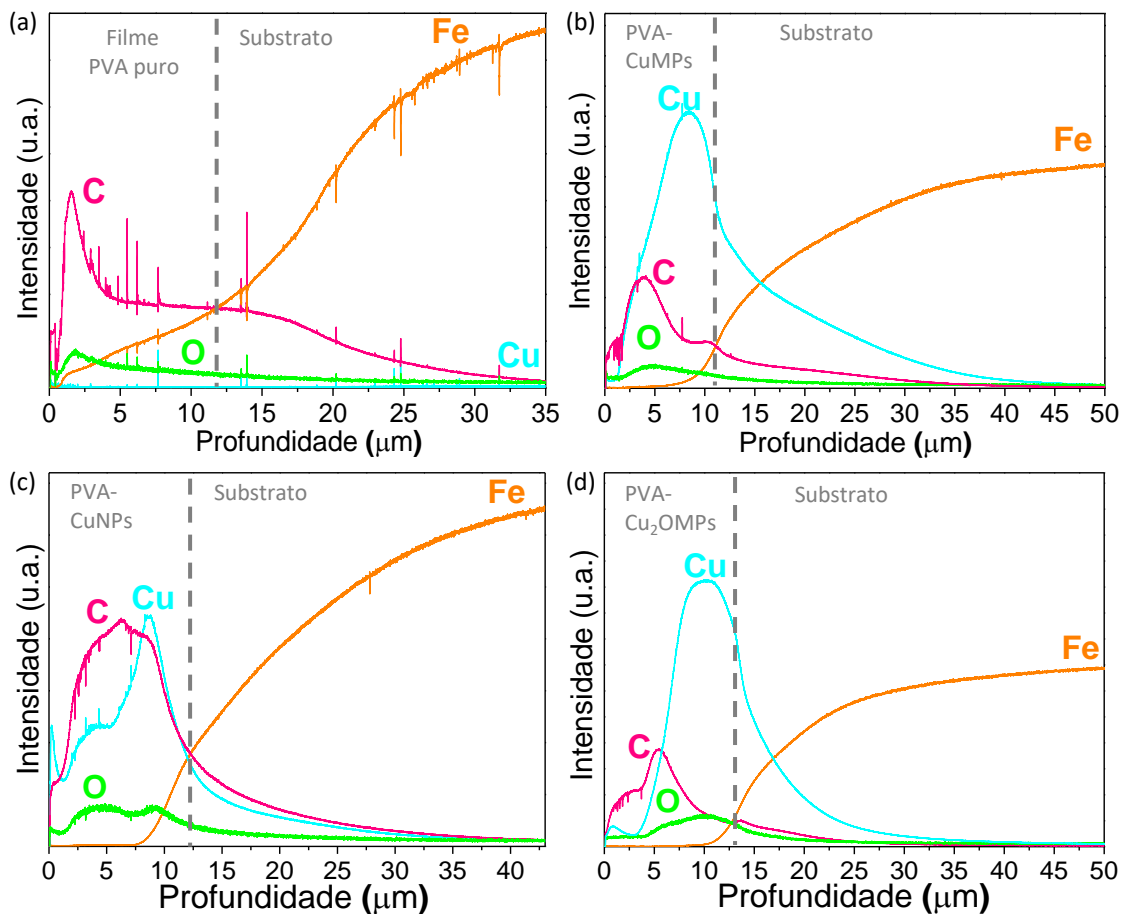


Fonte: a autora.

### 5.3.4 Perfil da composição elementar dos filmes compósitos por GDOES

A partir dos gráficos gerados por GDOES, que relacionam a composição elementar de uma superfície em função do tempo de *sputtering*, os valores foram convertidos em função da profundidade considerando a espessura dos filmes obtida por MEV (Figura 51), a qual encontra-se próxima à medida por perfilometria. Nos perfis dos filmes PVA-CuMPs e PVA-Cu<sub>2</sub>OMPs observa-se que a maior concentração de cobre está no final da espessura do filme, corroborando às análises microscópicas. Nota-se ainda que, por se tratar de um filme contendo óxido de cobre, o sinal de oxigênio no perfil do filme PVA-Cu<sub>2</sub>OMPs aumenta com a intensidade de cobre, o que demonstra a presença de oxigênio e cobre juntos. Tal comportamento não acontece nas demais amostras, o que corrobora o fato de terem sido produzidas com partículas de cobre metálico. No perfil do filme PVA-CuNPs, o sinal de cobre indica maior distribuição das partículas de cobre ao longo da espessura do filme pico.

Figura 51 – Perfil da composição elementar dos filmes compósitos por GDOES



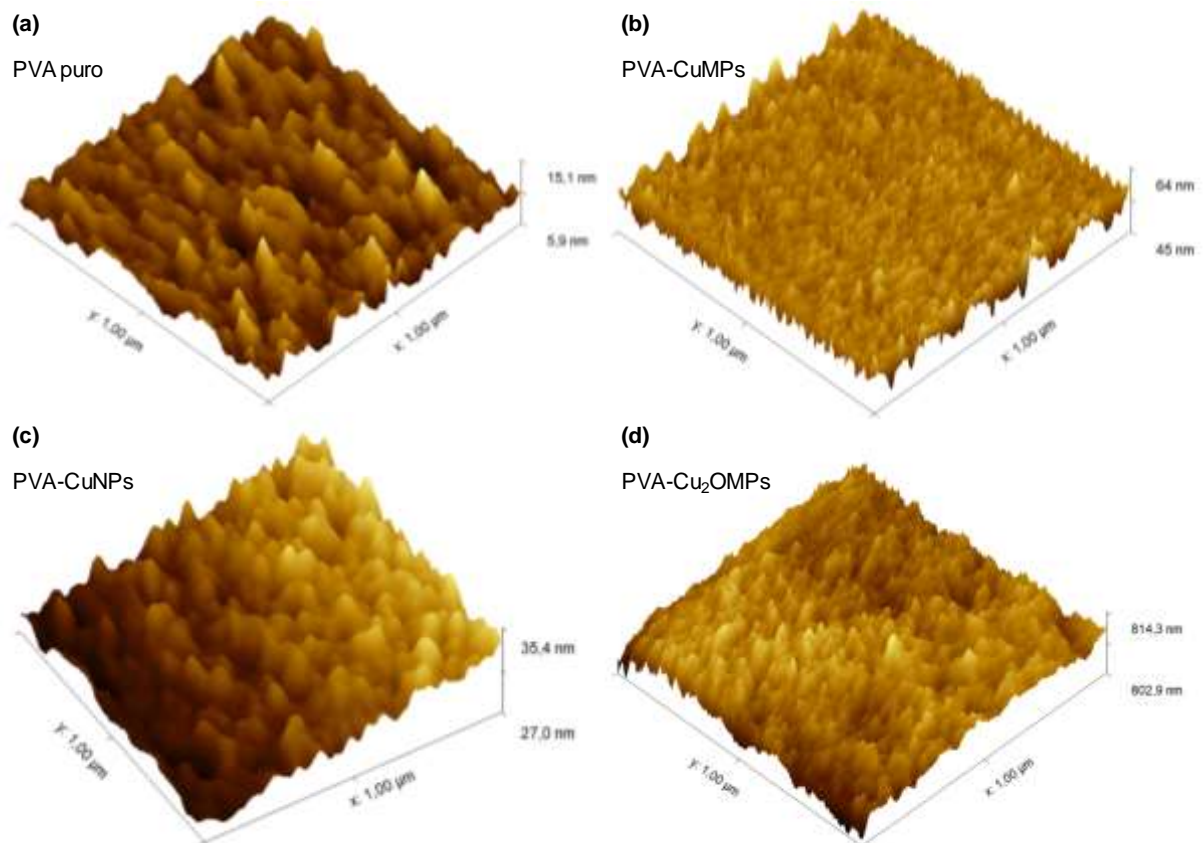
Fonte: a autora.



### 5.3.5 Rugosidade da superfície dos filmes compósitos por AFM

A Figura 52 apresenta as micrografias obtidas por AFM dos filmes de PVA puro e compósitos. A variação entre picos e vales da amostra de PVA puro, entre 5,9 e 15,1 nm, representa uma variação de 9,2 nm. A variação dos filmes PVA-CuMPs e PVA-Cu<sub>2</sub>OMPs é mais expressiva, de 19 e 11,4 nm, respectivamente, enquanto do filme PVA-CuNPs encontra-se em 8,4 nm. Ambas as superfícies indicaram elevado número dos chamados “pontos de contato”, o que, na avaliação da atividade bactericida, garante maior interação entre a superfície e as cargas bacterianas e/ou virais, um fator positivo para induzir à inativação e desinfecção. Observa-se que, no filme de PVA puro, os pontos de contato são mais distantes um do outro, indicando menor rugosidade, o que, supostamente, favorece a adesão de bactérias e vírus, segundo Prasher e Sharma (2021).

Figura 52 – Micrografias obtidas por AFM dos filmes de PVA puro e compósitos



Fonte: a autora.

Os valores de rugosidade quadrática média ( $Sq$ ) e de rugosidade média ( $Sa$ ) são apresentados na Tabela 6. O parâmetro  $Sq$  representa o valor médio quadrático das alturas no interior da área de amostragem, enquanto  $Sa$  é definida pela média aritmética do valor absoluto da altura no interior da área de amostragem. De acordo com Blateyron (2013, p. 20), “ $Sq$  tem mais significância estatística, (é o desvio padrão) e frequentemente tem uma base mais física do que  $Sa$ ”.

O filme de PVA puro apresentou os menores valores de  $Sq$  e  $Sa$ , de 0,99 e 0,76 nm, respectivamente, representando a superfície mais lisa dentre as avaliadas. Os filmes PVA-CuMPs e PVA-Cu<sub>2</sub>OMPs apresentaram uma rugosidade média 36% e 21% superior, respectivamente, em relação ao filme de PVA puro, enquanto o PVA-CuNPs apresentou valores maiores de 70%. Tais resultados envolvendo a incorporação de material inorgânico em matrizes poliméricas são compatíveis com demais trabalhos da literatura (Pulit-Prociak *et al.*, 2020; Sakarkar; Muthukumaran; Jegatheesan, 2020).

Tabela 6 – Rugosidade quadrática média e rugosidade média dos filmes de PVA puro e compósitos

	PVA	PVA-CuMPs	PVA-CuNPs	PVA-Cu <sub>2</sub> OMPs
Rugosidade quadrática média (RMS, $Sq$ )	0,996 nm	1,342 nm	1,572 nm	1,177 nm
Rugosidade média ( $Sa$ )	0,764 nm	1,041 nm	1,325 nm	0,921 nm

Fonte: a autora.

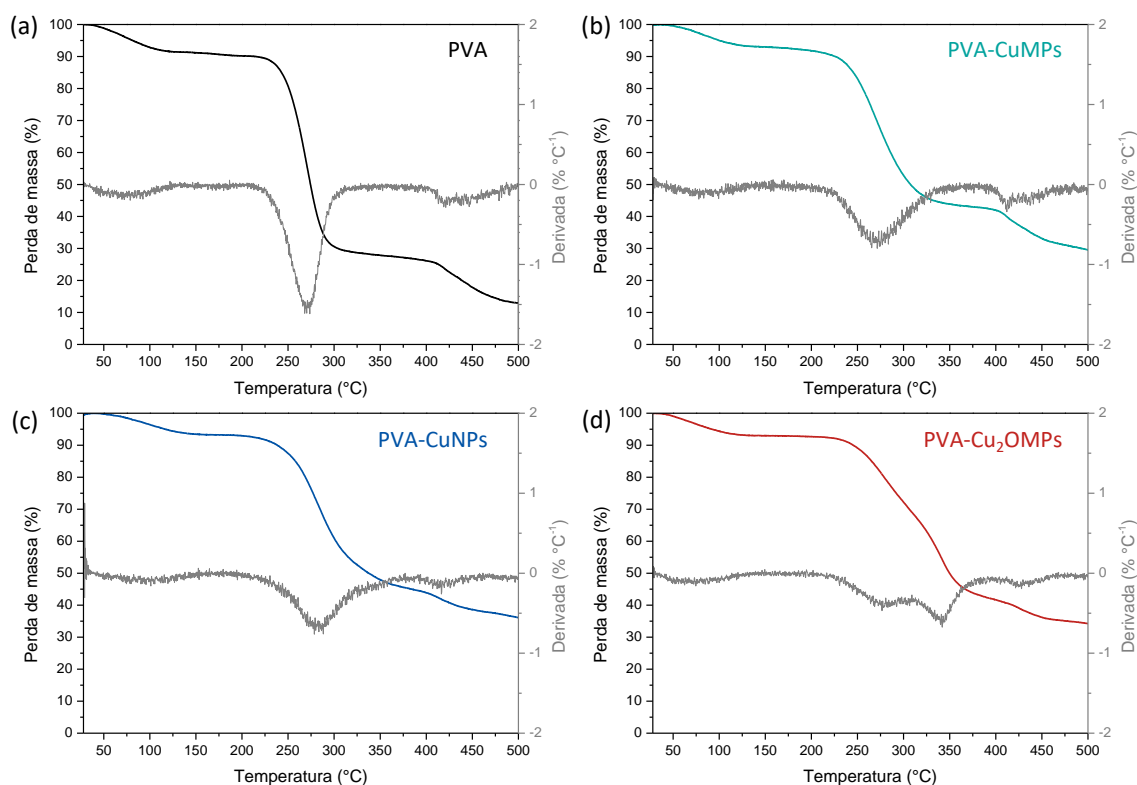
### 5.3.6 Comportamento térmico dos filmes compósitos

As curvas de TGA e de sua primeira derivada (DTG) do filme puro de PVA e dos filmes compósitos são apresentadas na Figura 53. Todos os filmes apresentaram logo no início do aquecimento, uma perda de massa inferior a 10%, a qual representa a perda da umidade, ou seja, de moléculas de água adsorvidas na superfície dos filmes, etapa também chamada de dessolvatação.

Quanto à decomposição dos filmes propriamente, em acordo com dados da literatura, a decomposição térmica do PVA é apresentada em dois pontos, um em aproximadamente 220 °C, representando a eliminação do grupo hidroxila, e outro em 400 °C, o qual está relacionado à

quebra da ligação C–C nas cadeias laterais, o que culmina na conversão do polímero em carbono e hidrocarbonetos. No caso do filme de PVA puro, a perda de massa na primeira decomposição foi de quase 75%, enquanto na segunda foi de 12%. No filme contendo CuMPs, as perdas mássicas no primeiro e segundo estágios foram de 50 e 13%, respectivamente. A menor perda de massa na primeira etapa, está relacionada às partículas incorporadas, as quais promovem relativa reticulação da matriz polimérica, tornando-a mais rígida. O filme PVA-CuNPs, considerando a perda de água inicial de aproximadamente 7%, perdeu 46% de massa na primeira decomposição, seguida da perda de mais 10% na segunda etapa. Quanto ao filme composto pelas micropartículas de  $\text{Cu}_2\text{O}$ , foi possível observar uma etapa a mais de perda de massa, em aproximadamente 315 °C, referente à oxidação do óxido metálico. O total de perda mássica considerando essa oxidação foi de 58% seguida de 8% na segunda decomposição (Alsaad *et al.*, 2021; Lemraski *et al.*, 2021; Miranda *et al.*, 2020).

