

Ramon Salvan Fernandes

TÍTULO:
**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ESTERILIZAÇÃO POR
RADIAÇÃO GAMA NA EFICIÊNCIA DA AÇÃO
ANTIMICROBIANA DE POLIAMIDA 6 E PEAD ADITIVADOS
COM AGENTES ANTIMICROBIANOS**

Tese submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Engenharia Química da
Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do Grau de Doutor em
Engenharia Química

Orientador: Prof. Dr. Humberto
Gracher Riella

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Fernandes, Ramon Salvan

Avaliação dos Efeitos da Esterilização por Radiação Gama na Eficiência da Ação Antimicrobiana de Poliamida 6 e Pead Aditivados com Agentes Antimicrobianos / Ramon Salvan Fernandes; orientador, Humberto Gracher Riella - Florianópolis, SC, 2014.

128 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. Irradiação. 3. Aditivos antimicrobianos. 4. Triclosan. 5. Vidro dopado com zinco. I. Riella, Humberto Gracher. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

Ramon Salvan Fernandes

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ESTERILIZAÇÃO POR
RADIAÇÃO GAMA NA EFICIÊNCIA DA AÇÃO
ANTIMICROBIANA DE POLIAMIDA 6 E PEAD ADITIVADOS
COM AGENTES ANTIMICROBIANOS**

Este Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de Doutor, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Florianópolis, 8 de agosto de 2014.

Prof. Ricardo Antonio Francisco Machado, Dr.
Coordenador do Curso

Prof. Humberto Gracher Riella, Dr
Orientadora

Banca Examinadora:

Prof. Nivaldo Cabral Kuhnen, Dr
UFSC/PósENQ

Prof. Bruno Augusto Mattar Carciofi, Dr
UFSC/PGEAL

Prof. Adriano Michael Bernardin, Dr
UNESC

Prof. Márcio Antônio Fiori, Dr
UNOCHAPECÓ

Prof. Michelangelo Durazzo, Dr
USP/IPEN

Este trabalho é dedicado a
aminha amada esposa e aos meus
queridos pais.

AGRADECIMENTOS

Ao orientador Prof. Humberto Gracher Riella, pela oportunidade de realizar esse trabalho.

A CAPES, e Pós-graduação, pela bolsa de estudos.

À UNESC - Universidade do Extremo Sul Catarinense, na pessoa do Prof. Elídio Angioletto, por disponibilizar grande parte da estrutura física e laboratorial utilizada nas diversas e longas etapas deste trabalho.

Aos amigos e pessoas que de alguma forma contribuíram para este trabalho.

Em especial ao Prof. Marcio Antônio Fiori, professor, mentor e grande amigo.

RESUMO

Desde as descobertas de Pasteur, a humanidade vem buscando formas de controlar os micro-organismos presentes no meio ambiente seja para uso nas indústrias farmacêuticas e alimentícias, quanto para o controle de pragas e doenças. Na verdade, esse último é o fator que mais tem promovido o desenvolvimento das técnicas antimicrobianas no mundo. A esterilização dos produtos é a opção mais eficiente de controle antimicrobiano, uma vez que elimina todos os micro-organismos presentes em um ambiente, seja uma embalagem de alimento ou um produto médico. No entanto, muitas vezes a esterilização não é suficiente para garantir a segurança de um produto, pois uma vez aberta a embalagem, o produto é exposto aos micro-organismos presentes no ar (ou na água) contaminando o material e muitas vezes iniciando um processo de deterioração. Nestes casos, o uso de agentes antimicrobianos em produtos esterilizados ajuda a promover uma maior vida útil dos produtos, em especial alimentos e materiais de uso hospitalar, uma vez que reduz significativamente a chance de contaminação (inclusive contaminação cruzada) durante o manuseio ou armazenamento destes produtos depois de abertos. No entanto, estudos recentes indicam que o triclosan, um dos principais agentes antimicrobianos utilizados, pode sofrer degradação quando exposto à radiação γ . Além disso, possíveis efeitos tóxicos podem restringir seu uso a produtos médico-hospitalares. Baseado nisso, esse trabalho foi realizado avaliando-se o efeito da esterilização por radiação γ , em amostras de poliamida 6 (PA6) e no polietileno de alta densidade (PEAD), aditivados com dois agentes antimicrobianos, o Triclosan, destinado a produtos médico-hospitalares e um vidro dopado com Zn, visando à utilização em embalagens de alimentos e produtos de consumo em geral. Para isso, foram realizados testes qualitativos (difusão em ágar) e quantitativos (Concentração inibitória mínima), procurando analisar o efeito da radiação sobre o poder antimicrobiano dos compostos polímero/aditivo. Por fim, foram testados os aditivos puros, irradiados com a mesma quantidade de radiação (25kGy) e testados através de uma nova técnica experimental, desenvolvida especialmente para esse trabalho, que se baseia na alteração da curva de atenuação de uma solução de sacarose, por leveduras da família *Saccharomyces Cerevisiae*, na presença de agentes biocidas. Em todos os testes realizados, não foram encontradas diferenças significativas nos efeitos antimicrobianos dos compostos polímero/aditivo e dos aditivos puros, antes e após a irradiação. Isso que indica que o processo de esterilização por radiação γ , pode ser utilizado

em associação a aditivação por Triclosan e pelo vidro dopado com Zn, sem perda das propriedades biocidas.

Palavras-chave: Irradiação. Triclosan. Vidro dopado com zinco. Aditivo. Antimicrobiano. Esterilização. Radiação gama. PEAD. PA6. Atenuação

ABSTRACT

Since the discoveries of Pasteur, humanity has been searching for ways to control micro-organisms in environment, or for use in pharmaceutical and food industries, and for control of pests and diseases. Actually, this last is the most important factor that has promoted the development of antimicrobial techniques in the world. The sterilization of products is more effective antimicrobial control option, since it eliminates all micro-organisms present in an environment at, or packaging of food or medical product. However, sterilization is often not sufficient to guarantee the safety of a product, for packing micro-organism present once opened, the product is exposed in air (or water) the polluting material, and initiating a process often deterioration. In these cases, the use of antimicrobial agents in sterile products helps promote longer life products, especially food and materials for hospital use, as it significantly reduces the chance of contamination (including cross-contamination) during handling or storage of these product after opening. However, recent studies indicate that Triclosan, main antimicrobials used, may undergo degradation when exposed to gamma radiation. In addition, possible toxic effects may restrict its use to medical products. Based on that, the work is performed by evaluating the effect of sterilization by gamma radiation on samples of polyamide 6 (PA6) and high density polyethylene (HDPE) with two antimicrobial additives, triclosan, intended for medical products hospital and glass doped with Zn, aimed at use in food packaging and consumer products in general. For this qualitative test (agar diffusion) and quantitative (minimum inhibitory concentration) were conducted, assessing the effect of radiation on the antimicrobial property of compounds polymer/additive. Finally, pure additives tested were irradiated with the same amount of radiation (25kGy) and tested using a new experimental technique, developed specifically for this work, which relies on change of attenuation curve of a sucrose solution by yeast family *Saccharomyces Cerevisiae* in the presence of biocides. In all tests, no significant differences were found in effects of antimicrobial compounds polymer / additive and the pure additives before and after irradiation. This indicates that the process of sterilization by gamma radiation can be used in combination with the additives of Triclosan and glass doped with Zn, without loss of biocide properties.

Keywords: Irradiation. Triclosan. Glass doped with zinc additive. Antimicrobial. Sterilization. Gamma radiation. HDPE. PA6. Attenuation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas das poliamidas 6 e 6.6	34
Figura 2 - Síntese da poliamida 6.....	34
Figura 3 - Síntese da poliamida 6.6.....	35
Figura 4 - Pontes de hidrogênio entre cadeias de uma poliamida	36
Figura 5 - Água formando pontes de hidrogênio entre as cadeias da poliamida	36
Figura 6 - Síntese do polietileno	37
Figura 7 - Esquema de irradiador de $^{60}\text{Co}^0$	43
Figura 8 – Molécula de Triclosan	46
Figura 9 - Reações de geração de estados eletrônicos muito excitados	56
Figura 10 - Formação dos radicais livres	56
Figura 11 - Reações provocadas por radicais livres	57
Figura 12 - Embalagens para esterilização de próteses de PEUAPM: (a) embalagem a vácuo (b) embalagem com características de barreira, preenchida com N_2	60
Figura 13 - Caminhos possíveis para a fotodegradação do Triclosan, gerando radicais não iônicos.	61
Figura 14 - Esquema de preparação das amostras para determinação das curvas de atenuação	68
Figura 15 - Difusão em ágar do composto PA6/Triclosan com 0,5% de aditivo frente à <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> , não irradiado e irradiado.	72
Figura 16 - Difusão em ágar do composto PA6/Triclosan com 1,0% de aditivo frente à <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> , não irradiado e irradiado.	73
Figura 17 - Difusão em ágar do composto PA6/Triclosan com 1,5% de aditivo frente à <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> , não irradiado e irradiado.	74
Figura 18 - Difusão em ágar do composto PA6/Triclosan com 2,0% de aditivo frente à <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> , não irradiado e irradiado.	75
Figura 19 - Difusão em ágar do composto PA6/Triclosan com 2,5% de aditivo frente à <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> , não irradiado e irradiado.	76
Figura 20 - Difusão em ágar do composto PEAD/Triclosan com 0,5% de aditivo frente à <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> , não irradiado e irradiado.	77
Figura 21 - Difusão em ágar do composto PEAD/Triclosan com 1,0% de aditivo frente à <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> , não irradiado e irradiado.	77

irradiado e irradiado.....	78
Figura 22 - Difusão em ágar do composto PEAD/Triclosan com 1,5% de aditivo frente à <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> , não irradiado e irradiado.....	79
Figura 23 - Difusão em ágar do composto PEAD/Triclosan com 2,0% de aditivo frente à <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> , não irradiado e irradiado.....	80
Figura 24 - Difusão em ágar do composto PEAD/Triclosan com 2,5% de aditivo frente à <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> , não irradiado e irradiado.....	81
Figura 25 - Comparação entre os halos inibitórios de amostras de PEAD e PA6 aditivadas com 1,0% de Triclosan, não irradiadas.....	83
Figura 26 - Difusão em ágar do composto PA6/Vidro dopado com Zn com 0,5% de aditivo frente à <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> , não irradiado e irradiado.....	85
Figura 27 - Difusão em ágar do composto PA6/Vidro dopado com Zn com 1,0% de aditivo frente à <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> , não irradiado e irradiado.....	86
Figura 28 - Difusão em ágar do composto PA6/Vidro dopado com Zn com 1,5% de aditivo frente à <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> , não irradiado e irradiado.....	87
Figura 29 - Difusão em ágar do composto PA6/Vidro dopado com Zn com 2,0% de aditivo frente à <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> , não irradiado e irradiado.....	88
Figura 30 - Difusão em ágar do composto PA6/Vidro dopado com Zn com 2,5% de aditivo frente à <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> , não irradiado e irradiado.....	89
Figura 31 - Difusão em ágar do composto PEAD/Vidro dopado com Zn com 0,5% de aditivo frente à <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> , não irradiado e irradiado.....	90
Figura 32 - Difusão em ágar do composto PEAD/Vidro dopado com Zn com 1,0% de aditivo frente à <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> , não irradiado e irradiado.....	91
Figura 33 - Difusão em ágar do composto PEAD/Vidro dopado com Zn com 1,5% de aditivo frente à <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> , não irradiado e irradiado.....	92
Figura 34 - Difusão em ágar do composto PEAD/Vidro dopado com Zn com 2,0% de aditivo frente à <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> , não irradiado e irradiado.....	93
Figura 35 - Difusão em ágar do composto PEAD/Vidro dopado com Zn com 2,5% de aditivo frente à <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus</i>	

<i>aureus</i> , não irradiado e irradiado	94
Figura 36 - Resultados microbiológicos de CIM para o PA6 aditivado com o vidro dopado com Zn ⁺² e não irradiado com bactérias <i>Escherichia coli</i>	95
Figura 37 - Resultados microbiológicos de CIM para o PA6 aditivado com o vidro dopado com Zn ⁺² irradiado com bactérias <i>Escherichia coli</i>	96
Figura 38 - Resultados microbiológicos de CIM para o PA6, aditivado com o vidro dopado com Zn ⁺² não irradiado com bactérias <i>Staphylococcus aureus</i>	Erro! Indicador não definido.
Figura 39 - Resultados microbiológicos de CIM para o PA6, aditivado com o vidro dopado com Zn ⁺² irradiado com bactérias <i>Staphylococcus aureus</i>	97
Figura 40 - Resultados microbiológicos de CIM para o PEAD aditivado com o vidro dopado com Zn ⁺² , não irradiado, com bactérias <i>Escherichia coli</i>	98
Figura 41 - Resultados microbiológicos de CIM para o PEAD, aditivado com o vidro dopado com Zn ⁺² e irradiado, com bactérias <i>Escherichia coli</i>	99
Figura 42 - Resultados microbiológicos de CIM para o PEAD, aditivado com o vidro dopado com Zn ⁺² e não irradiado com bactérias <i>Staphylococcus aureus</i>	99
Figura 43 - Resultados microbiológicos de CIM para o PEAD, aditivado com o vidro dopado com Zn e irradiado, com bactérias <i>Staphylococcus aureus</i>	100
Figura 44 - Resultados microbiológicos de CIM para o PA6 aditivado com o Triclosan não irradiado com bactérias <i>Escherichia coli</i> ..	101
Figura 45 - Resultados microbiológicos de CIM para o PA6 aditivado com o Triclosan irradiado com bactérias <i>Escherichia coli</i>	101
Figura 46 - Resultados microbiológicos de CIM para o PA6 aditivado com o Triclosan não irradiado com bactérias <i>Staphylococcus aureus</i>	102
Figura 47 - Resultados microbiológicos de CIM para o PA6 aditivado com o Triclosan irradiado com bactérias <i>Staphylococcus aureus</i>	102
Figura 48 - Resultados de CIM para o PEAD aditivado com o Triclosan e não irradiado com bactérias <i>Escherichia coli</i>	103
Figura 49 - CIM para o PEAD, aditivado com o Triclosan e irradiado com bactérias <i>Escherichia coli</i>	104
Figura 50 - CIM para o PEAD, aditivado com o Triclosan com bactérias <i>Staphylococcus aureus</i> , não irradiado	105

Figura 51 - CIM para o PEAD, aditivado com o Triclosan com bactérias <i>Staphylococcus aureus</i> , irradiado.	105
Figura 52 - Comparativo das curvas de atenuação de açúcar para soluções contendo Triclosan não irradiado, nas três concentrações de teste e controle.	108
Figura 53 - Comparativo das curvas de atenuação de açúcar para soluções contendo vidro dopado com Zn^{+2} , não irradiado, nas três concentrações de teste e controle.	109
Figura 54 - Comparação do teor de açúcar na 48 ^a hora nas diferentes concentrações de vidro dopado com Zn^{+2} , não irradiado	110
Figura 55 - Curva de atenuação do teor de açúcar para soluções contendo vidro dopado com Zn^{+2} , irradiado e não irradiado por radiação γ	111
Figura 56 - Curva de atenuação do teor de açúcar para soluções contendo Triclosan irradiado, não irradiado e controle	111
Figura 57 - Curva de atenuação comparando o Triclosan e o vidro dopado com Zn, ambos irradiados e não irradiados	112
Figura 58 - Espectros de FTIR para o Triclosan. (a) antes da irradiação, (b) após a irradiação e (c) sobreposição dos espectros.....	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Termos aplicados ao controle microbiológico	49
Tabela 2 - Tipo de reação dos polímeros durante a exposição à radiação (adaptado de Encyclopedia of Polymer Science and Technology (MARK, 2003)).	58
Tabela 3 - Reações promovidas pela radiação, em presença de O ₂	59
Tabela 4 - Concentrações dos aditivos nos polímeros.....	63
Tabela 5 - Resumo das amostras preparadas para a análise das curvas de atenuação.....	68
Tabela 6 - dose de radiação absorvida e nível de degradação do Triclosan.....	128

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PEAD – Polietileno de alta densidade
PA6 – Poliamida 6
CIM – Concentração Inibitória Mínima
BHI – brain heart infusion

LISTA DE SÍMBOLOS

α – alfa
 β – beta
 γ - gama

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO.....	25
1.1 Justificativo.....	29
1.2 OBJETIVOS.....	31
1.2.1 Objetivo Geral.....	31
1.2.2 Objetivos Específicos.....	31
2 ASPECTOS TEÓRICOS.....	33
2.1 Polímeros.....	33
2.1.1 Poliamidas.....	33
2.1.2 Polietileno.....	37
2.2 Radiações ionizantes e suas fontes.....	41
2.2.1 Raios – X.....	41
2.2.2 Radiação α	41
2.2.3 Radiação β	42
2.2.4 Radiação γ	42
2.2.5 Irradiador.....	43
2.3 Materiais Antimicrobianos: Conceitos e Aspectos Gerais.....	44
2.3.1 Aspectos Gerais.....	44
2.3.2 Triclosan.....	46
2.3.3 Vidro antimicrobiano a base de Zn.....	47
2.4 Controle Microbiológico.....	47
2.4.1 Mecanismos e Cinética de Desinfecção.....	49
2.4.2 Outras reações.....	50
2.5 Esterilização.....	50
2.5.1 Esterilização por calor.....	51
2.5.2 Esterilização química por óxido de etileno.....	52
2.5.3 Esterilização por radiação.....	52
2.5.4 Esterilização por radiação.....	53
2.6 Efeitos da radiação em polímeros.....	56
2.6.1 Reações por radicais livres.....	56
2.6.2 Efeito do Meio Ambiente.....	57
2.6.3 Efeitos da radiação sobre polietilenos.....	59
2.6.4 Efeitos da radiação sobre poliamidas.....	60
2.7 Efeitos da radiação no Triclosan.....	61
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	63
3.1 Preparação das amostras.....	63
3.2 Irradiação das amostras.....	64
3.3 Caracterização das amostras pré e Pós-irradiação.....	64
3.4 Análises microbiológicas.....	64
3.5 Análise por FTIR dos aditivos puros.....	69

4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	71
4.1	Testes antimicrobianos nos compostos Poliméricos Antimicrobianos.....	71
4.1.1	Difusão em ágar.....	71
4.1.2	Testes de Concentração Inibitória Mínima – CIM.....	94
4.1.3	Determinação da melhor concentração de aditivo.....	107
4.1.4	Efeito da radiação nas curvas de atenuação.....	110
4.1.5	Espectroscopia de infravermelho.....	112
4.1.6	Efeito da radiação no vidro dopado com Zn^{+2}	114
4.2	Considerações finais.....	114
5	CONCLUSÕES.....	117
6	REFERÊNCIAS.....	119
7	ANEXO 1.....	127

1 INTRODUÇÃO

Micro-organismo é um termo que designa de forma genérica a todos os seres invisíveis a olho nu. Esse termo tem origem no século 19, quando não era possível se diferenciar os tipos de organismos existentes. Atualmente, entram nessa categoria os vírus, fungos, bactérias e protozoários, sendo que o número total de espécies de microrganismos, ainda permanece como um mistério para a ciência.

As bactérias talvez sejam os microrganismos mais comuns e antigos do mundo. Acredita-se que tenham sido os primeiros seres vivos do planeta a cerca de 3,5 bilhões de anos. Desde então, evoluíram, se diversificaram, e são encontradas em praticamente todos os ambientes conhecidos, desde as águas mais profundas até o interior dos corpos de outros seres vivos. Embora essa convivência seja pacífica na maioria das vezes, algumas bactérias podem ser bastante nocivas à saúde, como por exemplo, a *Salmonella entérica*.

Os fungos também são muito presentes na vida dos seres humanos, alguns benéficos, como o *Saccharomyces Cerevisiae*, responsável pela fermentação da cerveja e dos pães, outros danosos como o *Penicillium Botulinum*, responsável pelo botulismo.

Além das bactérias e fungos, destacam-se também os vírus. Apesar de não serem considerados seres vivos propriamente ditos por muitos autores, seu sistema de reprodução exige que estes invadam as células vivas e as utilize para criar cópias de si mesmo. Esse processo provoca o mau funcionamento ou até mesmo a destruição destas células, o que é bastante prejudicial para o organismo como um todo.

Para impedir a ação destes microrganismos, são empregadas diversas técnicas de controle microbiano. As principais técnicas empregadas podem ser pela eliminação dos organismos vivos e seus esporos com a esterilização química ou física, pela retirada da fonte de água e/ou nutrientes como o processo de desidratação (usado no processamento de frutas e especiarias) pela alteração das condições ambientais com o aquecimento dos alimentos a temperaturas superiores a 65°C ou com a alteração do pH da solução de armazenamento (JAY, 2000) (WILLEY, SHERWOOD e WOOLVERTON, 2008). No entanto, nem mesmo uma esterilização completa de um produto pode garantir sua sanidade no momento da sua utilização ou armazenamento. Para que isso seja possível, é necessário impedir que o produto entre em contato novamente com os agentes infecciosos e esteja protegido dos microrganismos presentes no meio ambiente, ou seja, precisam ser

embalados.

Em geral, as funções de uma embalagem são: informar sobre as condições de manipulação e de armazenamento, exibir os requisitos legais como a composição e os ingredientes, fazer a promoção do produto através de gráficos e, principalmente, proteger o conteúdo. Em termos de proteção do conteúdo, uma embalagem deve ser resistente o bastante para permitir sua movimentação, deve impedir que agentes externos danifiquem, degradem ou contaminem o produto embalado.

Para isso, uma embalagem deve apresentar características de barreira de acordo com a necessidade do produto, tais como: barreira à luz, oxigênio, umidade, gases e vapores orgânicos e a microrganismos. Vale ressaltar que na maioria dos casos uma embalagem não necessita apresentar todas essas características ao mesmo tempo (ROBERTSON, 2009). Um exemplo é o processo de produção de alimentos em conserva, onde embalagens de vidro funcionam como barreira para gases e resistem à temperatura de esterilização, mas não apresentam a barreira à luz por não ser necessária.

Além disso, quando se trata de embalagens destinadas ao armazenamento de produtos que devem passar por algum processo de controle microbiológico após o seu acondicionamento, outra exigência deve ser cumprida pela embalagem. Ela deve permitir que o produto sofra o processo de controle microbiológico sem que ocorra o comprometimento da sua integridade e do produto acondicionado (HAN, 2007). Um caso típico é a esterilização por óxido de etileno, que é utilizado para a esterilização de artigos médicos, tais como ataduras, suturas e seringas descartáveis. O processo consiste em acondicionar os artigos em embalagens seladas de papel permeável ao gás, mas impermeável aos contaminantes externos, e depositá-los em uma câmara selada e preenchida com o óxido de etileno em gás. O gás difunde para o interior das embalagens e elimina os microrganismos. Após esse processo, os artigos passam por uma quarentena para a eliminação do gás acumulado no seu interior (MANIVANNAN, 2007). Outro processo de esterilização que exigem das embalagens a permeabilidade a vapores ou a gases é a esterilização por autoclave. Neste caso, os produtos são envolvidos em papel pardo e submetidos a elevadas pressões, temperatura e umidade (BARKLEY, COHEN, *et al.*, 2004).

No entanto, alguns produtos não podem ser submetidos a esses processos. Os alimentos, por exemplo, não podem ser submetidos ao tratamento por óxido de etileno por ser um gás tóxico a saúde humana e também não podem ser submetidos ao processo com autoclave devido a provável alteração nutricional e organoléptica. Além disso, alguns

produtos de aplicação médica, tais como fios de sutura a base de poliamidas, não podem ser submetidos a ambos os tratamentos, pois sofrem o processo de degradação química (DEOPURA, ALAGIRUSAMY, *et al.*, 2008).

Nestas condições, é recomendada a esterilização dos produtos por radiação γ . Nesse processo, os produtos podem ser acondicionados em qualquer tipo de embalagem que, além das propriedades de barreira exigidas pelo produto, impeçam a recontaminação dos produtos. Como a radiação γ é capaz de penetrar até mesmo nos metais, qualquer embalagem resistente à radiação pode ser utilizada nesse processo, desde filmes plásticos a latas de aço.

Vale ressaltar que em todos os casos citados, as embalagens atuam apenas como uma barreira física inerte, permitindo a troca de gases entre o interior e o ambiente, ou como uma barreira completa, impedindo qualquer interação do meio com o exterior. Esse tipo de embalagem é conhecido como “embalagem passiva” e apresenta como principais características a função de barreira entre o ambiente interno e externo da embalagem, bem como a não interação com o produto embalado nem com agentes do ambiente externo (ROONEY, 1995).

Entretanto, o nível de exigência cada vez maior dos consumidores por alimentos menos processados e por produtos mais seguros para a saúde, tem incentivado a pesquisa na busca de novos métodos de conservação dos alimentos e para o aumento da segurança hospitalar. Nesse sentido, surgiram as embalagens inteligentes e ativas (VERMEIREN, DEVLIEGHERE, *et al.*, 1999). Embalagens inteligentes são aquelas capazes de reagir a alterações do ambiente ou do produto. Sua principal aplicação é indicar ao consumidor a qualidade do produto acondicionado (ROONEY, 1995). Já as embalagens ativas podem agir de duas formas, absorvendo substâncias que promovem a deterioração do produto ou liberando de maneira controlada substâncias que ajudem na conservação dos produtos e no controle microbiológico interno das embalagens, tais como elementos conservantes e agentes antimicrobianos (COLES, MCDOWELL e KIRWAN, 2003). Dessa forma, diversos tipos de embalagens plásticas com propriedades antimicrobianas têm sido desenvolvidos nos últimos anos. Na maioria dos casos o principal objetivo dessas embalagens é reduzir o tempo de processamento dos alimentos e aumentar o seu “tempo de vida de prateleira” (*Shelf Life*) (AZEREDO, FARIA e AZEREDO, 2000). No entanto, vale ressaltar que no caso de alimentos devidamente processados esse ganho pode não ser significativo, uma vez que em geral, o processamento dos alimentos elimina os microrganismos

presentes. Porém, uma vez aberta, a sanidade do interior das embalagens deixa de existir devido à exposição ao ambiente externo no momento da sua abertura. Nesse caso, as embalagens com propriedades antimicrobianas atuam permanentemente reduzindo as chances de contaminação do alimento após a sua abertura, com o impedimento do crescimento de fungos e de bactérias no interior dessas embalagens. Assim, é possível se obter duas vantagens diretas com o uso destas embalagens. A primeira é o aumento do tempo para o consumo do alimento após a abertura da embalagem e a outra é a redução da necessidade de refrigeração de muitos alimentos, permitindo o seu uso em locais onde não é possível a refrigeração.

Considerando os produtos médico-hospitalares, o tempo de vida de prateleira é maior, se não for indeterminado, uma vez que esses produtos passam por processo de esterilização e mantem essas condições enquanto as embalagens permanecerem intactas. No entanto, o manuseio dessas embalagens em condições desfavoráveis, como por exemplo, num atendimento de emergência em um acidente de trânsito, pode contaminar a superfície das embalagens e os microrganismos serem transferidos para o produto no momento da sua abertura e aplicação. No interior dos hospitais o risco de contaminação cruzada não pode ser descartado. Nesses casos, embalagens com características antimicrobianas reduziram significativamente o risco de contaminação destes produtos e consequentemente o risco de infecção hospitalar. Por esse motivo, os produtores de materiais estéreis com esterilização por radiação γ , sejam alimentos ou artigos médicos, preferem que seus produtos sejam pré-embalados antes do processo de irradiação, pois facilita a colocação dos produtos no mercado evitando os riscos de uma recontaminação após a irradiação.

O problema em se tratando de embalagens ativas, é que pouco se sabe sobre o efeito da radiação sobre os aditivos utilizados, sua interação com os polímeros após a irradiação e o efeito dos produtos formados após a irradiação (PENTIMALLI, RAGNI e G RIGHINI, 2000) (CHYTIRI, GOULAS, *et al.*, 2006) (CHYTIRI, GOULAS, *et al.*, 2008). Atualmente, foram realizados trabalhos envolvendo a irradiação de compostos puros irradiados tais como os de Ustundag e Ocloo, (USTÜNDAĞ e KORKMAZ, 2009) (OCLOO, ADU-GYAMFI, *et al.*, 2012), no entanto, não foram encontrados estudos envolvendo materiais aditivados com agentes antimicrobianos e irradiados,

1.1 JUSTIFICATIVA

O processo de controle microbiológico deve ser capaz de reduzir ou eliminar os micro-organismos sem provocar alterações significativas nos produtos ao mesmo tempo em que mantém a integridade e características de suas embalagens. Materiais como medicamentos em pó e fios de sutura a base de poliamidas não podem ser esterilizados por meio de calor e umidade, enquanto substâncias oleosas e soluções aquosas não podem ser esterilizadas por óxido de etileno. Em ambos os casos o processo mais indicado é a esterilização por radiação γ , uma vez que esse sistema é um dos que provoca as menores alterações nos produtos, sejam alimentos ou produtos médicos. No entanto, esse processo não é totalmente inofensivo às embalagens e aos aditivos antimicrobianos empregados em alguns produtos (HAN, 2007) (MAKUUCHI e CHENG, 2012) (USTÜNDAĞ e KORKMAZ, 2009). Nos polímeros, os principais fenômenos que ocorrem durante a irradiação é a formação de ligações cruzadas e a quebra das cadeias poliméricas. A prevalência de uma ou outra depende principalmente da estrutura da cadeia polimérica: polímeros contendo átomos de hidrogênio ligados aos átomos de carbono tem a prevalência da formação de ligações cruzadas, já cadeias contendo carbono quaternário prevalecem as quebras de cadeia. (MASSEY, 2004). Porém, conforme Han (HAN, 2007), tanto o PEAD quanto a PA6 podem receber até 60KGy de irradiação quando utilizados na fabricação de embalagens, no entanto, não está claro se as mudanças estruturais provocadas pela radiação podem ou não interferir na difusão de aditivos na matriz polimérica. Além disso, os aditivos antimicrobianos, em especial os orgânicos, sofrem alterações em suas estruturas químicas quando expostos a radiações ionizantes (SPOTHEIM-MAURIZOT, BELLONI e DOUKI, 2008). Essas alterações geram compostos ainda pouco estudados, que podem alterar as propriedades de uma embalagem antimicrobiana, tais como a perda do poder antimicrobiano devido à degradação da molécula do aditivo, interações indesejáveis entre os compostos gerados e a matriz polimérica ou a formação de compostos tóxicos. Atualmente, poucos trabalhos têm sido realizados envolvendo a irradiação de materiais antimicrobianos, com potencial para uso na produção de artigos de consumo e embalagens. Em sua grande maioria, os estudos avaliam o efeito das radiações apenas sobre as matrizes e poliméricas separadamente as substâncias antimicrobianas (aditivos). Dentre os aditivos antimicrobianos mais utilizados no momento, destaca-se o formula 2.4.4.'-triclora-2' hidroxí difenil éter, conhecido

como Triclosan. Seu uso bastante difundido tem levado a pesquisas envolvendo seu efeito no meio ambiente (WU, LAM, *et al.*, 2007) e meios de decompô-lo em substâncias menos ofensivas ao meio ambiente. Nesse contexto Ustündag e Korkmaz realizaram estudos avaliando o efeito das radiações UV e γ sobre o triclosan, tendo como principal objetivo a sua neutralização ambiental. Esses trabalhos indicam que o triclosan apresenta sensibilidade à radiação γ , sendo degradado com certa facilidade por ela.