Figura 53 – Curva da decomposição térmica (TGA) e da primeira derivada (DTG) do filme de PVA puro (a) e dos filmes compósitos com CuMPs (b), CuNPs (c) e  $\text{Cu}_2\text{O}$ MPs (d)



Fonte: a autora.

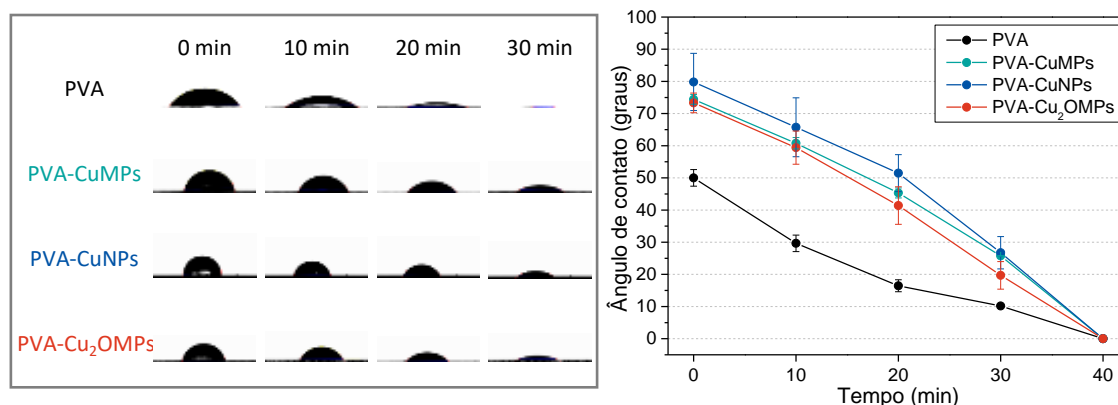
### 5.3.7 Molhabilidade por ângulo de contato

Quanto à molhabilidade, reconhece-se que as superfícies se dividem em dois grupos: as hidrofílicas, que representam superfícies molháveis que tendem a absorver água, e as hidrofóbicas, superfícies não molháveis que não absorvem nem retêm água (Sharifahmadian *et al.*, 2013). Uma vez que a adesão bacteriana ou viral à superfície representa uma etapa na promoção de uma da infecção, superfícies e/ou revestimento repelentes são uma abordagem no combate à redução dos riscos de infecção (Poggio *et al.*, 2020). Todavia, materiais incorporados com agentes antimicrobianos que possam ser liberados gradativamente, também evitam a colonização da superfície e a consequente formação de biofilmes. Dessa forma, a molhabilidade (ou hidrofiliicidade) não é um empecilho no combate a infecções, pelo contrário, melhora o desempenho biocida da superfície (Prasher; Sharma, 2021; Sharifahmadian *et al.*, 2013).

A Figura 54 apresenta o gráfico relacionando o ângulo de contato dos filmes de PVA puro e compósitos. Uma vez que o PVA é parcialmente solúvel, a hidrofiliicidade dos filmes era esperada. Observa-se que a incorporação das partículas de cobre promoveu um aumento percentual de aproximadamente 50% do ângulo de contato, porém, mantendo-se predominantemente hidrofílicos ( $< 90^\circ$ ).

Ainda, sendo todos compostos por uma matriz polimérica hidrofílica, observou-se a diminuição do ângulo de contato ao longo do tempo, resultando em completa absorção da gotas de água em 30 minutos para o filme de PVA puro e de 40 minutos para os filmes compósitos. Tais resultados, a partir do que já foi relatado na literatura, mostram que os filmes compósitos são promissores no emprego como superfícies bactericidas.

Figura 54 – Ângulo de contato dos filmes compósitos



Fonte: a autora.

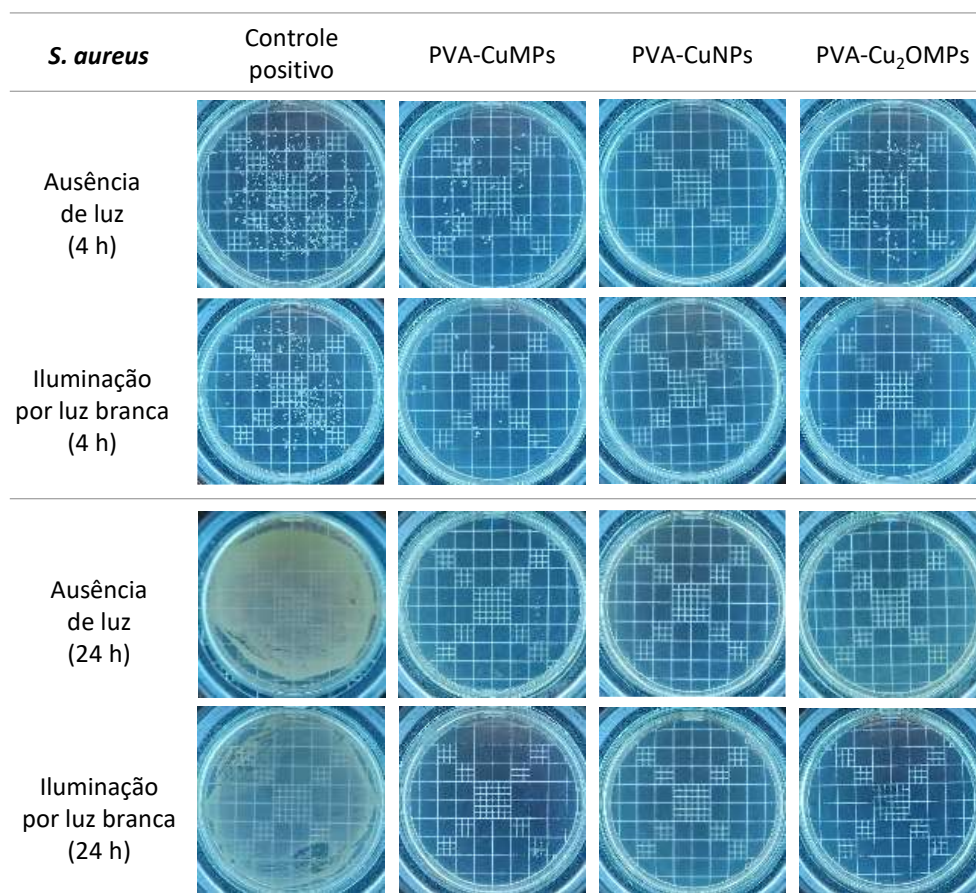
### 5.3.8 Liberação de íons de cobre dos filmes compósitos

Após o período de 24 horas imersos em MH, a liberação de íons de cobre dos filmes compósitos é evidente diante da modificação da coloração das suspensões, as quais mudam de amarelada (do próprio MH) para azulada e/ou esverdeada. Os filmes PVA-CuMPs e PVA-CuNPs apresentaram 30% mais concentração de  $\text{mg Cu L}^{-1}$  nos ensaios conduzidos sob iluminação em comparação com os ensaios realizados no escuro, atingindo valores entre 144 e 158  $\text{mg Cu L}^{-1}$ . Para o filme PVA-Cu<sub>2</sub>OMPs, a concentração de íons diminuiu quase 10% sob luz em comparação com os ensaios no escuro. Os resultados em geral apresentaram valores altamente dispersivos, o que pode estar relacionado ao tamanho e aos estados oxidantes das partículas que proporcionam diferentes reatividades. Outra justificativa pode ser a supressão da liberação de íons devido à incorporação de partículas na matriz polimérica, levando à instabilidade nas respectivas medições (Palza; Quijada; Delgado, 2015; Parra-Ortiz; Malmsten, 2022).

### 5.4 FOTOATIVIDADE BACTERICIDA DOS FILMES COMPÓSITOS

Em todos os experimentos realizados, o filme de PVA puro não apresentou atividade bactericida contra as bactérias testadas, o que era esperado, uma vez que é um polímero inerte e ecologicamente amigável (Balasubramaniam *et al.*, 2020; Lemraski *et al.*, 2021). Quanto aos filmes compósitos, conforme observado pelas fotografias das placas de Petri semeadas com a solução bacteriana controle e as soluções bacterianas tratadas, em 4 horas de incubação frente à *S. aureus*, a atividade bactericida dos filmes de PVA-CuMPs e PVA-Cu<sub>2</sub>OMPs foi semelhante, enquanto o filme PVA-CuNPs apresentou maior redução de UFC, indicando maior atividade bactericida. Quanto aos testes realizados com 24 horas de incubação, observa-se a eliminação total de UFC para todos os filmes compósitos (Figura 55).

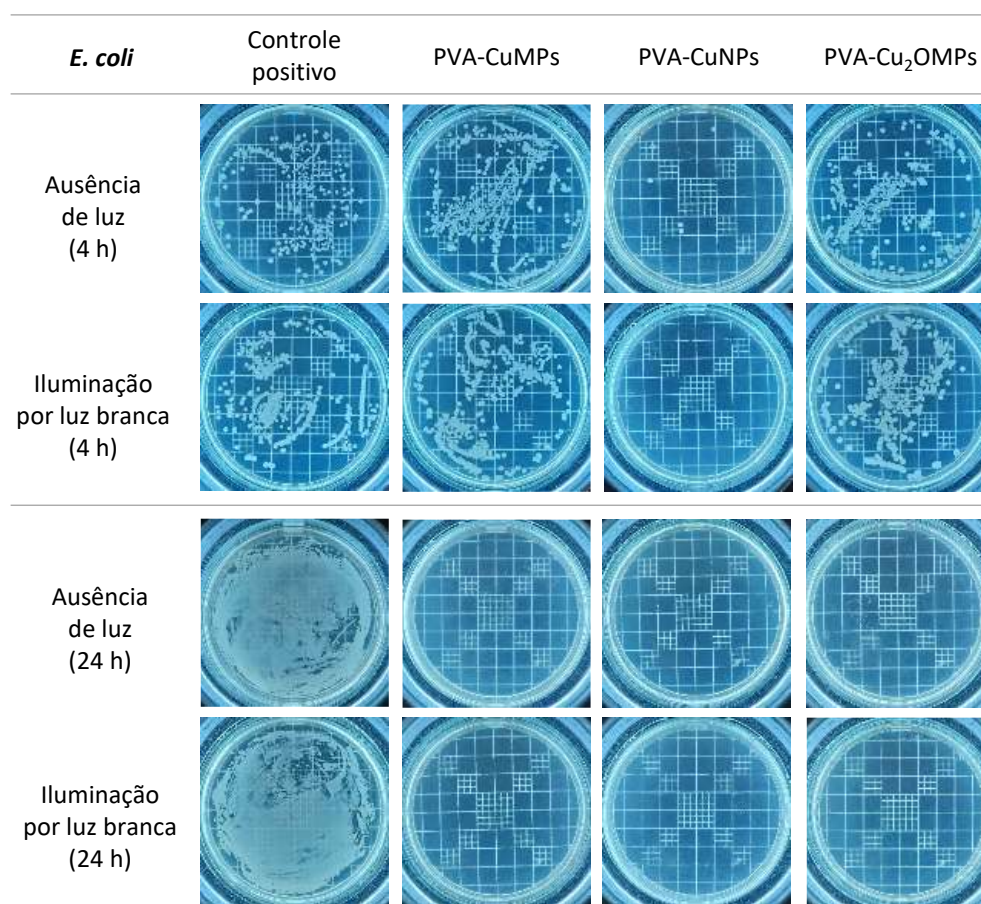
Figura 55 – Fotografias dos ensaios desenvolvidos referentes à fotoatividade bactericida dos filmes compósitos frente à *S. aureus*



Fonte: a autora.

Contra a *E. coli*, a maior resistência da bactéria Gram-negativa foi novamente observada, pois nos ensaios de 4 horas de incubação, os filmes PVA-CuMPs e PVA-Cu<sub>2</sub>OMPs apresentaram quase a mesma quantidade de UFC que o controle positivo. Em 24 horas de incubação, todavia, a redução de UFC foi total para ambos os filmes (Figura 56).

Figura 56 – Fotografias dos ensaios desenvolvidos referentes à fotoatividade bactericida dos filmes compósitos frente à *E. coli*



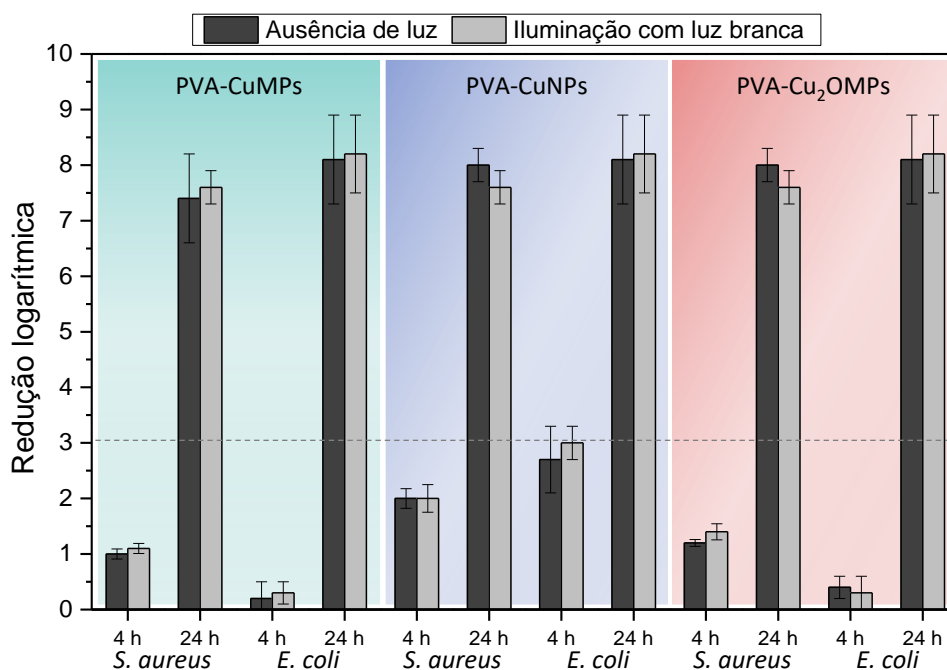
Fonte: a autora.