Outra linha de pesquisa sobre materiais antimicrobianos segue pelo uso de substância contendo de íons metálicos com efeito biocida. Estudos recentes envolvendo vidros aditivados com íons de Zn, tem se mostrado bastante promissores nesse sentido (SANTOS, MACHADO, *et al.*, 2014). Os principais motivos da utilização do vidro dopado com Zn iônico são seu efeito antifúngico e seu caráter atóxico até em concentrações relativamente elevadas, da ordem de 25 ppm. Em relação à irradiação do vidro dopado com Zn^{+2} , a radiação pode provocar defeitos eletrônicos, envolvendo mudança nos estados de valência, defeitos iônicos, que consistem em deslocamentos de íons na estrutura cristalina e imperfeições cristalinas, como o surgimento de vazios (SICKAFUS, KOTOMIN e UBERUAGA, 2004). Desses três, o efeito mais interessante seria a formação de defeitos iônicos, uma vez que o princípio ativo trata-se de um íon Zn^{+2} . No entanto, para que isso seja significativo, o zinco deverá se apresentar na sua forma reduzida ou ligada, o que não acontece no aditivo vítreo, pois seu processo de incorporação é feito via troca iônica e as espécies estarão na forma iônica.

Assim, uma leitura mais detalhada destes trabalhos, percebe-se que a degradação provocada pela radiação γ , nos aditivos, pode não ser suficiente a ponto de comprometer o efeito antimicrobiano de compostos poliméricos aditivados. Baseado nisso, esse trabalho visa comprovar que o efeito da radiação γ em processos padrão de esterilização sobre os polímeros e sobre os aditivos, não é suficiente para comprometer o efeito antimicrobiano de compostos poliméricos,

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da radiação γ em procedimentos padrões de esterilização por radiação γ , na capacidade biocida de materiais poliméricos aditivados com princípios ativos antimicrobianos.

1.2.2 Objetivos Específicos

Para este trabalho apresenta-se como objetivos específicos:

- Avaliar o efeito antimicrobiano dos compostos de PEAD e PA6, aditivados com Triclosan, com e sem a esterilização por radiação γ ;
- Avaliar o efeito antimicrobiano dos compostos de PEAD e PA6, aditivados com um vidro dopado com Zn^{+2} iônico, com e sem a esterilização por radiação γ ;
- Avaliar o efeito da radiação γ sobre as propriedades antimicrobianas dos aditivos puros Triclosan e vidro dopado com Zn^{+2} ;
- Determinar quais as concentrações dos aditivos biocidas para a produção dos compostos poliméricos antimicrobianos com vistas na presença do efeito antimicrobiano após os procedimentos de esterilização por radiação γ ;
- Propor um teste alternativo para avaliação dos efeitos antimicrobianos para os aditivos puros, baseado no seu efeito em leveduras *Saccharomyces Cerevisiae*.
- Comprovar por meio de testes microbiológicos que a esterilização por radiação γ , não diminui o efeito biocida dos compostos testados e seus aditivos puros.

2 ASPECTOS TEÓRICOS

2.1 POLÍMEROS

Polímeros são substâncias naturais, modificadas ou sintéticas, formadas por grandes moléculas conhecidas como *macromoléculas*. Essas macromoléculas por sua vez, são constituídas por unidades repetitivas conhecidas por “*meros*” (do grego, partes), daí a origem da palavra polímero: do grego poli (muitos) + meros (partes).

A principal forma de classificação dos polímeros é quanto ao seu comportamento térmico, sendo termoplásticos ou termofixos.

2.1.1 Poliamidas

As poliamidas são termoplásticos classificados como polímeros de cadeia heterogênea, pois possuem átomos diferentes de carbono e hidrogênio na cadeia principal. O grupo funcional tipo amida (–NH–CO–) é a principal característica desse grupo.

A elevada resistência mecânica desses materiais deve-se às ligações do tipo pontes de hidrogênio, formada entre as carbonilas de uma cadeia e o hidrogênio da ligação amida da outra cadeia. Por outro lado, a presença desta ligação facilita a permeação de moléculas de água, difundindo entre as cadeias e se posicionando na ponte de hidrogênio. Esta capacidade de absorção de água torna as poliamidas higroscópicas. Em função do número variável de pontes de hidrogênio por grupos CH_2 , têm-se diferentes níveis de absorção de água.

O desenvolvimento inicial das poliamidas deve-se principalmente aos trabalhos de W. H. Carothers e seus colaboradores nos Estados Unidos, que sintetizaram a primeira poliamida 6.6 em 1935, a partir da policondensação de hexametileno diamina com ácido adípico. Inicialmente, a produção comercial ficou praticamente restrita a produção de fibras têxteis. Mesmo sendo produzido desde 1941, o plástico destinado a moldagem somente se tornou popular na década de 50. Devido aos direitos de patente da Dupont, que registrou o novo produto com o nome de Nylon, cientistas alemães realizaram algumas pesquisas que vieram a dar origem inicialmente a poliamida 6, sendo seguidos pelas poliamidas 6.10, 11, 12 entre outros. (WIEBECK e HARADA, 2005)

Apesar das poliamidas 6 e 6.6 não serem obtidas de diferentes matérias-primas, suas moléculas são bastante parecidas, diferenciando-se

apenas pelo número de átomos de carbono presentes em cada mero (Figura 1).

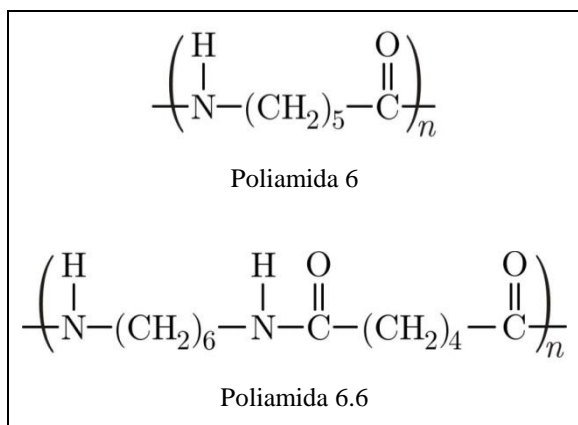


Figura 1 - Estruturas das poliamidas 6 e 6.6

As macromoléculas das poliamidas PA6, PA 11 e PA 12, são constituídas por apenas um único monômero, que possui o número de átomos de carbono correspondente ao número da poliamida. O PA6, por exemplo, é obtida da polimerização da caprolactama, que é uma substância com seis átomos de carbono (Figura 2). (WIEBECK e HARADA, 2005)

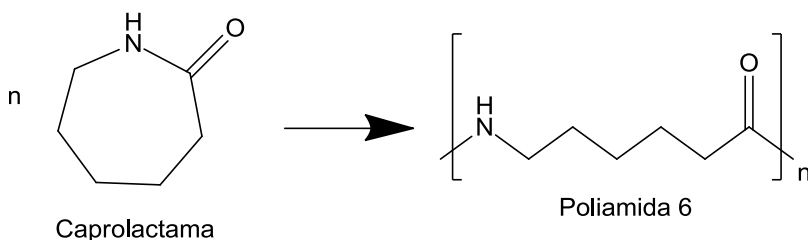


Figura 2 - Síntese da poliamida 6

Já as poliamidas PA 4.6, PA6.6, PA6.9, PA6.10 e PA6.12 são constituídas de duas substâncias base, cada um com um número de átomos de carbono correspondente ao número da poliamida. A poliamida PA6.6, por exemplo, é obtida pela policondensação do ácido adípico, que possui 6 átomos de carbono e da hexametilenodiamina que

também possui 6 átomos de carbono. Dessa forma, a PA6.6 possui 12 átomos de carbono, originários de cada uma das matérias-primas (Figura 3). (WIEBECK e HARADA, 2005)

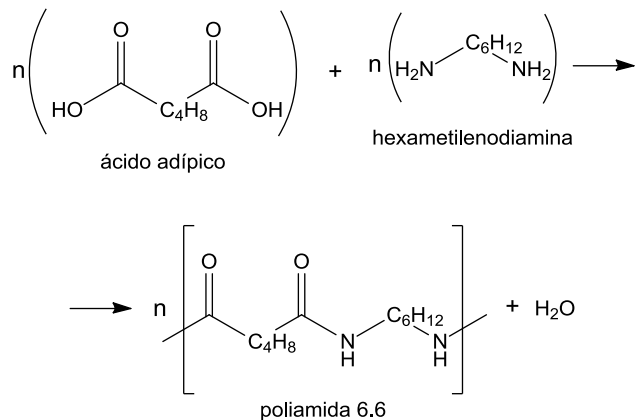


Figura 3 - Síntese da poliamida 6.6

2.1.1.1 Morfologia

A presença de grupos laterais amida nas poliamidas, leva ao aparecimento de pontes de hidrogênio entre as moléculas. Essas pontes de hidrogênio formam-se entre o hidrogênio da amida e o oxigênio da carbonila (Figura 4). Isso faz com que as moléculas alinhem-se com maior facilidade, tornando-se paralelas, especialmente após o estiramento. Isso promove um aumento no grau de cristalinidade e consequentemente um aumento na resistência mecânica, temperatura de fusão (T_m), temperatura de transição vítrea (T_g), grau de cristalinidade, entre outras propriedades físicas. (MARK, 2003) (DEOPURA, ALAGIRUSAMY, *et al.*, 2008)

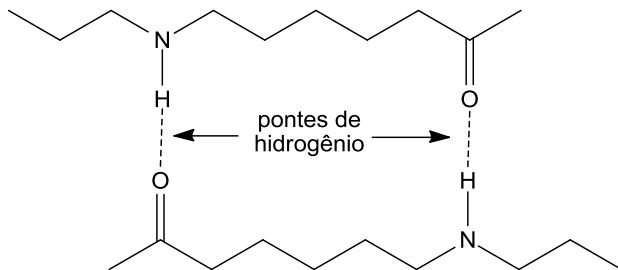


Figura 4 - Pontes de hidrogênio entre cadeias de uma poliamida

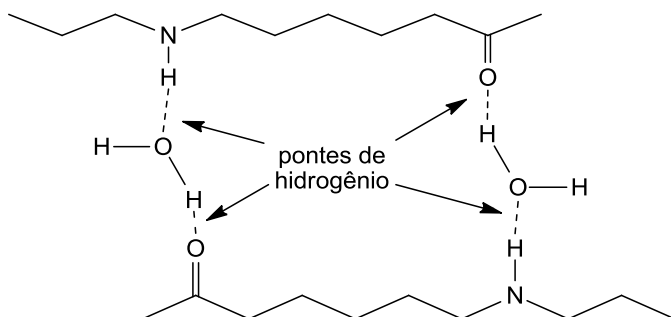


Figura 5 - Água formando pontes de hidrogênio entre as cadeias da poliamida

Além disso, essas pontes de hidrogênio permitem que moléculas de água consigam penetrar por entre as cadeias do polímero (Figura 5), ou seja, tornam as poliamidas higroscópicas. Por esse motivo, quando maior o número de grupos $-CH_2-$ entre os grupos amida, menores serão sua influencias nas propriedades do material, ou seja, menor resistência mecânica, menor grau de cristalinidade, menos higroscópico, etc. (MARK, 2003).

2.1.1.2 Propriedades Físicas e Térmicas das Poliamidas

As poliamidas apresentam alta resistência à tração e a abrasão. Essas propriedades são mantidas mesmo a altas temperaturas, podendo ser utilizadas a até 200°C em aplicações de curto prazo. No entanto, devido à facilidade com que o material se oxida em presença de umidade acima de 75°C , não se recomenda a sua utilização nessas condições por períodos prolongados, como por exemplo, numa esterilização por autoclave.

Outro fator importante é a umidade absorvida do ar, uma vez que todas as poliamidas são higroscópicas. Essa umidade atua da mesma forma que os agentes plastificantes, ou seja, diminui a resistência à tração e rigidez e aumenta a resistência ao impacto. (MARK, 2003) (DEOPURA, ALAGIRUSAMY, *et al.*, 2008)

2.1.1.3 Propriedades Químicas

As poliamidas são materiais bastante resistentes em termos químicos. São resistentes a maioria dos agentes inorgânicos, no entanto, são atacados por agentes oxidantes como o peróxido de hidrogênio e o permanganato de potássio. Os álcoois e as soluções aquosas não tem ação química direta nas poliamidas, no entanto, podem alterar as propriedades mecânicas da mesma forma que a umidade absorvida.

Não resistem a ácidos minerais concentrados, mas apresentam resistência quando diluídos e a baixas temperaturas. São praticamente inertes a álcalis e ácidos orgânicos, com exceção aos ácidos acético e fórmico. (MARK, 2003)

As poliamidas são resistentes a solventes orgânicos como éteres benzendo, xileno, cetonas e óleos. Apresentam uma boa resistência a solventes clorados, desde que sejam expostos por um curto período de tempo, mas são atacados por formaldeído, fenol, formalina e nitrobenzeno a quente. (MARK, 2003)

2.1.2 Polietileno

2.1.2.1 Introdução

Os polietilenos são um dos materiais mais produzidos e utilizados na indústria. É um material plástico, obtido a partir da polimerização do gás eteno.

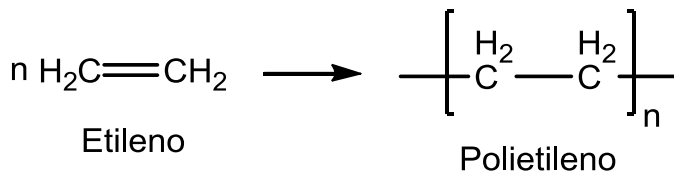


Figura 6 - Síntese do polietileno

Inicialmente, os processos de produção de polietileno produziam apenas produtos de baixo peso molecular (ceras). A partir da década de

30, iniciou-se a produção comercial dos polietilenos. Mas somente a partir do desenvolvimento de catalisadores a base de organometálicos (geralmente triálquilalumínio) e halogenetos (metal de transição comumente tri ou tetracloreto de titânio) por Ziegler e Natta em 1953, é que a produção de polietileno tornou-se economicamente interessante, permitindo a produção do polietileno de alta densidade a baixas pressões (3 a 4 atmosferas) e a baixas temperaturas (50° a 75°C). Esses catalisadores receberam o nome de Ziegler-Natta, em homenagem aos seus desenvolvedores.

2.1.2.2 Tipos de polietilenos

O termo “polietileno” é um nome geral para uma família de materiais poliméricos de mesma composição química, mas que apresentam diferenças em suas estruturas moleculares. Isso se deve as diferentes condições de síntese e dos diferentes catalisadores empregados no processo. Os principais tipos são:

- Polietileno de baixa densidade (PEBD)
- Polietileno de alta densidade (PEAD)
- Polietileno linear de baixa densidade (PELBD)
- Polietileno de ultra-alto peso molecular (PEUAPM)
- Polietileno de ultrabaixa densidade (PEUBD)

2.1.2.3 Polietileno de baixa densidade

O processo de produção de PEBD utiliza pressões entre 1000 e 3000 atmosferas e temperaturas entre 100 e 300 °C. Temperaturas acima de 300°C geralmente não são utilizadas, pois o polímero tende a se degradar. Vários iniciadores (peróxidos orgânicos) têm sido usados, porém o oxigênio é o principal. A reação é altamente exotérmica e assim uma das principais dificuldades do processo é a remoção do excesso de calor do meio reacional. Essa natureza altamente exotérmica da reação a altas pressões conduz a uma grande quantidade de ramificações de cadeia, as quais têm uma importante relação com as propriedades do polímero.

Em geral, essas cadeias contêm algumas dezenas ou centenas de átomos de carbono. Esse tipo de ramificação determina o grau de cristalinidade, as temperaturas de transição vítrea e de fusão, além de afetar parâmetros cristalográficos tais como tamanho dos cristalitos.

Polietileno de baixa densidade é um polímero parcialmente cristalino (50 – 60%), cuja temperatura de fusão (T_m) está na região de 110 a 115 °C. Quando comparado ao polietileno linear, apresenta cristaltos menores, menor cristalinidade e maior desordem cristalina, já que as ramificações longas não podem ser bem acomodadas na rede cristalina.

Por apresentar boa tenacidade, alta resistência ao impacto, flexibilidade, estabilidade física e química, é utilizado principalmente na forma de filmes para embalagens alimentícias, frascos para produtos farmacêuticos, brinquedos, utilidades domésticas, entre outros.

2.1.2.4 Polietileno de alta densidade

O polietileno de alta densidade é um polímero linear, altamente cristalino (acima de 90%), devido ao baixo teor de ramificações. Esse polímero contém menos que uma cadeia lateral por 200 átomos de carbono da cadeia principal, sua temperatura de fusão cristalina é aproximadamente 132 °C e sua densidade está entre 0,95 e 0,97 g/cm³.

A ausência de ramificações facilita a ação das forças de Van der Waals, melhorando o empacotamento e conseqüentemente, a cristalinidade. Da mesma forma, as temperaturas de fusão (T_m) e transição vítrea (T_g) e a resistência mecânica mostram-se maiores quando comparadas ao PEBD.

O PEAD é quimicamente bastante estável, não sendo atacado por soluções alcalinas em quaisquer concentrações. Também é resistente a agentes oxidantes como $KMnO_4$ e $K_2Cr_2O_7$, a ácidos orgânicos e ao HCl e o HF. É atacado lentamente por soluções concentradas de H_2SO_4 sob elevadas temperaturas. Em condições ambientais não é solúvel em nenhum solvente conhecido, no entanto, certos solventes orgânicos como o xileno, podem provocar inchamento. Em altas temperaturas, o PEAD é dissolvido em alguns hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos. É relativamente resistente ao calor, sendo que processos químicos sob alta temperatura, resultam em ruptura e formação de ligações cruzadas nas cadeias poliméricas.

O PEAD talvez seja o material mais utilizado na indústria, sendo utilizado em produtos como brinquedos, utilidades domésticas, e embalagens para alimentos, bebidas, produtos médico-hospitalares, etc. Devido a sua resistência a produtos químicos e óleos em geral, além de sua resistência mecânica, é muito utilizado em embalagens para esses produtos.

2.1.2.5 Polietileno Linear de Baixa Densidade (PELBD)

Polietileno linear de baixa densidade (PELBD) é um copolímero de etileno com uma α -olefina (propeno, 1-buteno, 1-hexeno ou 1-octeno). O PELBD apresenta estrutura molecular de cadeias lineares com ramificações curtas quando comparada com a do polietileno de baixa densidade (PEBD). A microestrutura da cadeia dos copolímeros de etileno/ α -olefinas depende do tipo e da distribuição do comonômero usado, do teor de ramificações e do peso molecular dos polímeros. Esses parâmetros influenciam as propriedades físicas do produto final, pois atuam diretamente na cristalinidade e na morfologia semicristalina. As ramificações de cadeia curta têm influência, tanto no PELBD como no PEBD, sobre a morfologia e algumas propriedades físicas tais como, rigidez, densidade, dureza e resistência à tração. Isso ocorre porque a estrutura ramificada de algumas regiões das moléculas impede um arranjo perfeitamente ordenado das cadeias. Já as ramificações de cadeia longa presentes no PEBD apresentam um efeito mais pronunciado sobre a reologia do fundido devido à redução do tamanho molecular e ao aumento dos entrelaçamentos. Além disso, as ramificações curtas permite um empacotamento maior nos cristalitos, aumentando as temperaturas de fusão e transição vítrea, além de melhorar as propriedades mecânicas.

Por ter uma excelente capacidade de selagem a quente, o PELBD vem substituindo o PEBD em várias aplicações, tais como filmes para fraldas descartáveis e absorventes. Em alguns casos é utilizado em blendas com PEAD e PEBD como em embalagens de produtos agrícolas, por exemplo.

2.1.2.6 Polietileno de Ultra Alto Peso Molecular (PEUAPM)

Em relação à estrutura química, o PEUAPM e o PEAD são muito parecidos, sendo ambos os homopolímeros de cadeia linear, derivados do gás etileno. A grande diferença está no peso molecular: o peso molecular do PEAD raramente ultrapassa 500.000, enquanto que, o PEUAPM atinge valores em torno de 3.000.000. (KURTZ, 2009)

As longas cadeias moleculares promovem uma excelente resistência à abrasão, dureza elevada, mesmo em temperaturas criogênicas, excelente resistência ao stress cracking, ao impacto e baixo coeficiente de atrito. No entanto, não permitem que o material possa ser processado de maneira convencional (injeção, extrusão, extrusão-sopro, etc.). Isso acontece por que o ponto de fusão do material é tão alto, que

na prática, o material se degrada antes mesmo que atinja o ponto de fusão.

O PEUAPM é material polimérico quase totalmente inerte, o que faz com que seja indicado para uso em praticamente todos os tipos de ambientes agressivos ou corrosivos sob temperaturas moderadas. Mesmo em temperaturas elevadas, só é atacado por solventes aromáticos ou halogenados e por oxidantes fortes, como ácido nítrico. Assim como a maioria dos polímeros, está sujeito a degradação por radiação UV e oxigênio.

Suas principais aplicações são em produtos suscetíveis ao desgaste, que necessitem de um baixo coeficiente de atrito e/ou autolubrificação, tais como gaxetas, guias, roletes, etc. Uma das principais e mais promissoras aplicações é na produção de implantes ortopédicos e cirúrgicos. (KURTZ, 2009)

2.2 RADIAÇÕES IONIZANTES E SUAS FONTES

Radiações ionizantes são aquelas que possuem energia suficiente para ionizar um átomo ou molécula gerando íons.

As radiações ionizantes podem ser geradas por processos de decomposição de núcleos atômicos instáveis ou pela desexcitação de átomos e de seus núcleos em reatores nucleares, aceleradores de partículas, máquinas de raios-X, etc. (OLIANI, 2013) (Radiation Biology: A Handbook for Teachers and Students., 2010)

2.2.1 Raios - X

Embora possam ter origem natural, os raios-X de interesse técnico são produzidos por dispositivos chamados tubos de raios X, que consistem em um filamento que produz elétrons por emissão termoiônica (catodo), que são acelerados fortemente por uma diferença de potencial da ordem de milhares de volts, até um alvo metálico (anodo), onde colidem. A maioria dos elétrons são absorvidos ou espalhados, gerando apenas calor no alvo, no entanto, cerca de 5% desses elétrons sofrem uma desaceleração brusca, gerando ondas .

2.2.2 Radiação α

A radiação α trata-se de uma partícula formada de dois prótons e dois nêutrons, carga 2^+ . Possui uma elevada energia cinética mas baixa penetrabilidade, não conseguindo atravessar as primeiras camadas

epiteliais, por isso, oferece pouco risco quando um indivíduo sofre apenas exposição externa, no entanto, pode ser bastante agressiva as mucosas quando radionuclídeos são inalados ou ingeridos.

2.2.3 Radiação β

Consiste de um elétron negativo (e^-) ou positivo (e^+) emitido pelo núcleo na busca de sua estabilidade, quando um nêutron se transforma em próton ou um próton se transforma em nêutron. Seu poder de penetração é um pouco superior ao das partículas α , limitando-se a alguns milímetros na matéria.

2.2.4 Radiação γ

Durante o decaimento radioativo, os núcleos instáveis emitem raios α e raios β na forma de partículas, com isso, o núcleo permanece excitado até a emissão de um fóton de radiação γ . Embora apresentem uma capacidade menor de ionizar átomos e moléculas quando comparada as radiações α e β , devido as suas características, é capaz de atravessar vários metros na matéria. Sendo utilizada em radioterapia, radiografias industriais e controle microbiológico de alimentos embalados. (CALVO, 2005)

Como dito anteriormente, as radiações α , β e γ são originadas no decaimento radioativos de alguns elementos químicos instáveis, esses elementos são chamados de radioisótopos. As características exigidas de um radioisótopo como fonte de raios- γ apropriada para uso em processos médicos ou industriais são:

- Disponibilidade do isótopo em grande quantidade;
- Fornecimento de raios γ com energia suficiente para penetrar profundamente nos materiais;
- Meia-vida longa o suficiente para manter um ritmo constante de processamento razoável.

Apenas ^{137}Cs e ^{60}Co cumprirem esses requisitos e foram considerados adequados para a esterilização por raios- γ . A maioria das instalações de esterilização por radionuclídeos usam o ^{60}Co , que é produzido em um reator nuclear pelo bombardeamento do ^{59}Co , que ocorre naturalmente, com nêutrons. O ^{60}Co emite dois raios γ (fótons) com energias de 1,33 e 1.17MeV e um elétron. Com uma meia-vida de 5,3 anos, a radiação diminui em cerca de 10% ao ano. O ^{137}Cs é um produto de fissão, recuperado a partir de elementos de combustíveis usados em reatores nucleares. Tem uma meia vida de aproximadamente 30 anos e sua

radiação é composta por um elétron e um fóton (0.66MeV) (SPOTHEIM-MAURIZOT, BELLONI e DOUKI, 2008).

2.2.5 Irradiador

Embora os irradiadores atuais possam utilizar o ^{137}Cs como fonte de radiação γ , os mais comuns usam como combustível o ^{60}Co . Esse tipo de equipamento é formado por uma câmara de irradiação com paredes de concreto blindado, onde fica armazenada a fonte de ^{60}Co (pastilha). Quando não está em operação, a fonte permanece armazenada em uma piscina de aço inox, com água especialmente tratada, conforme pode ser visto na **Erro! Fonte de referência não encontrada.** (WALDER e CAMARGO, 2005)

Nesse equipamento os tipo de equipamento, os produtos ficam armazenados em "containers" e são levados ao interior da câmara de irradiação, onde rebem a dose programada (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**).

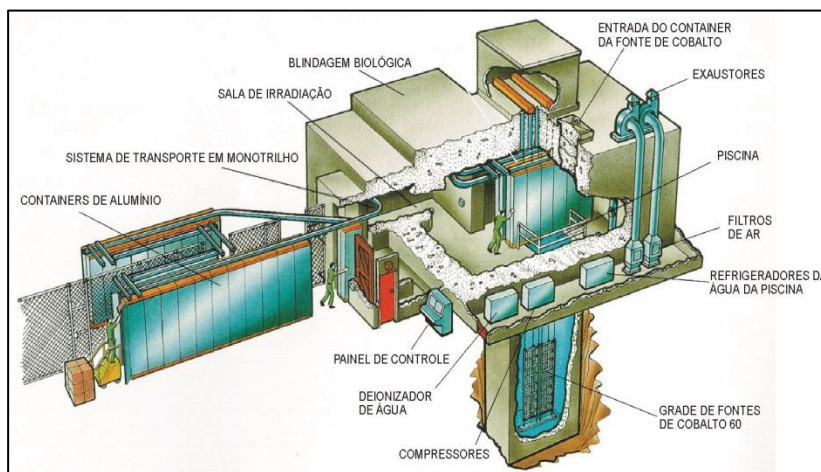


Figura 7 - Esquema de irradiador de ^{60}Co

Fonte: <http://www.cena.usp.br/irradiacao/irradiador.gif>

2.3 MATERIAIS ANTIMICROBIANOS: CONCEITOS E ASPECTOS GERAIS

2.3.1 Aspectos Gerais

Os materiais antimicrobianos são compostos dotados da capacidade de inibir o crescimento ou matar determinados micro-organismos, tais como bactérias, protozoários e fungos. A utilização dessa classe de materiais é bastante ampla, tanto em produtos quanto em processos.

Durante toda a história, a humanidade tem procurado meios de controlar ou eliminar os micro-organismos nocivos. Nessa busca, vários métodos têm sido utilizados: para a preservação da água (e alguns gêneros alimentícios), utilizavam-se jarros de cobre ou prata; para a preservação de carnes, a desidratação por sal ou a utilização de especiarias é utilizado até hoje. Além disso, diversos, vários agentes com propriedades antimicrobianas (vinagre, vinho, mel, cloreto de mercúrio e outros) também têm sido usados na limpeza de ferimentos (DENYER e MAILLARD, 2002).

O desenvolvimento de anticépticos cirúrgicos no século XIX marcou a introdução do uso de desinfetantes. Desde esta época, o uso de água clorada, carvão e soluções fenólicas puras têm reduzido drasticamente os casos de infecções hospitalares. Desde então, diversos compostos químicos tem sido introduzidos na fabricação de produtos que hoje utilizados nas escolas e farmácias. Substâncias como mercúrio clorado, sulfato de cobre, peróxido de hidrogênio e agentes libertadores de cloro, ainda são aplicados como agentes biocidas. Atualmente, utilizam-se biocidas em gêneros alimentícios e na medicina para aumentar a longevidade dos alimentos e, em produtos farmacêuticos, para manter a esterilidade de determinados compostos (produtos farmacêuticos) (DENYER e MAILLARD, 2002).