A Figura 57 apresenta o valor médio e o desvio padrão da redução logarítmica dos experimentos contra *S. aureus* e *E. coli* tratados com filmes compósitos por 4 e 24 horas de incubação. No menor tempo, a atividade bactericida ficou majoritariamente abaixo de 3 log de redução (99,9%), o que é comumente considerado insatisfatório. No entanto, deve-se notar que o filme de PVA-CuNPs atingiu 2 e 3 log de redução da população de *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente, enquanto os filmes PVA-CuMPs e PVA-Cu<sub>2</sub>OMPs mostraram redução de aproximadamente 1 log contra *S. aureus*. Tais resultados, na escala de redução logarítmica, podem não ser considerados satisfatórios, porém não devem ser negligenciados, pois a redução de 1 log representa 90% de redução na carga bacteriana.

Dentro de 24 horas, todos os filmes compósitos apresentaram redução acima de 7 log (> 99,9999% de remoção frente à *S. aureus* e à *E. coli* em ambas as condições de iluminação. Nota-se, porém, que em todas as condições avaliadas, não foram observados resultados estatisticamente significativos que indicassem influência da luz na atividade bactericida de

nenhum dos filmes, diferentemente do observado nos ensaios com as suspensões das partículas. Tal evidência pode indicar que a incorporação das partículas na matriz polimérica suprime a atividade da luz e que a atividade bactericida é governada principalmente pelo contato físico e pela liberação de partículas durante o período de incubação.

Figura 57 – Redução logarítmica da população bacteriana de *S. aureus* e *E. coli* frente aos filmes compósitos



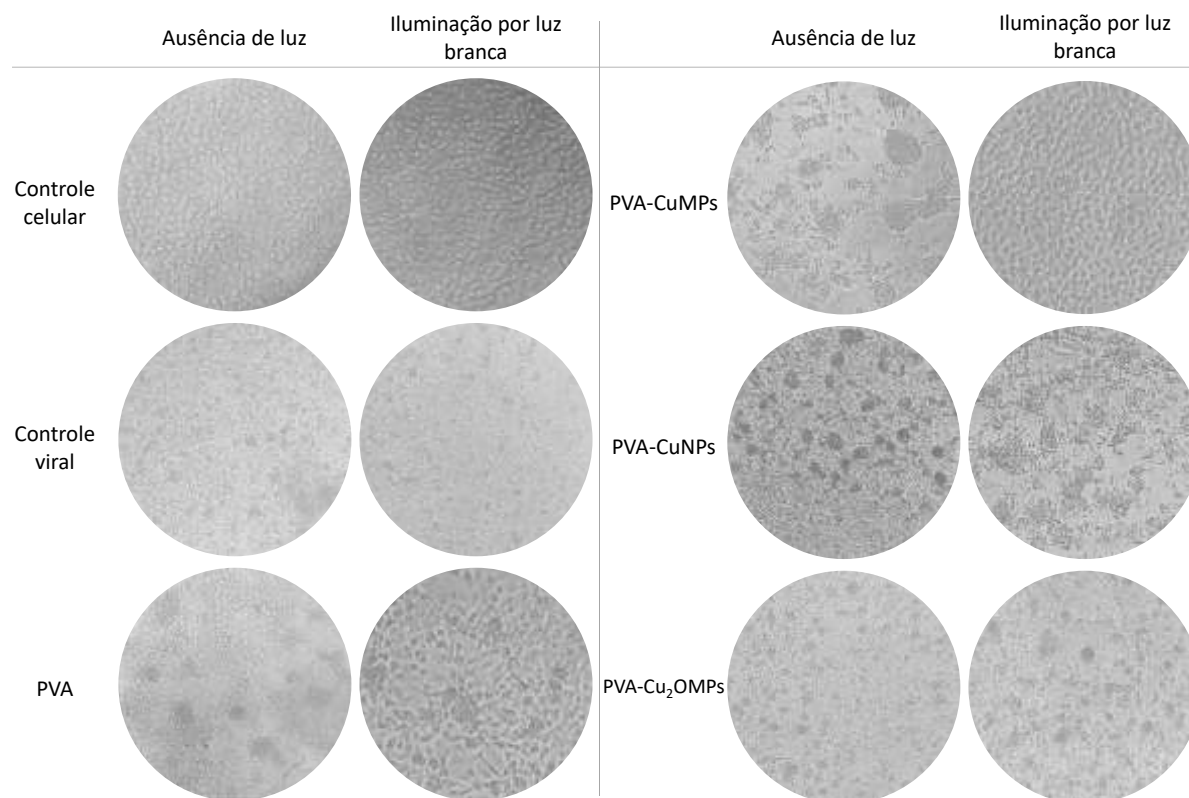
Fonte: a autora.

## 5.5 FOTOATIVIDADE VIRUCIDA DOS FILMES COMPÓSITOS

Ao término da última incubação das placas de 24 cavidades referentes ao ensaio da fotoatividade virucida dos filmes compósitos, todas as cavidades foram avaliadas em um microscópio invertido. A Figura 58 apresenta as imagens (de um dos ensaios realizados) captadas por aparelho fotográfico convencional referentes às cavidades das monocamadas celulares tratadas com o filme de PVA puro e os filmes compósitos, além dos controles celular e viral.



Figura 58 – Fotografias das monocamadas celulares observadas por microscopia com aumento de 40x das placas do ensaio da atividade virucida do filme de PVA e dos filmes compósitos contra o MHV-3 na ausência de luz e sob iluminação com luz branca



Fonte: a autora.

Observa-se, primeiramente, que em ambas as condições de iluminação, o controle viral apresentou uma considerável redução de células em comparação com o controle celular, evidenciando o efeito citopático (ECP) que já era esperado, visto que se tratam do controle positivo e negativo, respectivamente. Quando a linhagem celular não é afetada por vírus, ela permanece aderida sobre a superfície tratada, de modo a obter uma morfologia alongada, resultando em um tapete celular uniforme e bem distribuído. Em contrapartida, quando há efeito citopático, ou seja, infecção viral, as células adquirem morfologia mais arredondada devido à perda de aderência no substrato, além da perda da estrutura característica do tapete celular devido ao dano viral.

Avaliando particularmente as cavidades tratadas com o filme de PVA puro, observa-se relativa semelhança com o controle viral, indicando presença de efeito citopático, ou seja, ausência de atividade virucida advinda do filme. Tal comportamento também era esperado, uma vez que não há relatos sobre qualquer atividade virucida do PVA.

Por outro lado, ao observar as cavidades tratadas com o filme contendo micropartículas de cobre metálico (PVA-CuMPs), observa-se efeito citopático apenas no ensaio conduzido na ausência de luz, enquanto o ensaio sob iluminação manteve o tapete celular sem indícios de dano. Esse resultado indica atividade virucida do filme quando iluminado por luz branca.

Tal comportamento não foi observado nas cavidades com os outros dois filmes compósitos, PVA-CuNPs e PVA-Cu<sub>2</sub>OMPs. Os meios tratados com essas amostras, apresentaram efeito citopático em ambas as condições de iluminação, indicando ausência de atividade virucida para os parâmetros do teste.

Esses resultados são expressos na Tabela 7 em função do efeito citopático do vírus MHV-3 sobre a linhagem L929 conforme cada tratamento realizado. A ausência de efeito citopático na linhagem celular submetida ao contato com a solução tratada com o filme PVA-CuMPs indica a presença de fotoatividade virucida do filme compósito.

Tabela 7 – Efeito citopático do vírus MHV-3 na linhagem celular L929 sob diferentes tratamentos

Tratamento	Ausência de Luz	Iluminação com luz branca
Controle celular	-	-
Controle viral	+	+
PVA	+	+
PVA-CuMPs	+	-
PVA-CuNPs	+	+
PVA-Cu <sub>2</sub> OMPs	+	+

Fonte: a autora.

Desse modo, a partir da repetição deste ensaio, do qual obteve-se resultados semelhantes, o experimento ICC-RT-qPCR foi realizado em triplicata para avaliar, mais específica e detalhadamente, a atividade virucida do filme PVA-CuMPs nas duas condições de iluminação. A partir da média entre as três medições de partículas virais e comparando com o controle viral (média de  $1,7 \cdot 10^{11}$  partículas virais), verificou-se que o filme compósito promoveu uma redução de 43,1% da carga viral quanto iluminado por luz branca, enquanto no escuro, a redução da carga viral foi de apenas 6,8%. Apesar do valor insatisfatório para atividade virucida, provou-se o efeito da luz na ação virucida de filmes compósitos a base de cobre.

Ademais, faz-se mister reconhecer a resposta dose-dependente, uma vez que diversos artigos já mostraram que, entre diferentes materiais de superfície, a mais rápida decomposição do vírus SARS-CoV-2 foi observada em superfície a base de cobre. Estudos mostraram que, enquanto partículas virais viáveis eram encontradas sobre superfícies plásticas e aço inoxidável após 72 horas e em papelão após 24 horas, sobre cobre e revestimentos de óxido de cobre (I), nenhuma partícula viral era observada após 4 horas e 1 hora contato, respectivamente (Behzadinasab *et al.*, 2020; Doremalen *et al.*, 2020).

No trabalho de Kubo *et al.* (2022), nanopartículas de  $\text{CuSO}_4$  foram incorporadas em fibras de celulose (7,5%) por eletrofição (*electrospinning*), para produção de máscaras faciais, reduziram os títulos do vírus influenza A em 1,1–1,8 log após 5 minutos de exposição, e em 1,6–1,8 log após 1 hora de exposição. Frente ao SARS-CoV-2, em 5 minutos a redução foi de 0,38 log sendo total em 1 hora. Sendo assim, o alcance de números expressivos na redução da carga viral, também está relacionado ao vírus em teste, à concentração de material ativo e ao tempo de exposição.

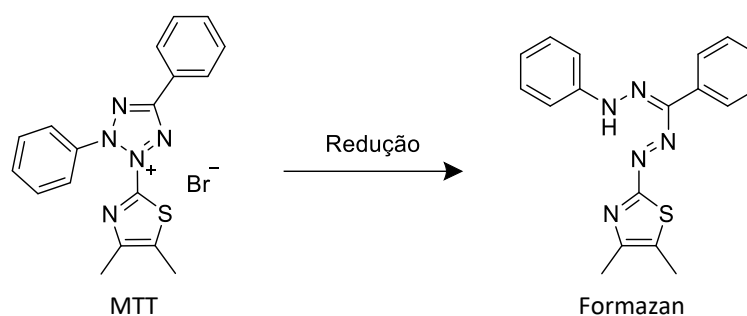
No trabalho de Díaz-Puertas *et al.* (2023), que incorporaram nanopartículas de prata revestidas de cerâmica em placas de poliuretano termoplástico (TPU) para combater um patógeno de peixe, relataram que a atividade do compósito (o qual atingiu 75% de redução da carga viral) era dependente não apenas do tempo de contato, mas também da temperatura do ensaio.

Enfim, a maior parte dos estudos abordando a fotoatividade do cobre no combate a vírus parte de materiais com estruturas complexas, como porfirinas catiônicas e redes metalorgânicas (Bagheri *et al.*, 2023; Balasubramaniam *et al.*, 2021; Ries *et al.*, 2020), ou de heterojunções com outros materiais fotoativos, como a prata e o  $\text{TiO}_2$  (Campbell *et al.*, 2024; Miyauchi; Sunada; Hashimoto, 2020; Soni *et al.*, 2022). Desse modo, a proposta do presente estudo que utiliza partículas fotoatividade de baixo custo relativo, incorporando-as em filmes de PVA, uma matriz polimérica inerte, obtidos por uma técnica de deposição simples, é promissora para o avanço das pesquisas relacionadas a materiais e superfícies com propriedades fotocatalíticas no combate à disseminação de patógenos.

## 5.6 CITOTOXICIDADE DOS FILMES COMPÓSITOS

O método indireto é baseado na redução do MTT (sal solúvel em água e de coloração amarela) em formazan (insolúvel em água e de coloração azulada ou roxa) (Figura 59). Na reação, o anel de tetrazólio do MTT é clivado nas mitocôndrias ativas, logo, a reação ocorre apenas em células vivas (Mosmann, 1983; Präbst *et al.*, 2017).

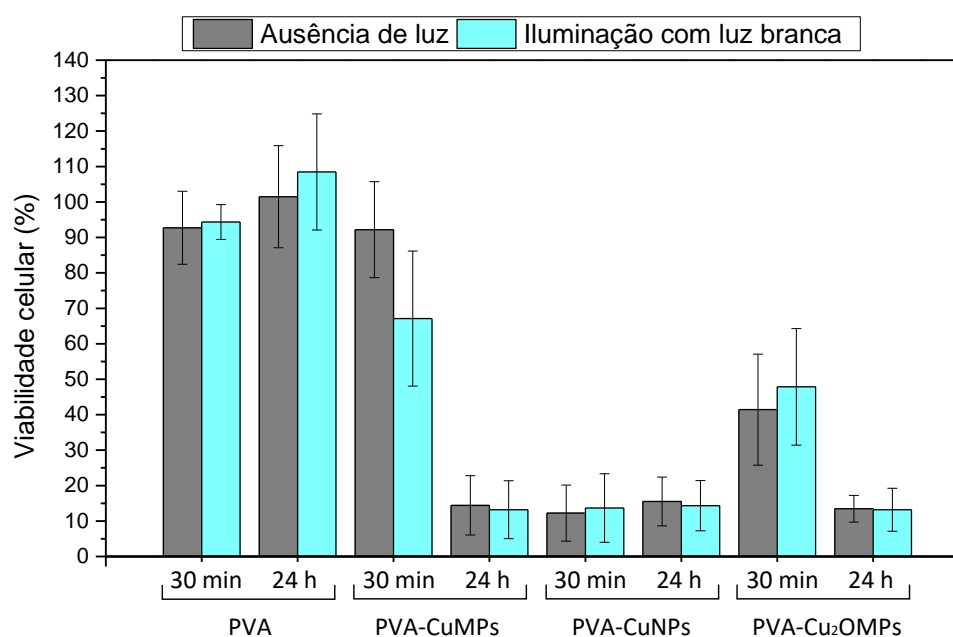
Figura 59 – Esquema representativo da redução do MTT a formazan



Fonte: a autora.