O ano de 1928 foi marcante para a busca de novos agentes antimicrobianos. Em um experimento com bactérias do tipo Estafilococo, Alexander Fleming observou que havia o crescimento de um fungo chamado *Penicilium notatum*, que havia contaminado uma placa de cultura de bactérias que deixara aberta por descuido. Este fungo produzia uma substância bacteriolítica difusível, capaz de matar os Estafilococos: a PENICILINA. Essa descoberta, considerada a precursora dos antibióticos modernos, juntamente com os desenvolvimentos obtidos por Florey e Chan nas técnicas de obtenção do produto, permitiram que desde 1939 a penicilina venha sendo utilizada

no tratamento de infecções geradas por micro-organismos (DENYER e MAILLARD, 2002).

Até a Segunda Guerra mundial a produção de penicilina era insuficiente para a demanda existente. Com o aumento do interesse em desenvolver e pesquisar novos antibióticos, durante a guerra, outros antibióticos foram descobertos e ainda estabelecidos padrões de sensibilidade para outros micro-organismos. Em 1943, Waksman descobriu a estreptomicina e, pouco depois, Dubos descobriu a garamicina e a tirocidina. Em 1944, as pesquisas de Duggar resultaram na descoberta da clortetraciclina (DENYER e MAILLARD, 2002).

Mesmo com o desenvolvimento de novos compostos biocidas, novas cepas bacterianas resistentes têm surgido, exigindo o desenvolvimento de métodos alternativos para o controle da proliferação e prevenção de doenças causadas por agentes microbiológicos nocivos à saúde humana. Diante deste quadro, de certa forma, tais necessidades contribuíram para o direcionamento de linhas de pesquisa e o avanço da ciência no estudo e desenvolvimento de materiais com propriedades antimicrobianas, ou seja, materiais que apresentam o potencial de morte às bactérias, fungos e outros micro-organismos.

Inúmeras atividades de pesquisa têm proporcionado o desenvolvimento de materiais antimicrobianos com propriedades especiais. Essas propriedades podem ser adicionadas durante a sua produção, envolvendo técnicas e formulações específicas, de maneira que apresentem ação biocida e que, ao mesmo tempo, não comprometam outras propriedades dos materiais, tais como as propriedades mecânicas, elétricas, térmicas, magnéticas e outras.

Dentre os compostos biocidas, destacam-se os alguns ácidos orgânicos, bactericinas, isoticianatos, benzoatos, sorbatos, imazalil, dióxido de cloro e alguns íons metálicos. Estes compostos (agentes antimicrobianos) podem ser empregados na forma de aditivos na fabricação de produtos antimicrobianos com destinos de aplicação específicos. Tais agentes interagem diretamente com as células dos micro-organismos conduzindo-as à morte. De acordo com a aplicação, diferentes métodos de produção de materiais antimicrobianos podem ser utilizados em virtude do produto final ou do agente antimicrobiano mais apropriado. Por exemplo: sais contendo prata na forma iônica e os compostos à base da molécula orgânica de Triclosan (um Tri-Cloro Fenol) têm sido muito utilizados na produção de materiais antimicrobianos, devido os seus elevados efeitos bactericidas e baixos efeitos toxicológicos.

No entanto, a utilização de agentes biocidas como aditivos na

produção de materiais antimicrobianos exige avaliações rigorosas a respeito do efeito biocida no material e da influência dos procedimentos adotados para a produção do material. Muitos destes agentes são tóxicos em elevadas concentrações e/ou sofrem degradações a partir de determinadas temperaturas e tipos de atmosferas. Desta forma, deve-se fazer uma seleção criteriosa do aditivo biocida, bem como do processo de produção do material bactericida, de forma que este não se torne tóxico ou perca sua eficiência no momento do uso.

Uma vez dominada toda a tecnologia de produção destes materiais, as suas utilizações em aplicações práticas é incontável. A utilização de produtos desenvolvidos à base de materiais biocidas em hospitais, unidades de ensino, sanitários, em embalagens alimentícias, laboratórios químicos e bioquímicos e outros, apresentam-se como forma preventiva e de combate a doenças.

2.3.2 Triclosan

O Triclosan é o nome comercial para o composto de fórmula 2,4,4'-triclora-2' hidroxil difenil éter. (Figura 8) É um sólido branco, pouco solúvel em água (10 mg / L), mas solúvel em soluções diluídas de álcalis e solventes orgânicos. Sua atividade não é comprometida por sabões, a maioria dos surfactantes, solventes orgânicos, ácidos ou álcalis, mas surfactantes etoxilados como polissorbato podem prender o Triclosan dentro de micelas, impedindo a sua ação (JONES, JAMPANI, *et al.*, 2000). Por apresentar elevada eficiência na ação antimicrobiana, aplica-se o Triclosan com concentrações relativamente baixas, da ordem de 0,05 a 2,00 % em massa, de acordo com as funções solicitadas pelos produtos de interesse.

O Triclosan é geralmente bacteriostático contra uma ampla γ de bactérias gram-positivas e gram-negativas, além de apresentar alguma atividade fungistática. Inibe estafilococos em concentrações que variam de 0,1 a 0,3 μ g / ml. (FRAISE, LAMBERT e MAILLARD, 2004)

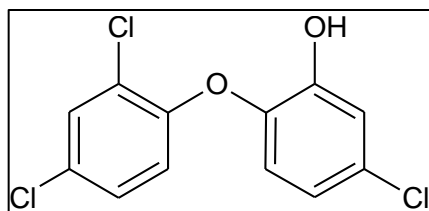


Figura 8 – Molécula de Triclosan

Paradoxalmente, um número de cepas de *Escherichia coli* são inibidos por um intervalo de concentração semelhante. A maioria das cepas de *P. aeruginosa* requerem concentrações variando de 100 a 1000 $\mu\text{g} / \text{ml}$ para a inibição. Inibe o crescimento de várias espécies de mofo uma faixa de 1 a 30 $\mu\text{g} / \text{ml}$. (MCDONNELL e RUSSELL, 1999) O Triclosan é comumente encontrado em uma vasta γ de produtos de higiene pessoal, tais como cremes dentais, sabonetes, espumas de banho e desodorantes. É ideal para estas aplicações como ela tem uma baixa toxicidade e irritação e é substancial para a pele. Atualmente, tem-se pesquisado uma variedade de outras aplicações para o Triclosan, como por exemplo, na incorporação de plásticos e tecidos, com o intuito de conferir atividades antimicrobianas. (ROBERTSON, 2009)

2.3.3 Vidro antimicrobiano a base de Zn

Praticamente todos os metais, principalmente os metais pesados, exibem propriedades tóxicas aos micro-organismos acima de certas concentrações. Os principais mecanismos de toxicidade baseiam-se na forte habilidade de coordenação nas ligações químicas. A variedade das ligações existentes nos micro-organismos torna possível que sofram influência dos metais em alguma de suas etapas de crescimento e desenvolvimento. Os efeitos tóxicos incluem: bloqueio dos grupos funcionais de importantes moléculas, como enzimas, polinucleotídeos; sistemas de transportes para nutrientes; troca ou deslocamento de íons essenciais; e rompimento da integridade das membranas da célula e das organelas (ANGIOLLETO, 2003).

Atualmente, vidros com características antimicrobianas vêm sendo desenvolvidos com resultados bastante interessantes. Esses vidros são produzidos realizando-se trocas iônicas onde o Na^+ é substituído por Ag^+ . Embora não sejam tão eficientes quanto os íons de Ag, o Zn mostram-se bastante interessantes para o desenvolvimento de materiais antimicrobianos, tanto pela baixa toxicidade aos seres humanos quanto pelo custo.

2.4 CONTROLE MICROBIOLÓGICO

O controle microbiológico visa eliminar, prevenir ou impedir o crescimento de micro-organismos em uma ampla variedade de produtos (DEAN, EVANS e HALL, 2005). A seguir serão descritos os principais métodos de controle antimicrobiano, bem como os níveis de proteção

conferidos por cada um (TSAI, 2006). Para facilitar o entendimento, na Tabela 1 alguns termos utilizados no controle microbiológico.

Limpeza: Embora possa até matar alguns micro-organismos, a limpeza tem como objetivo a remoção dos germes. Os agentes utilizados para esse fim são água e sabão, detergentes, ultrassom e agentes sanitizantes. Em alguns casos, se realiza a higienização com agentes bacteriostáticos, de maneira a inibir o crescimento de novas colônias.

Desinfestação: Combate os veículos transmissores de doenças e moléstias, tais como roedores, pequenos animais e insetos (mosquitos, pulgas, piolhos, etc.).

Desinfecção: a desinfecção consiste na redução do número de micro-organismos patogênicos, até um nível que seja insuficiente para causar algum mal. Em geral, a desinfecção elimina todos os micro-organismos vivos, sem, no entanto, eliminar os esporos. Para isso, utilizam-se agentes antissépticos, desinfetantes, germicidas, processos de cloração, etc. No caso de alimentos, a pasteurização também é considerada um processo de desinfecção.

Esterilização: em teoria, a esterilização é um processo no qual todos os organismos vivos são eliminados de um ambiente ou objeto, inclusive as formas mais resistentes de esporos bacterianos. Mas na prática, a esterilização não implica na total inativação das enzimas celulares, toxinas, etc., portanto, é considerado estéril quando apenas um micróbio sobrevive a cada milhão eliminado.

Esterilização Comercial: os processos de esterilização, principalmente envolvendo o calor, podem provocar alterações nutricionais e organolépticas nos alimentos, muitas vezes os tornando inadequados para o consumo. Dessa forma, a utilização de técnicas menos agressivas se faz necessário para a conservação de alimentos. Essas técnicas são chamadas de esterilização comercial ou apertização. Nesses casos, o tratamento térmico inativa todos os micro-organismos patogênicos e deterioradores que possam crescer sob condições normais de estocagem. Os alimentos comercialmente estéreis podem conter um pequeno número de esporos termorresistentes, que não se multiplicam no alimento.

Pasteurização: a pasteurização é um processo de tratamento térmico de alimentos onde são utilizadas temperaturas inferiores as de esterilização. (aproximadamente 62°C durante 30 minutos ou 72°C, por 15 segundos). Nesses casos, os micro-organismos não são completamente eliminados, mas seu metabolismo é retardado, devido a desativação de algumas enzimas (OLIVEIRA, 2006).

Tabela 1 - Termos aplicados ao controle microbiológico

Termo	Definição
Antisséptico	Um agente químico que pode ser usado topicamente no tecido para destruir ou controlar o crescimento de micro-organismos
Desinfetante	Um agente químico usado em objetos e superfícies para destruir ou controlar o crescimento de micro-organismos
Esterilização	A destruição de todos os micro-organismos em ou sobre um material (como ataduras) ou líquidos (tais como fluidos irritantes)
microbio-estático	Um agente que inibe o crescimento de um micro-organismo (por exemplo, bacteriostático)
microbio -cida	Um agente que mata os micro-organismos (bactericida, por exemplo)

2.4.1 Mecanismos e Cinética de Desinfecção

Na desinfecção, os agentes químicos inibem o crescimento de micro-organismos (próximo a zero), por meio de uma ou múltiplas reações que danificam componentes das células. Dessa forma, agentes bactericidas são mais eficientes que os bacteriostáticos, uma vez que no bactericida, a taxa de morte das bactérias é maior que a de crescimento. Os agentes antimicrobianos basicamente em dois componentes básicos de qualquer micro-organismo: proteínas (capa proteica de vírus) e membranas (procarióticas e eucarióticas). (GOOCH, 2010)

2.4.1.1 Proteínas

Boa parte das células é composta de proteínas, bem como as suas enzimas. A alteração de uma proteína é denominada desnaturação. Na desnaturação, as ligações de pontes de hidrogênio e de dissulfetos são rompidas fazendo com que essas proteínas percam a sua funcionalidade, portanto, agentes que desnaturam proteínas, as impedem de realizar as suas funções naturais.

As proteínas são desnaturadas temporariamente quando tratadas com calor, ácidos fracos ou bases, voltando muitas vezes sua forma original. No entanto, acima de certos valores, tanto a concentração dos agentes desnaturantes quanto a temperatura de tratamento tornam essa desnaturação permanente. Dessa forma, quando a desnaturação é

temporária, o agente é germistático e quando é permanente, é germicida. As principais reações de desnaturação de proteínas são a oxidação, hidrólise e a fixação de átomos ou grupos funcionais.

2.4.1.2 Membranas

As membranas são basicamente constituídas por proteínas e lipídios, o que as torna sensíveis a todas as reações de desnaturação de proteínas. Quanto aos lipídios presentes nas membranas, vários agentes podem perturbar suas funções:

- Solventes orgânicos como o etanol, por exemplo, podem dissolver esses lipídios;
- Agentes surfactantes podem reduzir a energia livre de superfícies e emulsificá-los;
- As membranas são carregadas negativamente e são afetadas por agentes catiônicos, tais como sais quaternários de amônio e compostos de biguanida incluindo clorexidina.

A penetração da parede celular para o núcleo de protoplasma procarióticas e células eucarióticas é comum e resulta na fuga de um dos componentes de dentro da célula, destruindo-a.

2.4.2 Outras reações

Além dos agentes químicos e do calor, as radiações ultravioleta e ionizantes (radiação γ , raios-X e elétrons acelerados) também atuam no controle microbiológico. Em ambos os casos, o efeito é sobre o DNA e o RNA destruindo-o ou alterando-o de forma a impedir que a células consigam realizar as suas funções vitais básicas ou simplesmente impedindo a sua reprodução.

2.5 ESTERILIZAÇÃO

Conforme visto no início do item 2.4, a esterilização consiste na eliminação quase que completa das formas viáveis de micro-organismos de um determinado produto. Assim, quando comparado com a desinfecção, a esterilização é muito mais exigente, uma vez que para ser considerado estéril, o material deve estar livre de todos os micro-organismos, inclusive esporos. Dessa forma, podemos citar as características de um agente esterilizante ideal (GOOCH, 2010).

- Excelente atividade antimicrobiana (inclusive esporicida);
- Ausência de resíduos no produto após o tratamento de esterilização;
- Não atacar o material em tratamento;
- Alto poder de penetração (poros, fibras, etc.);
- Atóxico ao meio ambiente.

Os principais métodos de esterilização são a esterilização por calor (seco e úmido), química e por radiação.

2.5.1 Esterilização por calor

2.5.1.1 Calor a seco

Utiliza-se de fornos providos de ventiladores para a circulação do ar quente para esterilização, geralmente de material estável e de instrumentos. Não tem a mesma eficiência que o processo a vapor, uma vez que o ar seco tem uma capacidade de troca de calor inferior ao vapor, exigindo temperaturas mais altas (indo de 130°C a mais de 200°C). Além disso, o ar seco não tem a capacidade de romper as pontes de hidrogênio presentes nas membranas celulares, da mesma forma que o vapor. (FRAISE, LAMBERT e MAILLARD, 2004)

O calor seco como meio de esterilização é reservado para os produtos e materiais que contêm pouca ou nenhuma água e não podem ser saturado com vapor durante o ciclo de aquecimento. É usado para secar as drogas em pó, recipientes resistentes ao calor (mas não artigos de borracha), alguns tipos de curativos e instrumentos cirúrgicos. Os instrumentos incluem bisturis metal, aço, instrumentos e seringas de vidro (embora a maioria das seringas sejam feitas de plástico e, portanto, são descartáveis). A vantagem da esterilização por calor seco de seringas é que elas podem ser esterilizadas totalmente montadas. As dificuldades associadas com seringas autoclave incluem a falta de penetração do vapor, reforçada pelo efeito protetor dos lubrificantes, e a necessidade de montá-los após a esterilização. (FRAISE, LAMBERT e MAILLARD, 2004)

2.5.1.2 Calor úmido

O principal método de esterilização por calor a úmido é a autoclavagem. Nesse processo, a água aquecida em recipiente fechado, onde o vapor fica retido sob pressão, atingindo uma temperatura mais elevada do que a suas temperatura de ebulição, sem entrar em ebulição.

No autoclave, o que realmente esteriliza é o calor úmido e não a pressão. A morte dos microrganismos pela autoclave termo-coagulação e desnaturação ocorre pela das proteínas microbianas.

Dentre as principais vantagens destacam-se o baixo custo e facilidade de uso. No entanto, não deve ser utilizado na esterilização de materiais sensíveis a umidade, pós e líquidos.

2.5.2 Esterilização química por óxido de etileno

A esterilização química consiste na utilização de um poderoso agente bactericida, em geral, na forma de gás. Dentre os processos de esterilização química, o mais utilizado é a *esterilização por óxido de etileno (EtO)*.

O EtO é um epóxido com a fórmula estrutural C_2H_4O de peso molecular igual a 44,05. É um gás incolor à temperatura e pressão atmosférica. Apresenta ponto de ebulição a $10,8^{\circ}C$; ponto de fusão a $-112^{\circ}C$; ponto de fulgor a $-20^{\circ}C$ e ponto de ignição a $429^{\circ}C$ (VIGGIANO, GODOI e MARTINS). É extremamente tóxico, carcinogênico e explosivo, o que exige controles rigorosos de qualidade e segurança. A portaria interministerial nº 482 de 16 de abril de 1999, proíbe terminantemente o uso da esterilização por EtO para esterilização de materiais e artigos que não sejam de uso médico-hospitalares (WALDER e CAMARGO).

2.5.3 Esterilização por radiação

Como visto anteriormente, as técnicas de esterilização por calor e por EtO, não podem ser utilizadas em muitos casos. Materiais sensíveis ao calor e a umidade como poliamidas e metais suscetíveis a oxidação em presença de água, não podem ser esterilizados por autoclave ou até mesmo calor a seco. Muitos cosméticos, fármacos e medicamentos, também necessitam de esterilização, mas podem reagir em presença de produtos químicos esterilizantes. Além disso, resíduos desses agentes podem ser tóxicos aos seres humanos. Por esses motivos, a esterilização por radiação tem ganhado cada vez mais aplicações.

Existem dois tipos de básicos de esterilização por radiação: por radiação não ionizante (ultravioleta (UV)) e radiações ionizantes

2.5.3.1 Esterilização por radiação UV

A radiação UV (de 200 a 400 nm) é bastante letal, mas sua penetrabilidade é bastante baixa, não atravessando vidros, filmes sujos e outros materiais. Por isso, sua eficiência limita-se a eliminar micro-organismos presentes em superfícies, no ar e líquidos transparentes ao ultravioleta, como na desinfecção da água. A radiação UV também pode ser usada para destruir vestígios de contaminação do DNA em armários e aparelhos utilizados para manipular o DNA. (KOWALSKI, 2009)

Embora diversas reações danosas possam ocorrer nos micro-organismos durante a exposição à radiação UV, seu principal alvo é o DNA. Por esse motivo, a maioria das lâmpadas UV comerciais emitem luz ultravioleta em torno de 254 nm, o que corresponde à máxima absorção de bases de DNA. (KOWALSKI, 2009)

Por outro lado, não podem ser descartados outros efeitos deletérios do UV, uma vez que quando a 330-480 nm, observa-se dano celular, sem estar primariamente relacionado ao ataque ao DNA. O principal mecanismo é o foto-envelhecimento, que ocorre pela monomerização de dímeros da pirimidina. No entanto, embora esse efeito também cause danos aos micro-organismos, seu efeito é bastante limitado. (KOWALSKI, 2009)

2.5.4 Esterilização por radiação □

Radiação ionizante na forma de raios-□ de isótopos radioativos (por exemplo, o cobalto-60) ou feixes de elétrons de alta velocidade, produzida por aceleradores de partículas é amplamente utilizado como uma alternativa à esterilização gasosa para a esterilização terminal de produtos farmacêuticos ou médicos. Esses métodos são de especial valor para os produtos que não podem suportar os procedimentos convencionais de esterilização por calor. As radiações ionizantes removem elétrons dos átomos do material por onde passam. Os efeitos químicos e biológicos que matam organismos contaminantes são produzidos por esses elétrons e através da geração de radicais livres altamente reativos. É evidente que estas espécies ativas podem também exercer indesejados efeitos nocivos sobre tanto em produtos farmacêuticos e materiais de embalagem. Procedimentos de esterilização

devem equilibrar a ação antimicrobiana contra os efeitos deletérios sobre o produto a ser irradiado.

2.5.4.1 Unidades da radiação nuclear

Devido à elevada energia associada às radiações nucleares, em relação às ligações químicas, a absorção dessa radiação pela matéria, gera diversas reações químicas. No caso dos tecidos vivos, essas reações podem causar lesões graves e até a morte. Existem basicamente dois tipos de unidades de para quantificar a energia transferida durante o processo de irradiação: medidas físicas e biológicas.

As unidades físicas medem a atividade da fonte de radiação. A unidade do SI de radiação nuclear física é o Becquerel (Bq). Uma fonte de radiação de atividade de 1 Bq tem uma desintegração nuclear por segundo. A unidade de radiação nuclear biológica tem por objetivo medir o efeito da radiação nuclear sobre tecidos vivos. Sua unidade no SI é o Gray (Gy) e equivale a transferência de 1 J por 1 kg de tecido vivo. Uma outra unidade mais antiga de medida é o rad (dose de radiação absorvida) que equivale a transferência de 100 ergs para 1g(0,01 J / kg) de tecido. Portanto, uma dose de 25kGy, que é a dose habitual para a esterilização (ver item 2.5.4.2), equivale a 2,5Mrad.

2.5.4.2 Dose para atingir um nível de garantia de esterilidade (SAL)

A esterilização é definida como um processo que torna um produto livre de micro-organismos viáveis. Como o processo de morte é descrita por uma função exponencial, a presença de microrganismos viáveis remanescentes no item individual só pode ser expresso em termos de probabilidade. Embora estatisticamente possa ser reduzida a um número extremamente baixo pelo processo de esterilização, ela nunca pode ser considerado como sendo zero. A probabilidade pode ser expressa como um nível de garantia de esterilidade (*sterility assurance level (SAL)*), que é a probabilidade de um microrganismo viável estar presente na unidade do produto após a esterilização. A “Medical Devices Directorate” afirma que a administração de uma dose de radiação em excesso de 25kGy (2,5Mrad) é aceito como garantia de esterilidade. A dose de 25 kGy é baseada em uma análise da resistência de radiação de micro-organismos. (RATNER, HOFFMAN, *et al.*, 2004)

2.5.4.3 Mecanismos de ação letal

No caso da esterilização por radiação, a inativação de microrganismos ocorre de duas formas:

Diretamente: ionizando diretamente uma molécula vital à célula, como o DNA, enzimas, proteínas, etc.;

Indiretamente: por meio da reação dos radicais livres produzidos no líquido celular.

Os principais alvos das radiações ionizantes em micro-organismos são ácidos nucleicos, principalmente do DNA e do RNA (inclusive em vírus). Danos adicionais podem ser causados às membranas celulares e enzimas envolvidas no reparo de ácido nucleico (INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, 2008).

As radiações ionizantes induzem danos estruturais no DNA microbiano, o que, a menos que seja reparado, vai impedir a síntese de DNA e/ou causar algum erro na síntese de novas proteínas, levando à morte celular. (RATNER, HOFFMAN, *et al.*, 2004)

A radiação \square atua particularmente com a água no interior das células, gerando radicais livres do tipo H^+ e OH^- (além de um elétron livre) que são capazes de se difundir e atacar o DNA. Vale a pena ressaltar que o radical OH^- é o responsável por 90% dos danos ao DNA, pois atacam as ligações fosfodiéster do DNA, resultando na quebra das fitas simples e duplas. Danos aos açúcares e bases também pode ocorrer, por exemplo, a produção de 5,6-dihidróxi-5,6-dihidrotimina (timina glicol) a partir da timina; (FRAISE, LAMBERT e MAILLARD, 2004) (INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, 2008).

2.5.4.4 Vantagens e aplicações da esterilização por radiação \square

Um das características mais interessante da esterilização por radiação, é que o aumento da temperatura do produto irradiado é insignificante. Isso permite a sua utilização em produtos sensíveis ao calor, tais como fármacos, alimentos, termoplásticos, borrachas, têxteis, metais, papéis, vidros, adesivos, tintas, etc. (SOMMERS e FAN, 2006) (ARVANITTOYANNIS, 2010) (HAN, 2007). Essa grande quantidade de produtos compatíveis com a esterilização permite uma redução nos custos de implantação de uma unidade esterilizadora.

Sua alta penetrabilidade assegura uma esterilização completa, mesmo de produtos que possuam cavidades de difícil penetração por

gases. Com isso, elimina-se a necessidade da utilização de embalagens permeáveis a gases e, ao mesmo tempo, permite que o produto seja esterilizado já em sua embalagem final. Neste caso, evita-se a recontaminação do produto, uma vez que este se mantém estéril até o momento da abertura da embalagem. (INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, 2008)

Diferentemente como acontece com a esterilização por EtO, uma vez encerrado o processo de esterilização o produto está pronto para o uso, não necessitando de quarentena nem processos posteriores para a remoção de resíduos do agente esterilizante (FRAISE, LAMBERT e MAILLARD, 2004) (INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, 2008).

2.6 EFEITOS DA RADIAÇÃO □ EM POLÍMEROS

2.6.1 Reações por radicais livres

Para os materiais poliméricos o principal mecanismo de danos provocados pela radiação é pela formação de radicais livres. O dano é iniciado com a ejeção de um elétron de alta energia (MARK, 2003). As reações são mostradas na Figura 9.

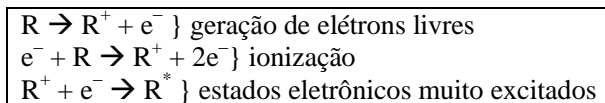


Figura 9 - Reações de geração de estados eletrônicos muito excitados

Estes radicais que se encontram no estado excitado decaem para o estado fundamental, emitindo fosforescência e fluorescência, ou por meio de reações químicas, por quebra das ligações heterolíticas produzindo íons, ou por quebra das ligações homolíticas, favorecendo a formação de radicais livres (Figura 10) (MARK, 2003):

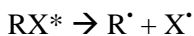


Figura 10 - Formação dos radicais livres

Em geral, para polímeros, é a geração de radicais livres que domina. Isto leva a reações de radicais livres que dependem da química

do polímero e das condições ambientais. Tais reações podem resultar na quebra da cadeia principal, a recombinação, ou desproporcionalmente como exemplificado abaixo em polietileno (MARK, 2003) (Figura 11):

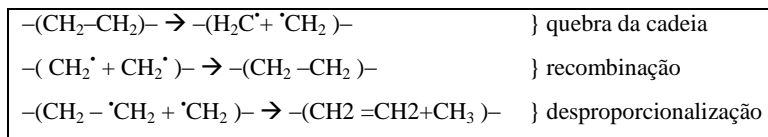


Figura 11 - Reações provocadas por radicais livres

Se o grupo lateral do polímero está envolvido na cisão, pequenos fragmentos radicais são gerados, como um radical de hidrogênio. O perigo desta reação é que este pequeno radical é altamente reativo e móvel, sendo capaz de se difundir grandes distâncias, provocando reações diversas (MARK, 2003).

2.6.2 Efeito do Meio Ambiente

A ação da radiação ionizante pode resultar em quebra da cadeia ou de reticulação, dependendo do ambiente em que o tratamento é realizado, da disponibilidade de gases reagentes ou radicais dentro do próprio polímero. Além disso, a suscetibilidade à degradação depende das características intrínsecas da cadeia principal do polímero. Embora muitos polímeros sofram tanto quebra quanto reticulação das cadeias, na maioria dos casos apenas um dos mecanismos predomina.

2.6.2.1 Ausência de oxigênio

A natureza da estrutura do polímero determina a sua resposta e alterações físicas após a exposição à radiação ionizante. Em geral, polímeros com estrutura do tipo $-(\text{CH}_2-\text{CR}^{\prime}\text{R}^{\prime\prime})-$ tem predominância de quebra das cadeias, e polímeros do tipo $-(\text{CH}_2-\text{CHR}^{\prime})-$ favorecem a formação de ligações cruzadas. Como exemplo, o poli(metilmetacrilato) (PMMA) é um polímero do primeiro tipo, onde os grupos laterais $\text{R}^{\prime} = \text{CH}_3$ e $\text{R}^{\prime\prime} = \text{COOCH}_3$ fazem com que a quebra das cadeias prevaleça. Por outro lado, o poli(acrilato de metila) é um polímero do segundo tipo, com o radical $\text{R} = \text{COOCH}_3$, por isso, predominam a formação de ligações cruzadas. Em geral, polímeros com altas concentrações de átomos de carbono quaternários ao longo da cadeia sofrem cisão enquanto em polímeros sem este tipo de grupos, predominam a formação de ligações cruzadas. A presença de insaturações na cadeia

polimérica contribui para este efeito e aumenta a produção de reticulação (borracha natural é um exemplo). A presença de grupos aromáticos, ao contrário, reduz o efeito da radiação (o poliestireno [PS] é um dos polímeros mais resistentes a radiações ionizantes). Na Tabela 2 estão listados alguns polímeros e os mecanismos predominantes durante o tratamento com radiação □.

Tabela 2 - Tipo de reação dos polímeros durante a exposição à radiação (adaptado de Encyclopedia of Polymer Science and Technology (MARK, 2003).