Em 24 horas, verificou-se a ausência de citotoxicidade do PVA, uma vez que a média da viabilidade celular se manteve acima de 100%, o que indica crescimento (replicação) celular em relação ao controle e, conseqüentemente, biocompatibilidade. Quanto aos filmes compósitos, todos apresentaram elevada citotoxicidade relativa, uma vez que a viabilidade celular média variou entre 13 e 16% (Figura 60). O recomendado para garantir biossegurança é acima de 70% (ISO 10993-5, 2009). Assim, adaptamos o ensaio para conduzi-lo considerando 30 minutos de incubação, reproduzindo assim, o tempo de contato nos ensaios virucidas. Desse modo, verificamos que nesse curto período de tempo, a luz influencia na citotoxicidade do filme PVA-CuMPs, pois na ausência de luz a viabilidade celular média foi de 92%, enquanto sob iluminação diminuiu para 67%. Tal resultado é justificado pela fotoatividade do material, já comprovada nos ensaios anteriores. Quanto ao filme com CuNPs, a citotoxicidade já se fez presente mesmo nesse curto período, confirmando o elevado poder oxidante das nanopartículas. Enfim, o filme PVA-Cu<sub>2</sub>OMP apresentamos maiores valores de viabilidade celular, porém ainda na faixa que representa citotoxicidade.

Figura 60 – Viabilidade celular da linhagem L929 pelo ensaio MTT com os filmes de PVA e os filmes compósitos



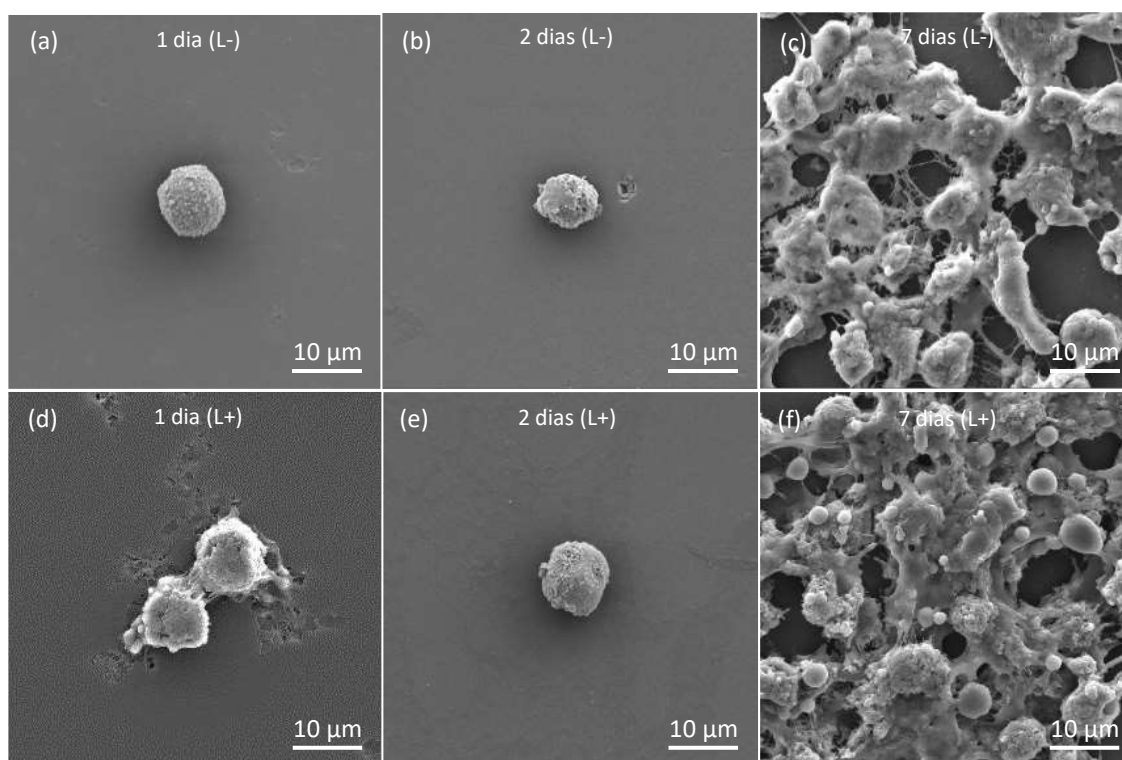
Fonte: a autora.

Primeiramente, deve-se reconhecer que, assim como a atividade bactericida e virucida, a citotoxicidade do cobre também é dose-dependente e, por isso, conforme mencionado na revisão bibliográfica, já é, independentemente, utilizado mundialmente em diferentes aplicações medicinais, odontológicas e biomédicas (Borkow; Gabbay, 2009; Pandey *et al.*, 2019; Poggio *et al.*, 2020; Rezaei *et al.*, 2019).

De modo a corroborar a discussão, na sequência são apresentados os resultados referentes aos ensaios de citotoxicidade direta envolvendo a observação da linhagem celular por microscopia eletrônica. Uma célula L929 viável é caracterizada por uma morfologia fusiforme, ou seja, uma estrutura alongada com extremidades mais estreitas que o centro, indicando aderência celular e, conseqüente viabilidade. Ao considerar morte celular, deve-se considerar dois tipos: apoptose e necrose. A apoptose consiste em uma morte celular programada que ocorre quando as células sofrem algum tipo de dano natural ou quando não são mais necessárias, é um processo necessário em organismos multicelulares. Morfologicamente, as células sofrem um encolhimento seguido pela formação de corpos apoptóticos e fragmentação do DNA. Diferentemente, a morte por necrose ocorre devido a danos patológicos de um modo geral ou à falta de suprimento sanguíneo. As alterações morfológicas incluem ruptura da membrana plasmática e liberação de conteúdo celular no meio acarretando em inflamações (Elias *et al.*, 2015; Rezaei *et al.*, 2019; Tortora; Finke; Case, 2019).

A Figura 61 apresenta as micrografias obtidas por MEV-FEG do ensaio realizado na ausência de luz (L-) e sob iluminação por luz branca (L+) após 1, 2 e 7 dias de contato direto com o filme de PVA puro. Observa-se que, nos primeiros dias, as células não apresentam a característica fusiforme, porém há indícios de aderência, outra característica que indica viabilidade celular, e não são observados corpos apoptóticos ou necrose. Com 7 dias, a densidade celular aumenta consideravelmente, evidenciando a biocompatibilidade da matriz polimérica (Chaves *et al.*, 2014; Madigan *et al.*, 2019; Radtke *et al.*, 2017). Não foi possível observar diferença entre as condições de iluminação na qual os ensaios foram desenvolvidos.

Figura 61 – Micrografias obtidas por MEV-FEG do ensaio de citotoxicidade direto realizado no escuro (L-) e sob iluminação (L+) com o filme de PVA puro

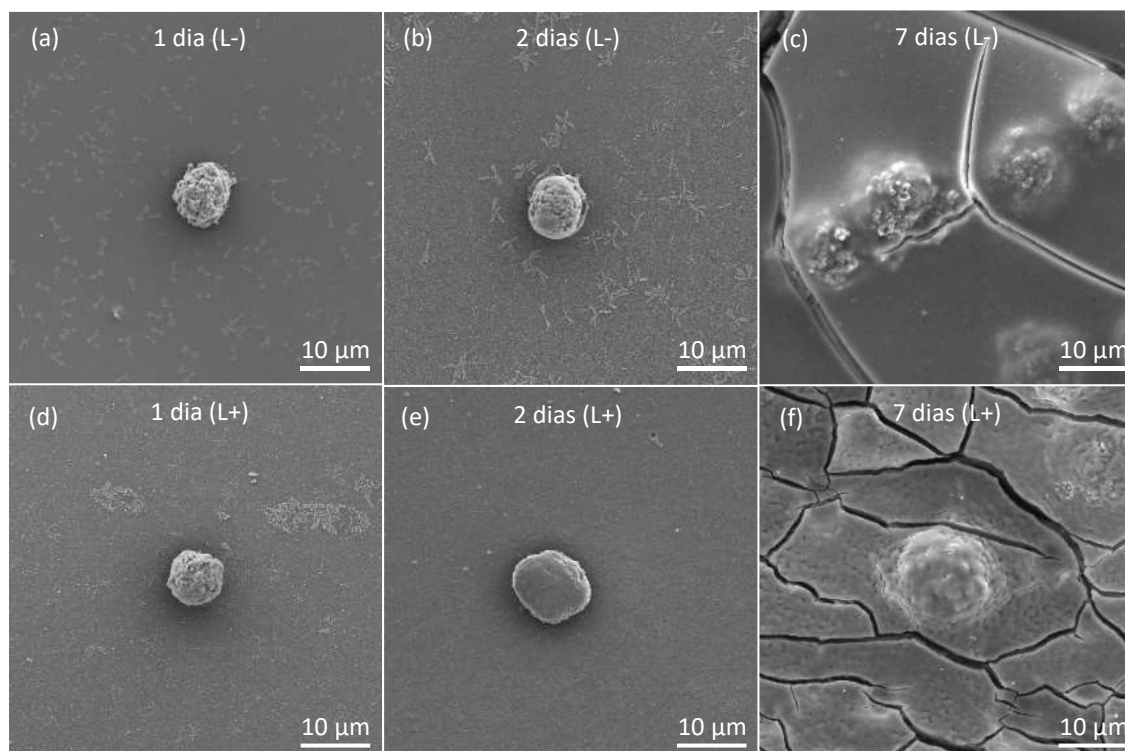


Fonte: a autora.

A Figura 62 apresenta as micrografias obtidas por MEV-FEG do ensaio realizado na ausência de luz (L-) e sob iluminação por luz branca (L+) após 1, 2 e 7 dias de contato direto com o filme de PVA-CuMPs. Em 1 e 2 dias, as células apresentaram semelhanças morfológicas com as do ensaio com PVA puro, porém, os dendritos observados na superfície podem representar indícios de morte celular. A partir das micrografias de 7 dias, a baixa densidade celular evidencia a citotoxicidade do material em ambas as condições de iluminação. Ainda,

observa-se a presença de células sob a matriz polimérica, possivelmente devido à hidrofobicidade do material, o que também influencia no aumento da citotoxicidade diante da supressão de oxigênio para as células. As trincas (rachaduras) observadas na superfície podem representar uma consequência da etapa de desidratação da amostra para análise no microscópio.

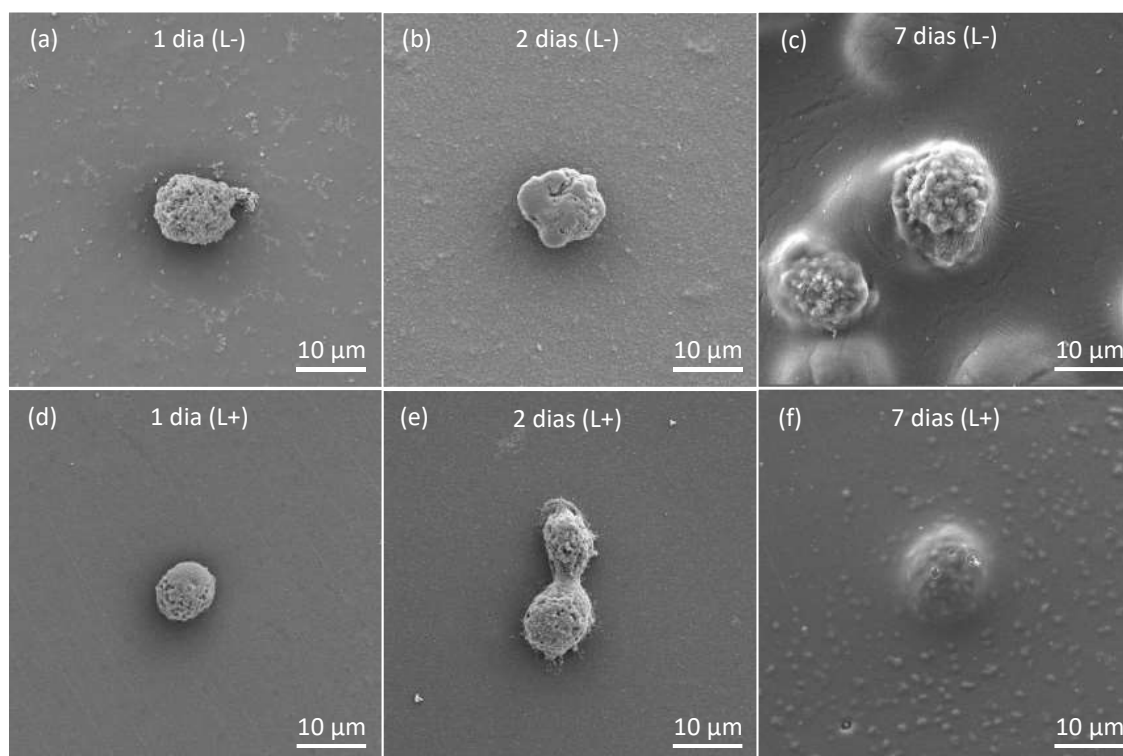
Figura 62 – Micrografias obtidas por MEV-FEG do ensaio de citotoxicidade direto realizado no escuro (L-) e sob iluminação (L+) com o filme de PVA-CuMPs



Fonte: a autora.

A Figura 63 apresenta as micrografias obtidas por MEV-FEG do ensaio realizado na ausência de luz (L-) e sob iluminação por luz branca (L+) após 1, 2 e 7 dias de contato direto com o filme de PVA-CuNPs. Os resultados obtidos se assemelham dos referentes ao filme PVA-CuMPs, diferenciando apenas pela observação do processo de mitose na Figura 63e, o qual pode indicar relativa viabilidade celular. Contudo, a baixa densidade celular ao longo de todos os ensaios confirma a citotoxicidade do filme.