Predominam quebras de cadeia	Predominam ligações cruzadas
Poli (metil metacrilato)	Polietileno
Poliisobuteno	Polipropileno
Poli □-metil-estireno	Poliestireno
Poli cloreto de vinilideno	Poliacrilatos
Poli fluoreto de vinila	Poliâmidas
Poliacrilonitrila	Poli cloreto de vinila
Politetrafluoretileno	Poliésteres
Celulose e derivados	Elastômeros insaturados
DNA	Borracha natural

2.6.2.2 Presença de oxigênio

O meio ambiente afeta drasticamente a resposta de um polímero de exposição à radiação. Quando a radiação ionizante é feita no ar, pode haver uma propensão para a severa degradação estrutural do polímero. A maioria dos polímeros, mesmo aqueles que ligações cruzadas em um ambiente inerte, terão uma tendência a sofrer cisão de cadeia quando o oxigênio está disponível durante a ionização. Nesses casos, a classificação geral descrito na Tabela 1 não é mais válida. Além disso, danos muitas vezes ocorrem em doses de radiação muito menor, e a degradação torna-se um processo dependente do tempo. O mecanismo dependente do tempo de reações de radicais livres constitui grande preocupação para a degradação de polímeros de radiação, especialmente na presença de oxigênio, devido à sua elevada mobilidade de difusão e reatividade. As reações dos radicais livres na oxidação de polímeros, induzida pela radiação, são mostradas na Tabela 3:

A alta capacidade de difusão de oxigênio proporciona uma maior penetração no polímero, resultando na geração de radicais livres reativos

que podem ser de longa duração. Estes radicais são fortemente oxidantes, e reagem criando dentro do polímero, uma série de compostos químicos, tais como ácidos carboxílicos, cetonas, ésteres, derivados de álcoois e peróxidos. As reações dos radicais livres produzem produtos gasosos e na presença do oxigênio podem resultar em gás carbônico, monóxido de carbono e vapor de água. A degradação de peróxidos favorece a formação de ligações cruzadas e promove a geração de mais radicais livres dentro do polímero.

Tabela 3 - Reações promovidas pela radiação, em presença de O₂.

$R + \square \rightarrow R^{\bullet}$	Iniciação
$R^{\bullet} + O_2 \rightarrow RO_2^{\bullet}$ $RO_2^{\bullet} + -RH \rightarrow RO_2H + R^{\bullet}$ $RO_2H + -RH \rightarrow RO^{\bullet} + ^{\bullet}OH$ $RO^{\bullet} + -RH \rightarrow H_2O + R$	Propagação
$RO_2H, RO_2^{\bullet}, R^{\bullet}$	Promotores de quebra ou ligações cruzadas
$2RO_2^{\bullet} \rightarrow RO_2R + O_2$	Terminação

2.6.3 Efeitos da radiação sobre polietilenos

Os polietilenos têm inúmeras aplicações na indústria médica, por esse motivo, a influência da radiação, seja na esterilização de produtos ou na reticulação das cadeias, tem sido objeto de inúmeros estudos.

Conforme dito no item 2.6.1, quando o polietileno é irradiado na presença de oxigênio, o mecanismo favorecido de degradação é o de formação de ligações cruzadas. Estas ligações cruzadas são geradas principalmente nas fases amorfas e ao longo da interface dentre as fases cristalinas e amorfas. Em geral, a densidade de ligações cruzadas aumenta à medida que a cristalinidade diminui. Dessa forma, quando irradiado no estado fundido, há uma maior formação de ligações cruzadas reduzindo a capacidade de cristalização do material. Além disso, devido às características intrínsecas da cadeia principal do polietileno, ocorrem algumas reações específicas deste material, dentre elas, a geração de gás hidrogênio, insaturação das ligações trans-vinileno e degradação dos grupos finais vinil. (CHARLESBY, 1967) A insaturação do trans-vinileno não depende do peso molecular, mas é linearmente dependente da dose de radiação tornando-se um dosímetro eficiente.

Em geral, o efeito da radiação \square , que resulta em formação de ligações cruzadas, é considerado benéfico às propriedades mecânicas

dos polietilenos. Uma reticulação moderada no PEAD resulta num aumento do limite de escoamento e do módulo de elasticidade.

A reticulação do PEUAPM é de grande interesse ortopédico, uma vez que é utilizado na produção de próteses ortopédicas (item 2.1.2.6). Estudos recentes têm mostrado que o aumento das reticulações aumenta drasticamente a resistência ao desgaste nas superfícies de apoio dessas próteses ortopédicas. No entanto, em casos em que não há cuidado com a presença de oxigênio molecular durante o processo de irradiação, o mecanismo prevalecente é o de oxidação e quebra das cadeias, fragilizando o material. Este problema tem atormentado a comunidade ortopédica por muito tempo, isso porque muitas empresas produtoras de próteses ortopédicas usavam a esterilização por radiação \square ao ar, como fonte de esterilização. Atualmente, a esterilização por esse método é feita embalando os produtos em embalagens evacuadas ou preenchidas com gases inertes (Figura 12). (KURTZ, 2009)

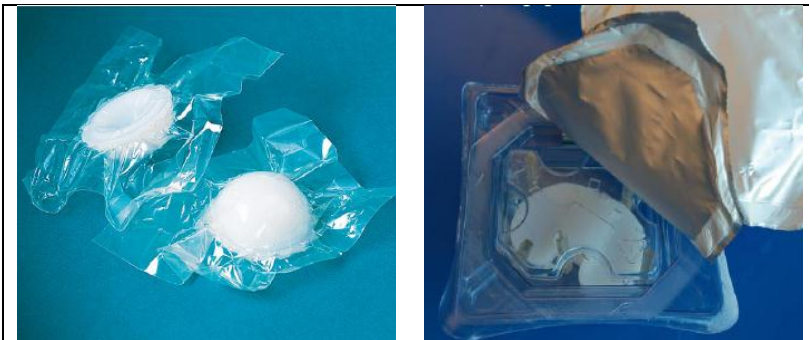


Figura 12 - Embalagens para esterilização de próteses de PEUAPM: (a) embalagem a vácuo (b) embalagem com características de barreira, preenchida com N_2

2.6.4 Efeitos da radiação sobre poliamidas

As poliamidas são normalmente utilizadas em matérias para suturas médicas e em poliméricos para angioplastia com balão. As poliamidas são materiais reticuláveis, mas também sensíveis às reações de quebras de cadeias por radiação \square . Este comportamento tem sido relacionado com o número de grupos CH_3- ou átomos de hidrogênio na estrutura do polímero. Assim como o polietileno, são drasticamente afetadas pelo ambiente no qual a irradiação é realizada. Na ausência de oxigênio há pouca mudança na resistência à tração, no entanto, na

presença de oxigênio, há uma redução considerável no limite de ruptura. As poliamidas podem ser estabilizadas com a adição de grupos aromáticos.

2.7 EFEITOS DA RADIAÇÃO γ NO TRICLOSAN

Üstündağ e Korkmaz (USTÜNDAĞ e KORKMAZ, 2009) estudaram o efeito da degradação causada pela radiação γ no Triclosan. Segundo esse estudo, o efeito da radiação γ é muito semelhante ao provocado pela radiação UV. A fotodegradação do Triclosan resulta na produção de radicais intermediários segundo dois possíveis caminhos (Figura 13)).

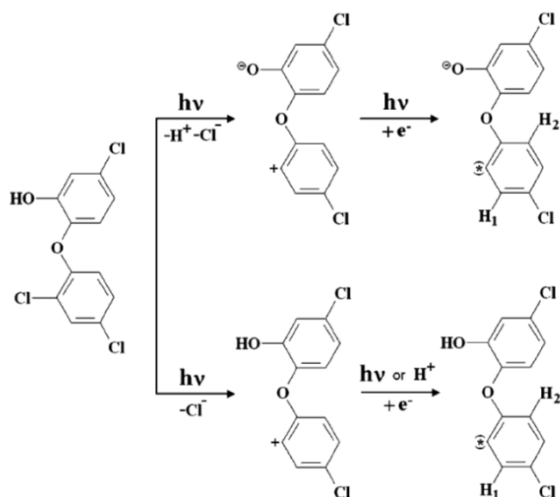


Figura 13 - Caminhos possíveis para a fotodegradação do Triclosan, gerando radicais não iônicos.

Na rota superior, ocorre a remoção de íons H^+ e Cl^- , seguida de uma redução por um fóton e um elétron, gerando um radical aniônico. Na segunda rota, apenas o Cl^- é removido, gerando um *cátion-Triclosan*.

Outros estudos relatam que estes radicais podem formar dibenzodiclora-p-dioxina (DCDD), dibenzo-p-dioxina, clorofenol, diclorofenol e fenol. No entanto, estes estudos foram realizados utilizando-se Triclosan em solução e indicam que esses compostos se formam na presença de radicais OH^\cdot (SON, KO e ZOH, 2009).

Em termos de sensibilidade a radiação, Üstündağ e Korkmaz (USTÜNDAĞ e KORKMAZ, 2009) afirmam que o seu *valor G* para o Triclosan é de 0,12. O “*valor G*” é utilizado como referencia em termos de suscetibilidade ao efeito das radiações ionizantes e indica o número de eventos (formação de ligações cruzadas, cisões, ionização de moléculas, etc.) provocados por cada 100 eV de energia absorvida, isto é, o número de ligações químicas modificadas por cada 100 eV (MELO, 2004). Quando convertido em unidades do sistema universal, temos $12,4 \times 10^{-9}$ mol/J (SPOTHEIM-MAURIZOT, BELLONI e DOUKI, 2008). Para efeito de comparação, o PEAD apresenta valores de G de cerca de 119×10^{-9} mol/J e o PA6 de 145×10^{-9} mol/J (MAKUUCHI e CHENG, 2012).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Como resinas poliméricas foram empregadas o Polietileno de Alta densidade (PEAD) e a Poliamida-6.0 (PA6). As amostras de PEAD e de PA6 foram aditivadas com compostos antimicrobianos de natureza orgânica e inorgânica. Como composto orgânico foi empregado o composto de nome comercial Triclosan, de nome científico 5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi) fenol, e como composto inorgânico um material vítreo dopado de zinco iônico.

Na Tabela 4 são apresentadas as concentrações dos aditivos testados e os polímeros utilizados. Os valores variaram de 0 a 2,5% em intervalos de 0,5%. Esses valores foram utilizados, pois é de muito comum considerar como aditivo toda substância adicionada a um polímero que altere alguma propriedade química ou física em até 2,5%. Embora não haja um consenso quanto a esses valores, é comum considerar que adições acima destes valores sejam consideradas como “cargas”.

Tabela 4 - Concentrações dos aditivos nos polímeros

	Polímeros	
	PEAD	PA6
Aditivos (Triclosan e Vidro) (%)	0,0	0,0
	0,5	0,5
	1,0	1,0
	1,5	1,5
	2,0	2,0
	2,5	2,5

Os aditivos na forma de pó foram inicialmente misturados mecanicamente com os polímeros ainda na forma de *pellets*. Uma vez realizada a mistura, cada composição foi homogeneizada em uma extrusora convencional mono-roscas, da marca Oryzon, modelo Oryzon-OZ-E-EX-L22, e de relação L/D igual a 17. Os parâmetros de processamento foram definidos de acordo com as especificações do fabricante de cada resina termoplástica. Após a primeira extrusão, os grãos obtidos no processo foram misturados mecanicamente e novamente extrudados no mesmo sistema, de maneira a garantir não

apenas a boa dispersão, mas também a boa distribuição do aditivo no polímero.

Após essa etapa, foram avaliados os efeitos do percentual de aditivos no efeito antimicrobiano dos compostos poliméricos. Essas avaliações foram realizadas por meio de testes de difusão em ágar e concentração mínima inibitória (CMI).

3.2 IRRADIAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras de PEAD e de PA6 aditivadas com diferentes compostos antimicrobianos foram irradiadas num Irradiador Multipropósito de ^{60}Co do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN). O nível de radiação foi estabelecido considerando que para a esterilização de embalagens para alimentos são empregados de 0,1 kGy até 10 kGy e para esterilização de produtos hospitalares níveis de 25 kGy (ARVANITOYANNIS, 2010). Assim, como nível de radiação de trabalho foi optado por 25 kGy (*sterility assurance level* (SAL)). (FRAISE, LAMBERT e MAILLARD, 2004) . (RATNER, HOFFMAN, *et al.*, 2004).

No total, foram irradiados aproximadamente 20g de cada formulação, totalizando 100 g de PEAD e PA6 aditivados com Triclosan, 100g de PEAD e PA6 aditivados com o vidro antimicrobiano, 20g de PEAD e PA6 sem aditivos e 50g de cada aditivo puro. No total foram 400g de polímeros aditivados, 40 g de polímeros não aditivados e 100g de aditivos puros.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS PRÉ E PÓS-IRRADIAÇÃO

3.4 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Os ensaios microbiológicos foram realizados com a finalidade de determinar a eficiência antimicrobiana dos compostos de PEAD e PA6 contendo ou não os aditivos biocidas e irradiados ou não irradiados..

Para tanto, foram realizados testes qualitativos (método de discos-difusão em ágar) com os corpos de prova polímero/aditivo e aditivos puros irradiados. Também foram realizados testes quantitativos de Concentração Inibitória Mínima com os aditivos puros.

Os testes foram realizados antes e após a exposição à radiação γ , de maneira a identificar possíveis alterações na capacidade biocida das amostras. Os testes foram realizados com dois tipos de cepas de bactérias: *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), gram-negativa e gram-positiva, respectivamente.

Ainda foram realizados testes com leveduras, de forma a avaliar o desempenho antimicrobiano antes e após a irradiação também em fungos. Nesse caso, optou-se por adaptar uma técnica utilizada no controle de processo de fermentação nas indústrias de bebidas e de álcool combustíveis que consiste na avaliação do comportamento de curvas de atenuação. Mais detalhes sobre a técnica estão no item 3.4.1.3.

3.4.1.1 Difusão em ágar

Os testes de difusão em ágar foram aplicados nesse trabalho com o objetivo avaliar o efeito da concentração dos aditivos na eficiência antimicrobiana do PEAD e da PA6, bem como avaliar também o efeito da irradiação sobre a propriedade antimicrobiana dos polímeros.

A técnica de difusão em ágar adaptado é um teste qualitativo, onde as amostras a serem testadas são colocadas sobre uma superfície de ágar previamente semeada com um determinado microrganismo, de maneira homogênea em uma placa de petri. Uma vez prontas, as placas de petri são devidamente acondicionadas em uma estufa a 37 °C por 18 h. Durante esse período, o agente antimicrobiano poderá difundir-se para o ágar e impedir o crescimento do microrganismo. Essa região é chamada de halo de inibição e tem seu diâmetro médio associado diretamente com a eficiência biocida. (FIORI, 2008). Porém, esta análise somente é possível quando ocorrer à difusão dos princípios ativos e quando for possível fazer a leitura da região de inibição com boa resolução.

3.4.1.2 Concentração Inibitória Mínima - CIM

A CIM é uma técnica que tem como objetivo determinar a quantidade mínima do agente antimicrobiano necessária para inibir o crescimento microbiano em um determinado meio. Neste trabalho foram utilizados 6 tubos de ensaio contendo 10 ml de BHI (*Brain Heart Infusion*) e neles adicionados 200 μ l de suspensão bacteriana ajustada a 10^8 CFU/ml pelo padrão de turvação MacFarland. Na sequência foram adicionadas 0,346g de polímero aditivado com uma concentração diferente, ou seja, 0,0, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 e 2,5%. Cada amostra teve então

sua turbidez medida por um espectrofotômetro ajustado para um comprimento de onda de 640nm nos intervalos de 4, 8 e 24h. Esses testes foram realizados tanto para o PA6 quanto para o PEAD, irradiados e não irradiados e em todas as concentrações testadas.