Figura 63 – Micrografias obtidas por MEV-FEG do ensaio de citotoxicidade direto realizado no escuro (L-) e sob iluminação (L+) com o filme de PVA-CuNPs

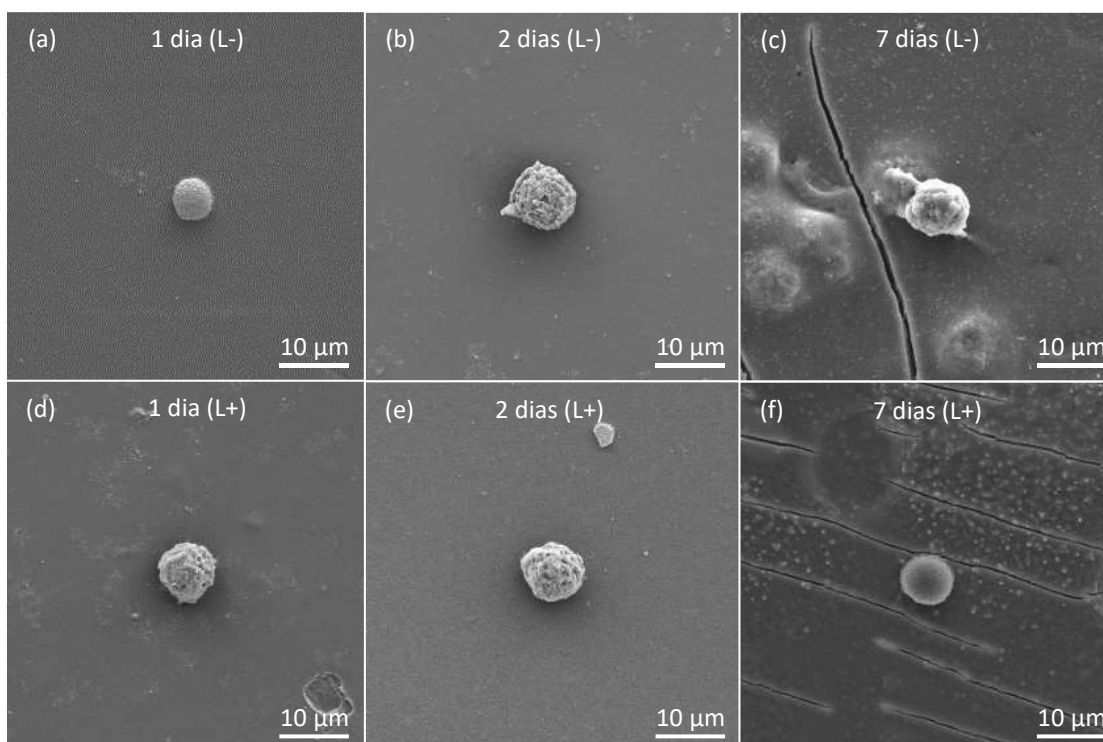


Fonte: a autora.

Por fim, a Figura 64 apresenta as micrografias obtidas por MEV-FEG do ensaio realizado na ausência de luz (L-) e sob iluminação por luz branca (L+) após 1, 2 e 7 dias de contato direto com o filme de PVA-Cu<sub>2</sub>OMPs. Mais uma vez as células não apresentaram indícios de apoptose ou necrose, porém, a ausência de proliferação celular ao longo de 7 dias indica citotoxicidade.



Figura 64 – Micrografias obtidas por MEV-FEG do ensaio de citotoxicidade direto realizado no escuro (L-) e sob iluminação (L+) com o filme de PVA-Cu<sub>2</sub>OMPs



Fonte: a autora.

Testes de citotoxicidade são amplamente empregados na avaliação da biocompatibilidade de materiais. Quando a proposta de aplicação encontra-se na área de engenharia de tecidos para aplicações médicas e terapêuticas ou para aplicações na odontologia ou para equipamentos de proteção individual, por exemplo, é essencial que o material não seja citotóxico ou mutagênico, pois o contato com as células humanas é direto (Chaves *et al.*, 2014; Lasocka *et al.*, 2018). Todavia, com foco no desenvolvimento de superfícies com propriedades bactericidas, cujo toque corresponde a segundos de contato (passageiro e não recorrente), esses valores de citotoxicidade não inviabilizam o presente trabalho. O comumente citado artigo de Borkow e Gabbay de 2009, menciona que o risco de reações adversas mediante o contato dérmico com cobre é considerado extremamente baixo, uma vez que não é um elemento estranho para o corpo humano.

Por fim, conferida a obtenção de filmes compósitos fotoativos com propriedades bactericidas e virucida, o presente estudo corrobora para o avanço das pesquisas relacionadas a materiais e superfícies com propriedades fotocatalíticas sob luz visível no combate à disseminação de patógenos.

## 6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

As três amostras particuladas de cobre, CuMPs, CuNPs e Cu<sub>2</sub>OMPs, provaram apresentar uma banda proibida condizente com a literatura e principalmente, propícia para o cumprimento dos objetivos do presente trabalho. As bandas proibidas das micropartículas de cobre, das nanopartículas de cobre e das micropartículas de óxido de cobre (I), avaliadas por UV-Vis, foram 2,1, 2,0 e 2,0 eV, respectivamente. Devido à ausência de um único pico de absorção nos espectros referentes às amostras de CuMPs e CuNPs, a presença de óxidos de cobre na superfície do material particulado foi considerada.

Os difratogramas obtidos por DRX, bem como os espectros de FTIR e de Raman, apresentaram compatibilidade com a literatura e ainda, não evidenciaram a presença de contaminantes e/ou impurezas, nem de oxidação das amostras de CuMPs e CuNPs. Todavia, as análises por XPS expuseram que todas as amostras apresentam uma oxidação superficial parcial, considerando que a informação da análise é de até 10 nm da superfície. Sendo o CuO o estado mais estável do cobre, as micropartículas de cobre metálico apresentaram 22% de sua superfície totalmente oxidada, enquanto as nanopartículas de cobre, devido à alta relação superfície/volume e reatividade, apresentaram 56%. As micropartículas de óxido de cobre (I) apresentaram apenas 4% de sua superfície oxidada, porém 55% com oxidação parcial (Cu(OH)<sub>2</sub>), uma fase metaestável.

Quanto à morfologia, com as micrografias obtidas por MEV foi possível observar a morfologia heterogênea das micropartículas de cobre e de óxido de cobre (I), tanto em forma como em tamanho. A partir da avaliação de diferentes micrografias com o auxílio do *software* ImageJ, os tamanhos médios das amostras CuMPs e Cu<sub>2</sub>OMPs foram mensurados em  $7,7 \pm 5,6 \mu\text{m}$  e  $7,6 \pm 3,9 \mu\text{m}$ , respectivamente. As CuNPs apresentaram maior homogeneidade em tamanho, estimado em  $46 \pm 17 \text{ nm}$  de acordo com as micrografias obtidas por MEV-FEG, valor corroborado pelas análises de MET.

A atividade bactericida das partículas contra *S. aureus* e *E. coli*, foi significativa. No combate à bactéria Gram-positiva *S. aureus*, na concentração de  $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ , as micropartículas de cobre metálico promoveram uma redução de 99,99% (4 log) da população bacteriana na ausência de luz, e >99,9999% (> 6 log) quando iluminadas por luz branca. Frente à Gram-negativa *E. coli*, as mesmas partículas, mas com concentração de  $10 \text{ mg mL}^{-1}$ , promoveram uma redução de 99,9% (3 log) da população bacteriana na ausência de luz, e >99,9999% quando iluminadas por luz branca. Em função da redução logarítmica da carga

bacteriana, a fotoatividade bactericida da amostra CuMPs sob iluminação por luz visível sobre *S. aureus* foi 67% superior que nos ensaios realizados na ausência de luz, enquanto frente à *E. coli* foi 167% superior, expressando significativa diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Ainda, diante da maior concentração de material bactericida necessário sobre a *E. coli* para a obtenção uma atividade satisfatória, é possível aferir que a bactéria Gram-negativa apresenta maior resistência devido à estrutura da sua membrana celular.

As CuNPs também provaram sua atividade bactericida, bem como sua superioridade em relação à amostra CuMPs em alguns casos. No combate a ambas as bactérias *S. aureus* e *E. coli*, na concentração de  $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$  as nanopartículas promoveram uma redução de 6 log da população bacteriana, tanto na ausência de luz como sob iluminação por luz branca, sem diferença estatística. Assim, é possível inferir que a escala nanométrica subjuga a influência da luz na atividade bactericida devido à maior razão entre superfície e volume, a qual, junto do elevado confinamento de elétrons, promove elevada reatividade que, na concentração testada, independe da iluminação.

Com as micropartículas de óxido de cobre em suspensão de  $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$  de concentração, a população bacteriana de *S. aureus* foi reduzida em até 99,9999% (6 log). Nos ensaios frente à *E. coli*, as Cu<sub>2</sub>OMPs promoverem ação bactericida superior às CuMPs. A suspensão de  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  eliminou toda a carga bacteriana, inclusive no escuro, e a suspensão de  $5 \text{ mg mL}^{-1}$ , apresentou uma redução logarítmica de 3,1 e 3,8 na ausência e na presença de luz, respectivamente, embora sem diferença estatística. Verificada a atividade fotocatalítica bactericida das partículas de cobre, principalmente das micropartículas, os resultados foram corroborados pelo ensaio de viabilidade por contagem celular utilizando o kit *LIVE/DEAD*<sup>®</sup> *BacLight*<sup>™</sup> *Bacterial Viability*.

Concluída essa primeira parte do trabalho, filmes compósitos à base de PVA foram sintetizados por *drop casting* com a incorporação das partículas de cobre, separadamente, e denominados por PVA-CuMPs, PVA-CuNPs e PVA-Cu<sub>2</sub>OMPs. Os filmes mantiveram a banda proibida na região visível do espectro, bem como os picos respectivos nos difratogramas de DRX. As bandas características do PVA foram identificadas FTIR. As micrografias apresentaram que a incorporação das partículas promoveu aumento da heterogeneidade do filme compósito, pois apesar da distribuição do material particulado ao longo de toda a superfície e profundidade, observou-se maior concentração de partículas na base do filme, mais evidente nos com micropartículas. Tais resultados foram confirmados pela análise de GDOES. Quanto ao comportamento térmico dos filmes, todos apresentaram perda de massa a partir de

220 °C, característica da eliminação do grupo hidroxila do PVA, seguida da decomposição do material ao ultrapassar 400 °C. Nos ensaios de molhabilidade, os filmes compósitos, apresentaram característica hidrofílica.

Adentrando aos ensaios bactericidas, o filme de PVA puro não demonstrou qualquer atividade frente à *S. aureus* e *E. coli*, enquanto os demais filmes compósitos, em ambas as condições de iluminação, apresentaram atividade biocida. Em 4 horas de incubação, a atividade bactericida do filme PVA-CuNPs atingiu 2 e 3 log de redução da população de *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente, enquanto os filmes PVA-CuMPs e PVA-Cu2OMPs mostraram redução de aproximadamente 1 log contra *S. aureus*, ambos sem diferença estatística entre as condições de iluminação. Após 24 horas, todos os filmes compósitos apresentaram redução acima de 7 log (> 99,9999%) frente à *S. aureus* e à *E. coli*, também em ambas as condições de iluminação.

Quanto à atividade virucida, apenas o filme PVA-CuMPs foi apresentou atividade após 30 minutos de incubação frente ao vírus envelopado coronavírus murino e apenas sob iluminação por luz branca. Assim, a partir do experimento ICC-RT-qPCR, tal atividade foi quantificada e, partindo das médias do controle viral e do tratamento, verificou-se que o filme compósito promoveu uma redução de 43,1% da carga viral quando iluminado por luz branca, e de 6,8% quando no escuro. Tal resultado prova a influência da luz na ação virucida de filmes compósitos a base de cobre.

Em resumo, o presente trabalho conseguiu comprovar a atividade fotocatalítica de partículas de cobre e de seus derivados no combate a microrganismos e vírus. Assim, o desenvolvimento dos filmes compósitos permanecerá em andamento para o aprimoramento do estudo de superfícies fotodesinfetantes, um tema de interesse mundial que vem ao encontro do combate da disseminação de patógenos via superfícies, principalmente as de toque comum.

## REFERÊNCIAS

- ABDELRAHMAN, Zeinab; LI, Mengyuan; WANG, Xiaosheng. Comparative Review of SARS-CoV-2, SARS-CoV, MERS-CoV, and Influenza A Respiratory Viruses. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 11, 2020. DOI: 10.3389/fimmu.2020.552909.
- AHMAD, Rafiq; WOLFBEIS, Otto S.; HAHN, Yoon-Bong; ALSHAREEF, Husam N.; TORSI, Luisa; SALAMA, Khaled N. Deposition of nanomaterials: A crucial step in biosensor fabrication. **Materials Today Communications**, [S. l.], v. 17, p. 289–321, 2018. DOI: 10.1016/j.mtcomm.2018.09.024.
- AKGUL, Funda Aksoy; AKGUL, Guvenc; YILDIRIM, Nurcan; UNALAN, Husnu Emrah; TURAN, Rasit. Influence of thermal annealing on microstructural, morphological, optical properties and surface electronic structure of copper oxide thin films. **Materials Chemistry and Physics**, [S. l.], v. 147, n. 3, p. 987–995, 2014. DOI: 10.1016/j.matchemphys.2014.06.047.
- ALSAAD, Ahmad; DAIRY, Abdul Raouf Al; AHMAD, Ahmad; QATTAN, Issam A.; FAWARES, Shatha Al; AL-BATAINEH, Qais. Synthesis and characterization of polymeric (PMMA-PVA) hybrid thin films doped with TiO<sub>2</sub> nanoparticles using dip-coating technique. **Crystals**, [S. l.], v. 11, n. 2, p. 1–21, 2021. DOI: 10.3390/cryst11020099.
- AMETA, Rakshit; SOLANKI, Meenakshi S.; BENJAMIN, Surbhi; AMETA, Suresh C. Photocatalysis. *In: Advanced Oxidation Processes for Waste Water Treatment*. [s.l.] : Elsevier, 2018. p. 135–175. DOI: 10.1016/b978-0-12-810499-6.00006-1.
- ANDRADE, Ana Cláudia dos Santos Pereira; CAMPOLINA-SILVA, Gabriel Henrique; QUEIROZ-JUNIOR, Celso Martins; OLIVEIRA, Leonardo Camilo De; LACERDA, Larisse de Souza Barbosa. A Biosafety Level 2 Mouse Model for Studying Betacoronavirus- Induced Acute Lung Damage and Systemic Manifestations. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 95, n. 22, p. e01276-21, 2021.
- ANVISA. **RESOLUÇÃO Nº 269, DE 22 DE SETEMBRO DE 2005**. Aprovar o “Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. 2005.
- ANVISA. **Programa Nacional de Prevenção e Controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde 2021 a 2025**. 2021. Disponível em: [https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/publicacoes/pnpciras\\_2021\\_2025.pdf](https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/publicacoes/pnpciras_2021_2025.pdf). Acesso em: 24 abr. 2023.
- AU, C. T.; ROBERTS, M. W. An XPS study of the influence of chemisorbed oxygen on the adsorption of ethylene and water vapour by Cu (110) and Cu (111) surfaces. **Journal de Chimie Physique**, [S. l.], v. 78, p. 921–926, 1981. DOI: 10.1051/jcp/1981780921.
- AZAM, Ameer; AHMED, Arham S.; OVES, M.; KHAN, M. S.; MEMIC, Adnan. Size-dependent antimicrobial properties of CuO nanoparticles against Gram-positive and -negative bacterial strains. **International Journal of Nanomedicine**, [S. l.], v. 7, p. 3527–3535, 2012. DOI: 10.2147/IJN.S29020.
- BAGHERI, Samira; JULKAPLI, Nurhidayatullaili Muhd; YUSOF HAMID, Mohd Rashid; ZIAEI, Rojin; SAGADEVAN, Suresh. Nanomaterials Aspects for Photocatalysis as Potential for the Inactivation of COVID-19 Virus. **Catalysts**, [S. l.], v. 13, n. 3, 2023. DOI: 10.3390/catal13030620.

BALASUBRAMANIAM, Bhuvaneshwari; PRATEEK; RANJAN, Sudhir; SARAF, Mohit; KAR, Prasenjit; SINGH, Surya Pratap; THAKUR, Vijay Kumar; SINGH, Anand; GUPTA, Raju Kumar. Antibacterial and Antiviral Functional Materials: Chemistry and Biological Activity toward Tackling COVID-19-like Pandemics. **ACS Pharmacology and Translational Science**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 8–54, 2021. DOI: 10.1021/acscptsci.0c00174.

BALASUBRAMANIAM, Mohana Priya; MURUGAN, Prasathkumar; CHENTHAMARA, Dhriya; RAMAKRISHNAN, Sankar Ganesh; SALIM, Anisha; LIN, Feng Huei; ROBERT, Becky; SUBRAMANIAM, Sadhasivam. Synthesis of chitosan-ferulic acid conjugated poly(vinyl alcohol) polymer film for an improved wound healing. **Materials Today Communications**, [S. l.], v. 25, n. November 2019, 2020. DOI: 10.1016/j.mtcomm.2020.101510.

BEARDEN, J. A. X-Ray Wavelengths. **Review of Modern Physics**, [S. l.], v. 39, n. 1, p. 78–124, 1967. DOI: 10.1088/0031-9120/5/2/001.

BEHZADINASAB, Saeed; CHIN, Alex; HOSSEINI, Mohsen; POON, Leo; DUCKER, William A. A Surface Coating that Rapidly Inactivates SARS-CoV-2. **ACS Applied Materials and Interfaces**, [S. l.], v. 12, n. 31, p. 34723–34727, 2020. DOI: 10.1021/acscami.0c11425.

BIESINGER, Mark C. Advanced analysis of copper X-ray photoelectron spectra. **Surface and Interface Analysis**, [S. l.], v. 49, n. 13, p. 1325–1334, 2017. DOI: 10.1002/sia.6239.

BIESINGER, Mark C. Accessing the robustness of adventitious carbon for charge referencing (correction) purposes in XPS analysis: Insights from a multi-user facility data review. **Applied Surface Science**, [S. l.], v. 597, p. 153681, 2022. DOI: 10.1016/j.apsusc.2022.153681.

BLATEYRON, François. The Areal Field Parameters. *In*: LEACH, Richard (org.). **Characterisation of areal surface texture**. [s.l.] : Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013. p. 15–43. DOI: 10.1007/978-3-642-36458-7\_2.

BOGDAN, Janusz; ZARZYŃSKA, Joanna; PŁAWIŃSKA-CZARNAK, Joanna. Comparison of Infectious Agents Susceptibility to Photocatalytic Effects of Nanosized Titanium and Zinc Oxides: A Practical Approach. **Nanoscale Research Letters**, [S. l.], v. 10, n. 1, 2015. DOI: 10.1186/s11671-015-1023-z.

BOJESTIG, Eric; CAO, Yu; NYBORG, Lars. Surface chemical analysis of copper powder used in additive manufacturing. **Surface and Interface Analysis**, [S. l.], v. 52, n. 12, p. 1104–1110, 2020. DOI: 10.1002/sia.6833.

BONDARENKO, Olesja; JUGANSON, Katre; IVASK, Angela; KASEMETS, Kaja; MORTIMER, Monika; KAHRU, Anne. Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: A critical review. **Archives of Toxicology**, [S. l.], v. 87, n. 7, p. 1181–1200, 2013. DOI: 10.1007/s00204-013-1079-4.

BORKOW, Gadi; GABBAY, Jeffrey. Putting copper into action: copper-impregnated products with potent biocidal activities. **The FASEB Journal**, [S. l.], v. 18, n. 14, p. 1728–1730, 2004. DOI: 10.1096/fj.04-2029fje.

BORKOW, Gadi; GABBAY, Jeffrey. Copper as a Biocidal Tool. **Current Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 12, n. 18, p. 2163–2175, 2005. DOI: 10.2174/0929867054637617.

BORKOW, Gadi; GABBAY, Jeffrey. Copper, An Ancient Remedy Returning to Fight Microbial, Fungal and Viral Infections. **Current Chemical Biology**, [S. l.], v. 3, n. 3, p. 272–278, 2009. DOI: 10.2174/187231309789054887.

- CAMACHO-ESPINOSA, E.; RIMMAUDO, I.; RIECH, I.; MIS-FERNÁNDEZ, R.; PEÑA, J. L. Stability of sputter deposited cuprous oxide (Cu<sub>2</sub>O) subjected to ageing conditions for photovoltaic applications. **Journal of Applied Physics**, [S. l.], v. 123, p. 085301, 2018. DOI: 10.1063/1.5017538.
- CAMPBELL, Zachary S. et al. Facile Synthesis of Cu-Doped TiO<sub>2</sub> Particles for Accelerated Visible Light-Driven Antiviral and Antibacterial Inactivation. **ACS Applied Engineering Materials**, [S. l.], v. 2, n. 5, p. 1411–1423, 2024. DOI: 10.1021/acsaenm.4c00176.
- CHALAYON, Pachara; TANGWONGSAN, Chanchana. Antibacterial effects of Copper Microparticles/Copper Nanoparticles/Copper(II) Oxide Nanoparticles and Copper Microparticles/Copper Nanoparticles/Copper(I) Oxide Nanoparticles from Ultrasono-Electrochemical with Hydrothermal assisted synthesis method. **Engineering Journal**, [S. l.], v. 25, n. 6, p. 55–66, 2021. DOI: 10.4186/ej.2021.25.6.55.
- CHAN, George H.; ZHAO, Jing; HICKS, Erin M.; SCHATZ, George C.; VAN DUYN, Richard P. Plasmonic properties of copper nanoparticles fabricated by nanosphere lithography. **Nano Letters**, [S. l.], v. 7, n. 7, p. 1947–1952, 2007. DOI: 10.1021/nl070648a.
- CHATTERJEE, Arijit Kumar; CHAKRABORTY, Ruchira; BASU, Tarakdas. Mechanism of antibacterial activity of copper nanoparticles. **Nanotechnology**, [S. l.], v. 25, p. 135101, 2014. DOI: 10.1088/0957-4484/25/13/135101.
- CHATTERJEE, Soumyo; SAHA, Sudip K.; PAL, Amlan J. Formation of all-oxide solar cells in atmospheric condition based on Cu<sub>2</sub>O thin-films grown through SILAR technique. **Solar Energy Materials and Solar Cells**, [S. l.], v. 147, p. 17–26, 2016. DOI: 10.1016/j.solmat.2015.11.045.
- CHAVES, Carolina De Andrade Lima; DE SOUZA COSTA, Carlos Alberto; VERGANI, Carlos Eduardo; CHAVES DE SOUZA, Pedro Paulo; MACHADO, Ana Lucia. Effects of Soft Denture Liners on L929 Fibroblasts, HaCaT Keratinocytes, and RAW 264.7 Macrophages. **BioMed Research International**, [S. l.], v. 2014, 2014. DOI: 10.1155/2014/840613.
- CHEN, Shiguo; GUO, Yujuan; GE, Zaochuan; YANG, Haipeng; TANG, Jiaoning. Fabrication of Cu/TiO<sub>2</sub> nanocomposite: Toward an enhanced antibacterial performance in the absence of light. **Materials Letters**, [S. l.], v. 83, p. 154–157, 2012. DOI: 10.1016/j.matlet.2012.06.007.
- CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition** Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, Pennsylvania, USA, 2015.
- COLMENARES, J. C.; XU, Yi-Jun. **Heterogeneous Photocatalysis: from Fundamentals to Green Applications**. 1. ed. [s.l.] : Springer, 2016. DOI: 10.1007/978-3-662-48719-8.
- DEV KUMAR, Govindaraj; MISHRA, Abhinav; DUNN, Laurel; TOWNSEND, Anna; OGUADINMA, Ikechukwu Chukwuma; BRIGHT, Kelly R.; GERBA, Charles P. Biocides and Novel Antimicrobial Agents for the Mitigation of Coronaviruses. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 11, n. June, p. 1–12, 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01351.
- DEY, Urmimala; MITRA, Nilanjan; TARAPHER, A. Body centered phase of Cu at high temperature and pressure. **Materials Science**, [S. l.], n. August, p. 109154, 2018. DOI: 10.1016/j.commatsci.2019.109154.
- DÍAZ-PUERTAS, Rocío; RODRÍGUEZ-CAÑAS, Enrique; BELLO-PEREZ, Melissa; FERNÁNDEZ-OLIVER, Marta; MALLAVIA, Ricardo; FALCO, Alberto. Viricidal Activity of Thermoplastic Polyurethane Materials with Silver Nanoparticles. **Nanomaterials**, [S. l.], v. 13, n. 9, p. 1467, 2023.

DOREMALEN, Neeltje Van et al. Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 382, n. 16, p. 1564–1567, 2020. DOI: 10.1056/NEJMc2004973.

ELIAS, Silvia T.; DOS SANTOS, Andressa F.; GARCIA, Fernanda C. P.; PEREIRA, Patricia N. R.; HILGERT, Leandro A.; FONSECA-BAZZO, Yris M.; GUERRA, Eliete N. S.; RIBEIRO, Ana Paula Dias. Cytotoxicity of universal, self-etching and etch-and-rinse adhesive systems according to the polymerization time. **Brazilian Dental Journal**, [S. l.], v. 26, n. 2, p. 160–168, 2015. DOI: 10.1590/0103-6440201300294.

EPA. **Product Performance Test Guidelines: OCSPP 810.2200 Disinfectants for Use on Hard Surfaces-Efficacy Data Recommendations [EPA 712-C-07-074]**. 2012. Disponível em: <https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPPT-2009-0150-0021>. Acesso em: 26 jun. 2022.

FAIRLEY, Neal; FERNANDEZ, Vincent; RICHARD-PLOUET, Mireille; GUILLOT-DEUDON, Catherine; WALTON, John; EMILY SMITH, DELPHINE FLAHAUT, MARK GREINER, MARK BIESINGER, SVEN TOUGAARD, DAVID MORGAN, Jonas Baltrusaitis. Systematic and collaborative approach to problem solving using X-ray photoelectron spectroscopy. **Applied Surface Science Advances**, [S. l.], v. 5, p. 100112, 2021. DOI: 10.1016/j.apsadv.2021.100112.

FERNANDEZ, Vincent; KIANI, Daniyal; FAIRLEY, Neal; FELPIN, François Xavier; BALTRUSAITIS, Jonas. Curve fitting complex X-ray photoelectron spectra of graphite-supported copper nanoparticles using informed line shapes. **Applied Surface Science**, [S. l.], v. 505, p. 143841, 2020. DOI: 10.1016/j.apsusc.2019.143841.

FLINT, J.; RACANIELLO, Vincent R.; RAL, Glenn F.; SKALKA, Anna Marie; FLINT, S. Jane; ENQUIST, Lynn W. **Principles of Virology**. 4. ed. [s.l.] : ASM Press, 2015.

FUJISHIMA, AKIRA; HONDA, KENICHI. Electrochemical Photolysis of Water at a Semiconductor Electrode. **Nature**, [S. l.], v. 238, n. 5358, p. 38–40, 1972. DOI: 10.1038/238038a0.

GHOSH, S. **Visible-Light-Active Photocatalysis: Nanostructured Catalyst Design, Mechanisms, and Applications**. 1. ed. [s.l.] : Wiley-VCH, 2018.

GIANNOUSI, K.; LAFAZANIS, K.; ARVANITIDIS, J.; PANTAZAKI, A.; DENDRINOUSAMARA, C. Hydrothermal synthesis of copper based nanoparticles: Antimicrobial screening and interaction with DNA. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [S. l.], v. 133, p. 24–32, 2014. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2013.12.009.

GRASS, Gregor; RENSING, Christopher; SOLIOZ, Marc. Metallic copper as an antimicrobial surface. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 77, n. 5, p. 1541–1547, 2011. DOI: 10.1128/AEM.02766-10.

HAIPOUR, Pejman; ESLAMI, Abdoulmajid; BAHRAMI, Abbas; HOSSEINI-ABARI, Afrouzossadat; SABER, Fateme Yousef; MOHAMMADI, Roshanak; YAZDAN MEHR, Maryam. Surface modification of TiO<sub>2</sub> nanoparticles with CuO for visible-light antibacterial applications and photocatalytic degradation of antibiotics. **Ceramics International**, [S. l.], v. 47, n. 23, p. 33875–33885, 2021. DOI: 10.1016/j.ceramint.2021.08.300.

HASAN, Mohammed Adnan; ESTHER, A. Carmel Mary; DEY, Arjun; MUKHOPADHYAY, Anoop Kumar. A review on coronavirus survivability on material's surfaces: present research scenarios, technologies and future directions. **Surface Engineering**, [S. l.], v. 36, n. 12, p. 1–15, 2020. DOI: 10.1080/02670844.2020.1833277.



HASHEM, Amr H.; EL-NAGGAR, Mehrez E.; ABDELAZIZ, Amer M.; ABDELBARY, Salah; HASSAN, Youssef R.; HASANIN, Mohamed S. Bio-based antimicrobial food packaging films based on hydroxypropyl starch/polyvinyl alcohol loaded with the biosynthesized zinc oxide nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 249, n. July, 2023. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2023.126011.

HASSAN, Iman A.; SATHASIVAM, Sanjayan; NAIR, Sean P.; CARMALT, Claire J. Antimicrobial Properties of Copper-Doped ZnO Coatings under Darkness and White Light Illumination. **ACS Omega**, [S. l.], v. 2, n. 8, p. 4556–4562, 2017. DOI: 10.1021/acsomega.7b00759.

HODEK, Jan; ZAJÍCOVÁ, Veronika; LOVETINSKÁ-ŠLAMBOROVÁ, Irena; STIBOR, Ivan; MÜLLEROVÁ, Jana; WEBER, Jan. Protective hybrid coating containing silver, copper and zinc cations effective against human immunodeficiency virus and other enveloped viruses. **BMC Microbiology**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 1–12, 2016. DOI: 10.1186/s12866-016-0675-x.

HOU, Wenbo; CRONIN, Stephen B. A review of surface plasmon resonance-enhanced photocatalysis. **Advanced Functional Materials**, [S. l.], v. 23, n. 13, p. 1612–1619, 2012. DOI: 10.1002/adfm.201202148.

HUANG, Haiyue et al. COVID-19: A Call for Physical Scientists and Engineers. **ACS Nano**, [S. l.], 2020. DOI: 10.1021/acsnano.0c02618.

HUANG, Mao Chia; WANG, Tsinghai; CHANG, Wen Sheng; LIN, Jing Chie; WU, Ching Chen; CHEN, I. Chen; PENG, Kun Cheng; LEE, Sheng Wei. Temperature dependence on p-Cu<sub>2</sub>O thin film electrochemically deposited onto copper substrate. **Applied Surface Science**, [S. l.], v. 301, p. 369–377, 2014. DOI: 10.1016/j.apsusc.2014.02.085.

HUO, Hailing; LIU, Dong; FENG, Hao; TIAN, Zhihong; LIU, Xuan; LI, Ang. Double-shelled Cu<sub>2</sub>O/MnO: Xmesoporous hollow structure for CO<sub>2</sub> photoreduction with enhanced stability and activity. **Nanoscale**, [S. l.], v. 12, n. 26, p. 13912–13917, 2020. DOI: 10.1039/d0nr02944k.

ICTV. **Coronaviridae**. 2022. Disponível em: [https://ictv.global/report\\_9th/RNApos/Nidovirales/Coronaviridae](https://ictv.global/report_9th/RNApos/Nidovirales/Coronaviridae). Acesso em: 29 out. 2022.

IMANI, Sara M.; LADOUCEUR, Liane; MARSHALL, Terrel; MACLACHLAN, Roderick; SOLEYMANI, Leyla; DIDAR, Tohid F. Antimicrobial nanomaterials and coatings: Current mechanisms and future perspectives to control the spread of viruses including SARS-CoV-2. **ACS Nano**, [S. l.], v. 14, n. 10, p. 12341–12369, 2020. DOI: 10.1021/acsnano.0c05937.

ISO 10993-5. **Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity** International Organization for Standardization. [s.l.: s.n.].

ISO 21702. **Measurement of antiviral activity on plastics and other non-porous surfaces**. 2019. Disponível em: <https://www.iso.org/standard/71365.html>.

JAMOVI. **The jamovi project [Computer Software]**. 2022. Disponível em: <https://jamovi.org>.

JANA, Indrani et al. Copper Nanoparticle–Graphene Composite-Based Transparent Surface Coating with Antiviral Activity against Influenza Virus. **ACS Appl. Nano Mater.**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 352–362, 2021. DOI: 10.1021/acsanm.0c02713.

JAVADHESARI, S. M.; ALIPOUR, S.; MOHAMMADNEJAD, S.; AKBARPOUR, M. R. Antibacterial activity of ultra-small copper oxide (II) nanoparticles synthesized by mechanochemical processing against *S. aureus* and *E. coli*. **Materials Science and Engineering C**, [S. l.], v. 105, p. 110011, 2019. DOI: 10.1016/j.msec.2019.110011.

JIMENEZ, M. J. M.; ANTUNES, V.; CUCATTI, S.; RIUL, A.; ZAGONEL, L. F.; FIGUEROA, C. A.; WISNIVESKY, D.; ALVAREZ, F. Physical and micro-nano-structure properties of chromium nitride coating deposited by RF sputtering using dynamic glancing angle deposition. **Surface and Coatings Technology**, [S. l.], v. 372, p. 268–277, 2019. DOI: 10.1016/j.surfcoat.2019.05.023.

KAMPF, G.; TODT, D.; PFAENDER, S.; STEINMANN, E. Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents. **Journal of Hospital Infection**, [S. l.], v. 104, n. 3, p. 246–251, 2020. DOI: 10.1016/j.jhin.2020.01.022.

KOCH, Anne Mette; NILSEN, Roy Miodini; ERIKSEN, Hanne Merete; COX, Rebecca Jane; HARTHUG, Stig. Mortality related to hospital-associated infections in a tertiary hospital; repeated cross-sectional studies between 2004–2011. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 1–8, 2015. DOI: 10.1186/s13756-015-0097-9.

KOCIOŁEK-BALAWAJDER, Elżbieta; STANISŁAWSKA, Ewa; DWORNICZEK, Ewa; SENIUK, Alicja; JACUKOWICZ-SOBALA, Irena; WINIARSKA, Katarzyna. Cu<sub>2</sub>O doped gel-type anion exchanger obtained by reduction of brochantite deposit and its antimicrobial activity. **Reactive and Functional Polymers**, [S. l.], v. 141, p. 42–49, 2019. DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2019.05.006.

KUBO, Anna Liisa et al. Antibacterial and Antiviral Effects of Ag, Cu and Zn Metals, Respective Nanoparticles and Filter Materials Thereof against Coronavirus SARS-CoV-2 and Influenza A Virus. **Pharmaceutics**, [S. l.], v. 14, n. 12, p. 1–19, 2022. DOI: 10.3390/pharmaceutics14122549.

LAL, Sunil K. **Molecular Biology of the SARS-Coronavirus**. 1. ed. [s.l.] : Springer, 2010. DOI: 10.1007/978-3-642-03683-5.

LASOCKA, Iwona; SZULC-D, Lidia; SKIBNIEWSKA, Ewa; PASTERNAK, Iwona; KMIE, Hubert. Toxicology in Vitro Biocompatibility of pristine graphene monolayer: Scaffold for fibroblasts. **Toxicology in Vitro**, [S. l.], v. 48, p. 276–285, 2018.

LEMRAKSI, Ensieh Ghasemian; JAHANGIRIAN, Hossein; DASHTI, Maryam; KHAJEHALI, Elaheh; SHARAFINIA, Soheila; MOGHADDAM, Roshanak Rafiee; WEBSTER, Thomas J. Antimicrobial double-layer wound dressing based on chitosan/polyvinyl alcohol/copper: In vitro and in vivo assessment. **International Journal of Nanomedicine**, [S. l.], v. 16, p. 223–235, 2021. DOI: 10.2147/IJN.S266692.

LI, Binjie; LI, Yuanyuan; ZHAO, Yanbao; SUN, Lei. Shape-controlled synthesis of Cu<sub>2</sub>O nano/microcrystals and their antibacterial activity. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, [S. l.], v. 74, n. 12, p. 1842–1847, 2013. DOI: 10.1016/j.jpics.2013.07.017.

LIU, Shuo; WANG, Yan-mei; HAN, Jie. Fluorescent chemosensors for copper(II) ion: Structure, mechanism and application. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, [S. l.], v. 32, p. 78–103, 2017. DOI: 10.1016/j.jphotochemrev.2017.06.002.

LOUTFY, Samah A.; ELBERRY, Mostafa H.; FARROH, Khaled Yehia; MOHAMED, Hossam Taha; MOHAMED, Aya A.; MOHAMED, Elchaimaa B.; FARAAG, Ahmed Hassan Ibrahim; MOUSA, Shaker A. Antiviral activity of chitosan nanoparticles encapsulating curcumin against hepatitis C virus genotype 4a in human hepatoma cell lines. **International Journal of Nanomedicine**, [S. l.], v. 15, p. 2699–2715, 2020. DOI: 10.2147/IJN.S241702.

MA, Jiaxin; ZHANG, Qiong; HONG, Liu; XIE, Yuhua; YANG, Zehui; XU, Yongliang; WANG, Qiang; ZHOU, Yonghua; YANG, Cheng. Controllable synthesis of ultrasmall copper nanoparticles decorated fullerene composite for antibacterial application and wound healing under visible light. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [*S. l.*], v. 654, p. 130097, 2022. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2022.130097.

MADIGAN, Michael T.; BENDER, Kelly S.; BUCKLEY, Daniel H.; SATTLEY, W. Matthew; STAHL, David A. **Brock Biology Of Microorganisms**. 15. ed. [s.l.] : Pearson Education, 2019.

MADURAY, Kaminee; PARBOOSING, Raveen. Metal Nanoparticles: a Promising Treatment for Viral and Arboviral Infections. **Biological Trace Element Research**, [*S. l.*], 2020. DOI: 10.1007/s12011-020-02414-2.

MAJUMDAR, Tapodhara Datta; SINGH, Mukesh; THAPA, Mala; DUTTA, Moumita; MUKHERJEE, Abhishek; GHOSH, Chandan Kumar. Size-dependent antibacterial activity of copper nanoparticles against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* – A synthetic and mechanistic approach. **Colloids and Interface Science Communications**, [*S. l.*], v. 32, n. July, p. 100190, 2019. DOI: 10.1016/j.colcom.2019.100190.

MANSUR, Herman S.; DE S. COSTA JR., Ezequiel; MANSUR, Alexandra A. P.; BARBOSA-STANCIOLI, Edel Figueiredo. Cytocompatibility evaluation in cell-culture systems of chemically crosslinked chitosan/PVA hydrogels. **Materials Science and Engineering C**, [*S. l.*], v. 29, n. 5, p. 1574–1583, 2009. DOI: 10.1016/j.msec.2008.12.012.

MATHEW, Snehamol; GANGULY, Priyanka; RHATIGAN, Stephen; KUMARAVEL, Vignesh; BYRNE, Ciara; HINDER, Steven J.; BARTLETT, John; NOLAN, Michael; PILLAI, Suresh C. Cu-Doped TiO<sub>2</sub>: Visible light assisted photocatalytic antimicrobial activity. **Applied Sciences (Switzerland)**, [*S. l.*], v. 8, n. 11, p. 2067, 2018. DOI: 10.3390/app8112067.

MAZURKOVA, N. A.; SPITSYNA, Yu E.; SHIKINA, N. V.; ISMAGILOV, Z. R.; ZAGREBEL'NYI, S. N.; RYABCHIKOVA, E. I. Interaction of titanium dioxide nanoparticles with influenza virus. **Nanotechnologies in Russia**, [*S. l.*], v. 5, n. 5–6, p. 417–420, 2010. DOI: 10.1134/S1995078010050174.

MCEVOY, Joanne Gamage; ZHANG, Zisheng. Antimicrobial and photocatalytic disinfection mechanisms in silver-modified photocatalysts under dark and light conditions. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, [*S. l.*], v. 19, p. 62–75, 2014. DOI: 10.1016/j.jphotochemrev.2014.01.001.

MIHUT, Dorina M.; AFSHAR, Arash; LACKEY, Laura W.; LE, Khang N. Antibacterial effectiveness of metallic nanoparticles deposited on water filter paper by magnetron sputtering. **Surface and Coatings Technology**, [*S. l.*], v. 368, n. July 2018, p. 59–66, 2019. DOI: 10.1016/j.surfcoat.2019.04.039.

MINOSHIMA, Masafumi; LU, Yue; KIMURA, Takuto; NAKANO, Ryuichi; ISHIGURO, Hitoshi; KUBOTA, Yoshinobu; HASHIMOTO, Kazuhito; SUNADA, Kayano. Comparison of the antiviral effect of solid-state copper and silver compounds. **Journal of Hazardous Materials**, [*S. l.*], v. 312, p. 1–7, 2016. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2016.03.023.

MIRANDA, Cristian; CASTAÑO, Johanna; VALDEBENITO-ROLACK, Emky; SANHUEZA, Felipe; TORO, Rody; BELLO-TOLEDO, Helia; UARAC, Patricio; SAEZ, Luciano. Copper-Polyurethane Composite Materials: Particle Size Effect on the Physical-Chemical and Antibacterial Properties. **Polymers**, [*S. l.*], v. 12, n. 9, p. 1934, 2020. DOI: 10.3390/polym12091934.

- MIYAUCHI, M.; SUNADA, K.; HASHIMOTO, K. Antiviral Effect of Visible Light-Sensitive  $\text{Cu}_x\text{O}/\text{TiO}_2$  Photocatalyst. **Catalysts**, [S. l.], v. 10, p. 1093, 2020. DOI: 10.3390/catal10091093.
- MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, [S. l.], v. 65, p. 55–63, 1983. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.
- MOULDER, J. F.; STICKLE, W. F.; SOBOL, P. E.; BOMBEN, K. D. **Handbook of X-Ray Photoelectron Spectroscopy**. Eden Prairie: Perkin-Elmer Corp., 1992.
- MYRICK, Michael L.; SIMCOCK, Michael N.; BARANOWSKI, Megan; BROOKE, Heather; MORGAN, Stephen L.; MCCUTCHEON, Jessica N. The Kubelka-Munk Diffuse Reflectance Formula Revisited. **Applied Spectroscopy Reviews**, [S. l.], v. 46, p. 140–165, 2011. DOI: 10.1080/05704928.2010.537004.
- NADJIB, Boukhatem Mohamed. Effective Antiviral Activity of Essential Oils and their Characteristics Terpenes against Coronaviruses: An Update. **Journal of Pharmacology and Clinical Toxicology**, [S. l.], v. 8, n. 1138, p. 1–8, 2020.
- OTTER, Jonathan A.; YEZLI, Saber; FRENCH, Gary L. The Role Played by Contaminated Surfaces in the Transmission of Nosocomial Pathogens. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, [S. l.], v. 32, n. 7, p. 687–699, 2011. DOI: 10.1086/660363.
- PAJARES-CHAMORRO, Natalia; SHOOK, John; HAMMER, Neal D.; CHATZISTAVROU, Xanthippi. Resurrection of antibiotics that methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resists by silver-doped bioactive glass-ceramic microparticles. **Acta Biomaterialia**, [S. l.], v. 96, p. 537–546, 2019. DOI: 10.1016/j.actbio.2019.07.012.
- PALZA, Humberto; QUIJADA, Raúl; DELGADO, Katherine. Antimicrobial polymer composites with copper micro- and nanoparticles: Effect of particle size and polymer matrix. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, [S. l.], v. 30, n. 4, p. 366–380, 2015. DOI: 10.1177/0883911515578870.
- PANDEY, Nil Kanatha et al. A facile method for the synthesis of copper-cysteamine nanoparticles and study of ROS production for cancer treatment. **Journal of Materials Chemistry B**, [S. l.], v. 7, n. 42, p. 6630–6642, 2019. DOI: 10.1039/c9tb01566c.
- PARRA-ORTIZ, Elisa; MALMSTEN, Martin. Photocatalytic nanoparticles – From membrane interactions to antimicrobial and antiviral effects. **Advances in Colloid and Interface Science**, [S. l.], v. 299, p. 102526, 2022. DOI: 10.1016/j.cis.2021.102526.
- PATEL, A.; CHARANI, E.; ARIYANAYAGAM, D.; ABDULAAL, A.; DENNY, S. J.; MUGHAL, N.; MOORE, L. S. P. New-onset anosmia and ageusia in adult patients diagnosed with SARS-CoV-2 infection. **Clinical Microbiology and Infection**, [S. l.], v. 26, n. 9, p. 1236–1241, 2020. DOI: 10.1016/j.cmi.2020.05.026.
- PENG, Cheng; SHEN, Chensi; ZHENG, Siyuan; YANG, Weiling; HU, Hang; LIU, Jianshe; SHI, Jiyan. Transformation of  $\text{CuO}$  Nanoparticles in the Aquatic Environment: Influence of pH, Electrolytes and Natural Organic Matter. **Nanomaterials**, [S. l.], v. 7, n. 10, p. 326, 2017. DOI: 10.3390/nano7100326.
- PIGEOT-RÉMY, S.; SIMONET, F.; ERRAZURIZ-CERDA, E.; LAZZARONI, J. C.; ATLAN, D.; GUILLARD, C. Photocatalysis and disinfection of water: Identification of potential bacterial targets. **Applied Catalysis B: Environmental**, [S. l.], v. 104, n. 3–4, p. 390–398, 2011. DOI: 10.1016/j.apcatb.2011.03.001.

POGGIO, Claudio; COLOMBO, Marco; ARCIOLA, Carla Renata; GREGGI, Tiziana; SCRIBANTE, Andrea; DAGNA, Alberto. Copper-alloy surfaces and cleaning regimens against the spread of SARS-CoV-2 in dentistry and orthopedics. From fomites to anti-infective nanocoatings. **Materials**, [S. l.], v. 13, n. 15, p. 1–12, 2020. DOI: 10.3390/ma13153244.

PRÄBST, Konstantin; ENGELHARDT, Hannes; RINGGELER, Stefan; HÜBNER, Holger. Basic colorimetric proliferation assays: MTT, WST, and resazurin. In: **Cell Viability Assays**. 1. ed. New York: Humana Press, 2017. v. 1601p. 1–17. DOI: 10.1007/978-1-4939-6960-9\_1.

PRASHER, Parteek; SHARMA, Mousmee. Nanotechnology-based self-sterilizing surfaces and their potential in combating COVID-19. **Nanomedicine**, [S. l.], v. 16, n. 14, p. 1183–1186, 2021. DOI: 10.2217/nnm-2021-0079.

PULIT-PROCIAK, Jolanta; STAROŃ, Anita; STAROŃ, Paweł; CHMIELOWIEC-KORZENIOWSKA, Anna; DRABIK, Agata; TYMCZYNA, Leszek; BANACH, Marcin. Preparation and of PVA-based compositions with embedded silver, copper and zinc oxide nanoparticles and assessment of their antibacterial properties. **Journal of Nanobiotechnology**, [S. l.], v. 18, n. 148, p. 1–14, 2020. DOI: 10.1186/s12951-020-00702-6.

RADTKE, Aleksandra; TOPOLSKI, Adrian; JĘDRZEJEWSKI, Tomasz; KOZAK, Wiesław; SADOWSKA, Beata; WIĘCKOWSKA-SZAKIEL, Marzena; PISZCZEK, Piotr. Bioactivity studies on titania coatings and the estimation of their usefulness in the modification of implant surfaces. **Nanomaterials**, [S. l.], v. 7, n. 4, p. 1–18, 2017. DOI: 10.3390/nano7040090.

RAJENDRAN, S.; MUKHERJEE, A.; NGUYEN, T. A.; GODUGU, C.; SHUKLA, R. K. **NANOTOXICITY: PREVENTION AND ANTIBACTERIAL APPLICATIONS OF NANOMATERIALS**. 1. ed. [s.l.] : Elsevier Inc., 2020. v. 7 DOI: 10.1016/C2018-0-05517-6.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. **The American Journal of Hygiene**, [S. l.], v. 27, n. 3, p. 493–497, 1938. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a118408.

REINA, Giacomo; PENG, Shiyuan; JACQUEMIN, Lucas; ANDRADE, Andrés Felipe; BIANCO, Alberto. Hard Nanomaterials in Time of Viral Pandemics. **ACS Nano**, [S. l.], v. 14, n. 8, p. 9364–9388, 2020. DOI: 10.1021/acsnano.0c04117.

REZAEI, Azadeh; MAHMOODI, Mehdi; MOHAMMADIZADEH, Fatemeh; MOHAMADI, Maryam; HAJIZADEH, Mohammad Reza; MIRZAEI, Mohammad Reza; KHANAMANI FALAHATI-POUR, Soudeh. A novel copper (II) complex activated both extrinsic and intrinsic apoptotic pathways in liver cancerous cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, [S. l.], v. 120, n. 8, p. 12280–12289, 2019. DOI: 10.1002/jcb.28491.

RIBEIRO, Vanda Ferreira; CARDOSO, Erton; SIMÕES, Douglas Naue; PITTOL, Michele; TOMACHESKI, Daiane; SANTANA, Ruth Marlene Compomanes. Use of copper microparticles in SEBS/PP compounds. Part 1: Effects on morphology, thermal, physical, mechanical and antibacterial properties. **Materials Research**, [S. l.], v. 22, n. 2, p. e20180304, 2019. DOI: 10.1590/1980-5373-MR-2018-0304.

RICHARDSON, Susan D. Disinfection by-products and other emerging contaminants in drinking water. **Trends in Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 22, n. 10, p. 666–684, 2003. DOI: 10.1016/S0165-9936(03)01003-3.

RIES, Ananda Segabinazzi; CARGNELUTTI, Juliana Felipetto; BASSO, Giovana; ACUNHA, Thiago Vargas; IGLESIAS, Bernardo Almeida; FLORES, Eduardo Furtado; WEIBLEN, Rudi. Water-soluble tetra-cationic porphyrins display virucidal activity against Bovine adenovirus and Bovine alphaherpesvirus 1. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, [S. l.], v. 31, n. May, 2020. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2020.101947.

RODRIGUES, Melissa Machado; FONTOURA, Cristian Padilha; GARCIA, Charlene Silvestrin Celi; MARTINS, Sandro Tomaz; HENRIQUES, João Antonio Pêgas; FIGUEROA, Carlos Alejandro; ROESCH-ELY, Mariana; AGUZZOLI, Cesar. Investigation of plasma treatment on UHMWPE surfaces: Impact on physicochemical properties, sterilization and fibroblastic adhesion. **Materials Science and Engineering C**, [S. l.], v. 102, n. March, p. 264–275, 2019. DOI: 10.1016/j.msec.2019.04.048.

RTIMI, Sami; KIWI, John. Recent advances on sputtered films with Cu in ppm concentrations leading to an acceleration of the bacterial inactivation. **Catalysis Today**, [S. l.], v. 340, p. 347–362, 2020. DOI: 10.1016/j.cattod.2018.06.016.

SAHAI, Anshuman; GOSWAMI, Navendu; KAUSHIK, S. D.; TRIPATHI, Shilpa. Cu/Cu<sub>2</sub>O/CuO nanoparticles: Novel synthesis by exploding wire technique and extensive characterization. **Applied Surface Science**, [S. l.], v. 390, p. 974–983, 2016. DOI: 10.1016/j.apsusc.2016.09.005.

SAKARKAR, Shruti; MUTHUKUMARAN, Shobha; JEGATHEESAN, Veeriah. Evaluation of polyvinyl alcohol (PVA) loading in the PVA/titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) thin film coating on polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane for the removal of textile dyes. **Chemosphere**, [S. l.], v. 257, 2020. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.127144.

SALGADO, Cassandra D.; SEPKOWITZ, Kent A.; JOHN, Joseph F.; CANTEY, J. Robert; ATTAWAY, Hubert H.; FREEMAN, Katherine D.; SHARPE, Peter A.; MICHELS, Harold T.; SCHMIDT, Michael G. Copper Surfaces Reduce the Rate of Healthcare-Acquired Infections in the Intensive Care Unit. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, [S. l.], v. 34, n. 5, p. 479–486, 2013. DOI: 10.1086/670207.

SANDER, T.; REINDL, C. T.; GIAR, M.; EIFERT, B.; HEINEMANN, M.; HEILIGER, C.; KLAR, P. J. Correlation of intrinsic point defects and the Raman modes of cuprous oxide. **Physical Review B - Condensed Matter and Materials Physics**, [S. l.], v. 90, n. 4, p. 1–8, 2014. DOI: 10.1103/PhysRevB.90.045203.

SAWANT, Sachin S.; BHAGWAT, Ashok D.; MAHAJAN, Chandrashekhar M. Novel facile technique for synthesis of stable cuprous oxide (Cu<sub>2</sub>O) nanoparticles - An ageing effect. **Journal of Nano- and Electronic Physics**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 01036, 2016. DOI: 10.21272/jnep.8(1).01036.

SCHIO, Aline Lucchesi; MICHELS, Alexandre Fassini; FONGARO, Gislaine; FIGUEROA, Carlos Alejandro. Trends in the Antiviral Chemical Activity of Material Surfaces Associated With the SARS-CoV-2 Outbreak. **Frontiers in Chemical Engineering**, [S. l.], v. 3, p. 1–6, 2021. DOI: 10.3389/fceng.2021.636075.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, [S. l.], v. 9, n. 7, p. 671–675, 2012. DOI: 10.1038/nmeth.2089.

SHARIFAHMADIAN, O.; SALIMIJAZI, H. R.; FATHI, M. H.; MOSTAGHIMI, J.; PERSHIN, L. Relationship between surface properties and antibacterial behavior of wire arc spray copper coatings. **Surface and Coatings Technology**, [S. l.], v. 233, p. 74–79, 2013. DOI: 10.1016/j.surfcoat.2013.01.060.

SJOLLEMA, Jelmer; ZAAT, Sebastian A. J.; FONTAINE, Veronique; RAMSTEDT, Madeleine; LUGINBUEHL, Reto; THEVISSSEN, Karin; LI, Jiuyi; VAN DER MEI, Henny C.; BUSSCHER, Henk J. In vitro methods for the evaluation of antimicrobial surface designs. **Acta Biomaterialia**, [S. l.], v. 70, p. 12–24, 2018. DOI: 10.1016/j.actbio.2018.02.001.

SONI, Vatika; KHOSLA, Atul; SINGH, Pardeep; NGUYEN, Van Huy; LE, Quyet Van; SELVASEMBIAN, Rangabhashiyam; HUSSAIN, Chaudhery Mustansar; THAKUR, Sourbh; RAIZADA, Pankaj. Current perspective in metal oxide based photocatalysts for virus disinfection: A review. **Journal of Environmental Management**, [S. l.], v. 308, n. October 2021, 2022. DOI: 10.1016/j.jenvman.2022.114617.

TILLEY, R. J. D. **Colour and the optical properties of materials: an exploration of the relationship between light, the optical properties of materials and colour**. 2. ed. West Sussex: John Wiley & Sons, Ltd, 2010. DOI: 10.1002/9780470974773.

TORTORA, G. J.; FINKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiology: An Introduction**. 13. ed. Boston: Pearson Education, 2019.

TRANQUILLO, Elisabetta; BOLLINO, Flavia. Surface modifications for implants lifetime extension: An overview of sol-gel coatings. **Coatings**, [S. l.], v. 10, n. 6, 2020. DOI: 10.3390/coatings10060589.

VINCENT, M.; DUVAL, R. E.; HARTEMANN, P.; ENGELS-DEUTSCH, M. Contact killing and antimicrobial properties of copper. **Journal of Applied Microbiology**, [S. l.], v. 124, n. 5, p. 1032–1046, 2018. DOI: 10.1111/jam.13681.

WAGNER, C. D.; DAVIS, L. E.; ZELLER, M. V.; TAYLOR, J. A.; RAYMOND, R. H.; GALE, L. H. Empirical atomic sensitivity factors for quantitative analysis by electron spectroscopy for chemical analysis. **Surface and Interface Analysis**, [S. l.], v. 3, n. 5, p. 211–225, 1981. DOI: 10.1002/sia.740030506.

WARNES, Sarah L.; KEEVIL, C. William. Inactivation of Norovirus on Dry Copper Alloy Surfaces. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 8, n. 9, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0075017.

WEAVER, L.; NOYCE, J. O.; MICHELS, H. T.; KEEVIL, C. W. Potential action of copper surfaces on meticillin-resistant Staphylococcus aureus. **Journal of Applied Microbiology**, [S. l.], v. 109, n. 6, p. 2200–2205, 2010. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2010.04852.x.

WEBER, David J.; RUTALA, William A. Self-Disinfecting Surfaces. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, [S. l.], v. 33, n. 1, p. 10–13, 2012. DOI: 10.1086/663648.

WEINER-LASTINGER, Lindsey M. et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with adult healthcare-associated infections: Summary of data reported to the National Healthcare Safety Network, 2015–2017. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, [S. l.], v. 41, n. 1, p. 1–18, 2020. DOI: 10.1017/ice.2019.296.

WHO. **SARS outbreak contained worldwide**. 2003. Disponível em: <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2003/pr56/en/>. Acesso em: 9 out. 2020.

WHO. **WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard**. 2024. Disponível em: <https://covid19.who.int/>. Acesso em: 4 jul. 2024.

YIN, Ming; WU, Chun Kwei; LOU, Yongbing; BURDA, Clemens; KOBERSTEIN, Jeffrey T.; ZHU, Yimei; O'BRIEN, Stephen. Copper oxide nanocrystals. **Journal of the American Chemical Society**, [S. l.], v. 127, n. 26, p. 9506–9511, 2005. DOI: 10.1021/ja050006u.

ZHANG, Qiaobao; ZHANG, Kaili; XU, Daguo; YANG, Guangcheng; HUANG, Hui; NIE, Fude; LIU, Chenmin; YANG, Shihe. CuO nanostructures: Synthesis, characterization, growth mechanisms, fundamental properties, and applications. **Progress in Materials Science**, [S. l.], v. 60, n. 1, p. 208–337, 2014. DOI: 10.1016/j.pmatsci.2013.09.003.

ZHONG, Ru; ZHONG, Quan; HUO, Meijun; YANG, Binglin; LI, Hong. Preparation of biocompatible nano-ZnO/chitosan microspheres with multi-functions of antibacterial, UV-shielding and dye photodegradation. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 146, p. 939–945, 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.09.217.

ZHOU, Jialiand; HU, Zexu; ZABIHI, Fatemeh; CHEN, Zhigang; ZHU, Meifang. Progress and Perspective of Antiviral Protective Material. **Advanced Fiber Materials**, [S. l.], v. 2, n. 3, p. 123–139, 2020. DOI: 10.1007/s42765-020-00047-7.