3.4.1.3 Redução do nível de atenuação provocada pelos aditivos puros

A curva de atenuação é um parâmetro de controle muito utilizado nas indústrias de produção de bebidas fermentadas (principalmente vinho e cerveja) e de álcool etílico, para avaliar a evolução do processo de fermentação. Baseia-se no fato de que, à medida que o processo de fermentação avança, o açúcar presente na solução aquosa é consumido pelas leveduras é convertido em álcool etílico e gás carbônico.¹ A construção dessa curva é feita medindo-se o teor de açúcar em função do tempo e plotando-se em um gráfico.

Essa medida do teor de açúcar é usualmente feita de maneira indireta, medindo-se a densidade ou o índice de refração. A medida da densidade deve-se é feita, pois as soluções aquosas tem sua densidade aumentada à medida que a concentração do soluto aumenta. Essa medida é feita utilizando um densímetro ou alcoômetro, que permite uma leitura rápida da densidade da solução.

A desvantagem desse método é a necessidade de certo volume de solução, que normalmente fica em torno de 200 ml por medida, o que inviabiliza sua utilização em amostras pequenas. Já a medida do índice de refração baseia-se na mudança do índice de refração da uma solução, à medida que a concentração do soluto aumenta. O índice de refração é definido como a relação entre a velocidade da luz atravessando um meio e a velocidade da luz no vácuo, resultando em um número adimensional e é medido em equipamentos chamados refratômetros.

Os refratômetros geralmente usam apenas algumas gotas da solução, o que permite seu uso para medidas de amostras de pequenos volumes, além de atingir o equilíbrio térmico com o equipamento rapidamente, obtendo-se medidas mais precisas. Para facilitar a medida dos teores de açúcar em frutas e bebidas, diversas escalas foram desenvolvidas, ente elas Platô, Baumé, Balling e Brix. A escala Brix foi

¹ No caso dessas indústrias, essa solução é na verdade um extrato vegetal contendo altos teores de sacarose, glicose ou frutose, além de outras substâncias naturais presentes nas plantas utilizadas, esse extrato é chamado *mosto*.

criada por Adolf Ferdinand Wenceslaus Brix é uma das mais utilizadas é definida como a quantidade em gramas de açúcar, presente numa determinada massa de solução aquosa de sacarose, ou seja, uma medida de 30°Brix indica uma solução de 30g de açúcar em 100 g de solução aquosa.

A inclinação das curvas de atenuação, bem como os valores iniciais e finais da concentração de açúcar, permite avaliar a eficiência das leveduras no processo. Diversos fatores podem avaliar essas características nas curvas de atenuação, tais como temperatura, concentração inicial de açúcar, presença de sais dissolvidos, tipos de leveduras e a presença de substâncias nocivas às mesmas.

Nesse trabalho, foram utilizadas leveduras *Saccharomyces Cerevisiae* (*r.f bayanus*) e todas as demais variáveis foram mantidas constantes, variando-se apenas a concentração de agente antimicrobiano adicionado a solução, dessa forma, pode-se avaliar a influência de possíveis degradações provocadas pela irradiação.

3.4.1.3.1 Preparação das soluções

Essa técnica baseia-se na avaliação da curva de atenuação do teor de açúcar de uma levedura *Saccharomyces Cerevisiae* (*r.f bayanus*) em uma solução aquosa de sacarose em função do tempo.

Para essa análise, foram preparadas soluções de sacarose de 100g/l em peso (10,2°Bx). Neste caso, foram pesados 130g de sacarose e dissolvidos em cerca de 1000 ml de água mineral, da marca “Da Guarda”. Em seguida adicionou-se a levedura hidratada (conforme item 3.4.1.3.2) e completaram-se os 1300 ml da solução aquosa também com água mineral. Optou-se pelo uso de água mineral, devido à exigência da presença de sais minerais para o desenvolvimento das leveduras.

Essa solução inicial foi dividida em 13 alíquotas de 100 ml cada, sendo: uma sem aditivo para controle, seis para o Triclosan (irradiado e não irradiado) e mais seis para os para o vidro dopado com Zn (irradiado e não irradiado). Para cada aditivo, as amostras foram divididas em dois grupos de três alíquotas cada. Em cada alíquota foram adicionados 2, 4 e 8 mg de cada aditivo irradiado e não irradiado, obtendo-se concentrações de 20, 40 e 60mg/l (Figura 14-II). Em seguida cada alíquota foi dividida em duas amostras para servir de prova e contraprova (Figura 14-III) e levadas à estufa a 23°C, de acordo com as indicações do fornecedor da levedura, para o início e desenvolvimento da fermentação. Um resumo das amostras preparadas é mostrado na Tabela 5.

Tabela 5 - Resumo das amostras preparadas para a análise das curvas de atenuação

Concentração (mg/l)	Triclosan			Vidro			Controle
	20	40	60	20	40	60	0
Irradiado	2 x 50 ml	2 x 50 ml	2 x 50 ml	2 x 50 ml	2 x 50 ml	2 x 50 ml	2 x 50 ml
Não irradiado	2 x 50 ml	2 x 50 ml	2 x 50 ml	2 x 50 ml	2 x 50 ml	2 x 50 ml	2 x 50 ml

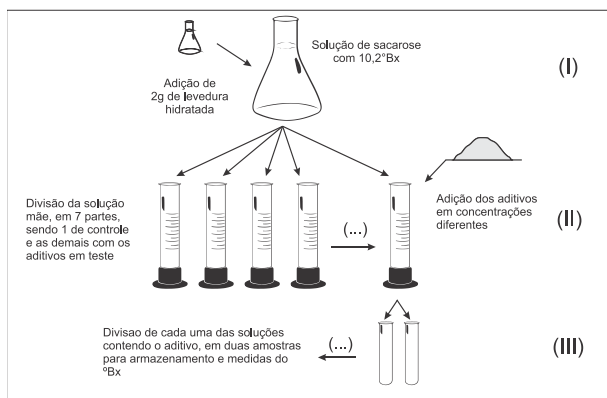


Figura 14 - Esquema de preparação das amostras para determinação das curvas de atenuação

3.4.1.3.2 Reidratação da levedura

O processo de preparação das soluções iniciou-se com a reidratação das leveduras. A recomendação do fabricante é que sejam utilizados dez volumes de água para cada volume de levedura seca. Foram preparados 600 ml para cada tipo de aditivo e, 150 ml para o controle, totalizando 1300 ml. Assim, foram utilizados 40 ml de água destilada a 35 °C para cada 4,0 g de levedura seca.

A mistura foi mantida em agitação por 10 min, em descanso por mais 10 min e novamente em agitação por 10 min. Uma vez reidratada, a levedura foi adicionada ao mosto preparado simultaneamente em procedimentos a parte, conforme Figura 14-I.

É importante ressaltar que todo o processo de hidratação e a quantidade de levedura para cada volume de água foi realizado conforme as instruções do fabricante.

3.4.1.3.3 Armazenamento e medida do grau Brix

Todas as amostras foram armazenadas em condições de

temperatura de 23°C durante todo o período de análise. O nível de açúcar foi medido utilizando um refratômetro portátil com compensação de temperatura da marca Homis, modelo 32ATC-K. As medidas foram feitas a cada doze horas totalizando 8 medidas de cada amostra (4 dias).

3.5 ANÁLISE POR FTIR DOS ADITIVOS PUROS

A espectroscopia por transformada de Fourier - FTIR é uma das técnicas mais empregadas para a identificação e análise de compostos orgânicos, pois permite identificar detalhes da sua estrutura molecular. Pequenas alterações na estrutura molecular, possivelmente provocadas por reações de degradação, podem ser detectadas, identificadas e estudadas.

Para este trabalho, foram realizadas análises por FTIR das amostras irradiadas e não irradiadas de Triclosan, de forma a identificar o nível de degradação decorrente do processo de radioesterilização.

Todos os testes foram realizados em um espectrômetro Spectrum 100N FT-IR, da marca Perkin Elmer, Inc. As amostras de pó foram misturadas a KBr em pó na proporção de 1mg/g, homogeneizadas em cum almofariz de ágata e prensadas de forma a formar pastilhas rígidas o suficiente para serem analisadas pelo equipamento.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 TESTES ANTIMICROBIANOS NOS COMPOSTOS POLIMÉRICOS ANTIMICROBIANOS

4.1.1 Difusão em ágar

Nesta seção são apresentados e discutidos os resultados dos testes de difusão em ágar, obtidos com as amostras de PA6 e PEAD aditivadas com diferentes percentuais de vidro dopado com íons Zn^{+2} e de Triclosan.

Embora a comparação entre os tamanhos dos halos formados no teste de difusão de ágar seja uma forma simplificada e rápida de se avaliar o efeito antimicrobiano dos materiais (FIORI, 2008), fatores como a temperatura e o ambiente de estocagem, dificuldade na padronização da sementeira dos microrganismos nas placas, entre outros, impede que seja feita uma análise quantitativa.

No entanto, devido à facilidade de execução destes testes, a reprodutibilidade, o baixo custo, a facilidade de interpretação e a flexibilidade de aplicação os tornam um excelente método qualitativo para a verificação da presença ou não da propriedade antimicrobiana.

4.1.1.1 Testes com o Triclosan

Da Figura 15 a Figura 24 são apresentados os resultados dos testes de difusão em ágar para o PA6 e para o PEAD aditivados com Triclosan, irradiados e não irradiados com radiação γ . As avaliações antimicrobianas foram realizadas com as bactérias do tipo *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Em ambos os casos utilizou-se percentuais de 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 e de 2,5 % em massa de triclosan nos materiais poliméricos. A diferença nas dimensões das amostras testadas deve-se a questões técnicas de processo, no entanto não são prejudiciais, pois se trata de uma análise qualitativa.

Da Figura 15 à Figura 19, verifica-se o efeito antimicrobiano elevado do Triclosan nos testes de difusão em ágar, tanto para a bactéria *Escherichia coli* quanto para a bactéria *Staphylococcus aureus*, mesmo para os percentuais relativamente baixos do aditivo. Esse comportamento já é esperado por se tratar de um composto

antimicrobiano de uso comercial e tido como de elevado desempenho antimicrobiano (SCHWEIZER, 2001) (JONES, JAMPANI, *et al.*, 2000).

Como descrito na literatura, o efeito é bactericida e mostra-se maior contra bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) do que contra gram-negativas (*Escherichia coli*) (TORTORA, FUNKE e CASE, 2012).

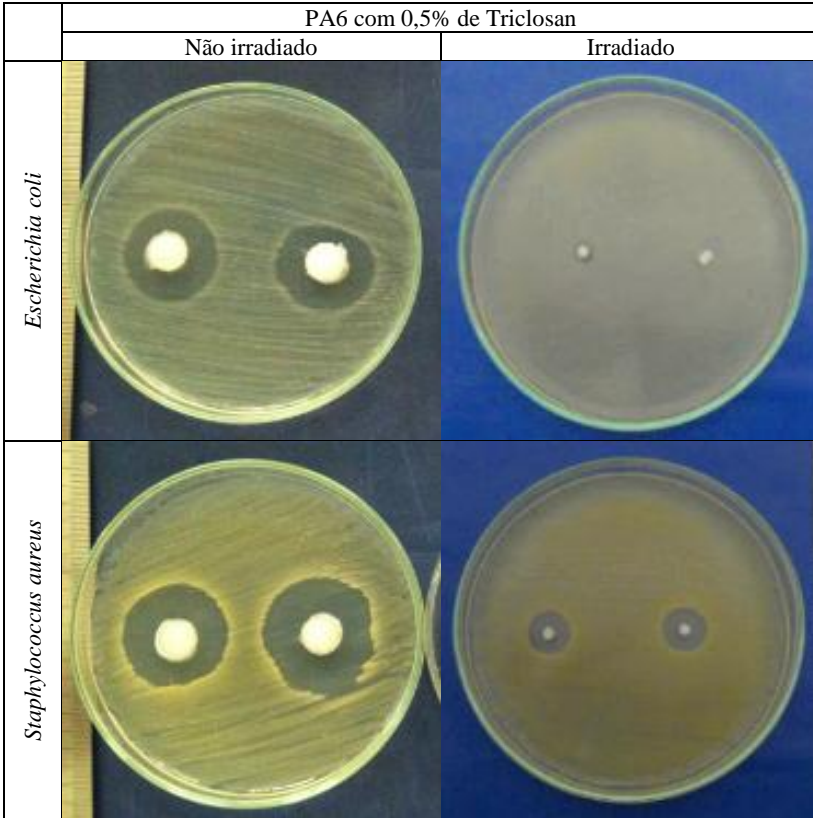


Figura 15 - Difusão em ágar do composto PA6/Triclosan com 0,5% de aditivo frente à *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, não irradiado e irradiado.

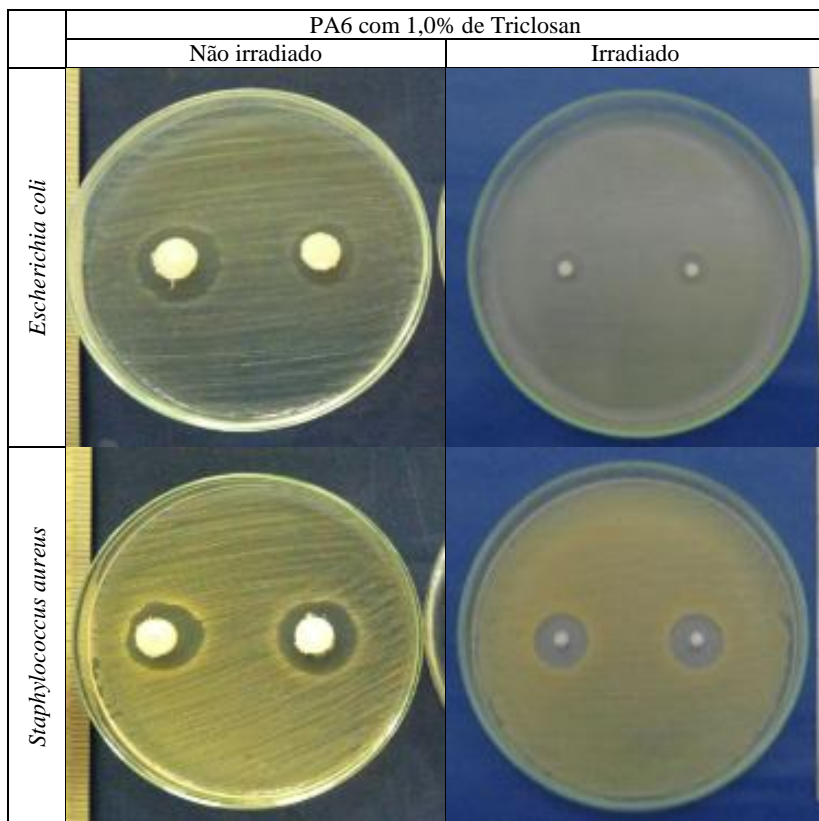


Figura 16 - Difusão em ágar do composto PA6/Triclosan com 1,0% de aditivo frente à *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, não irradiado e irradiado.

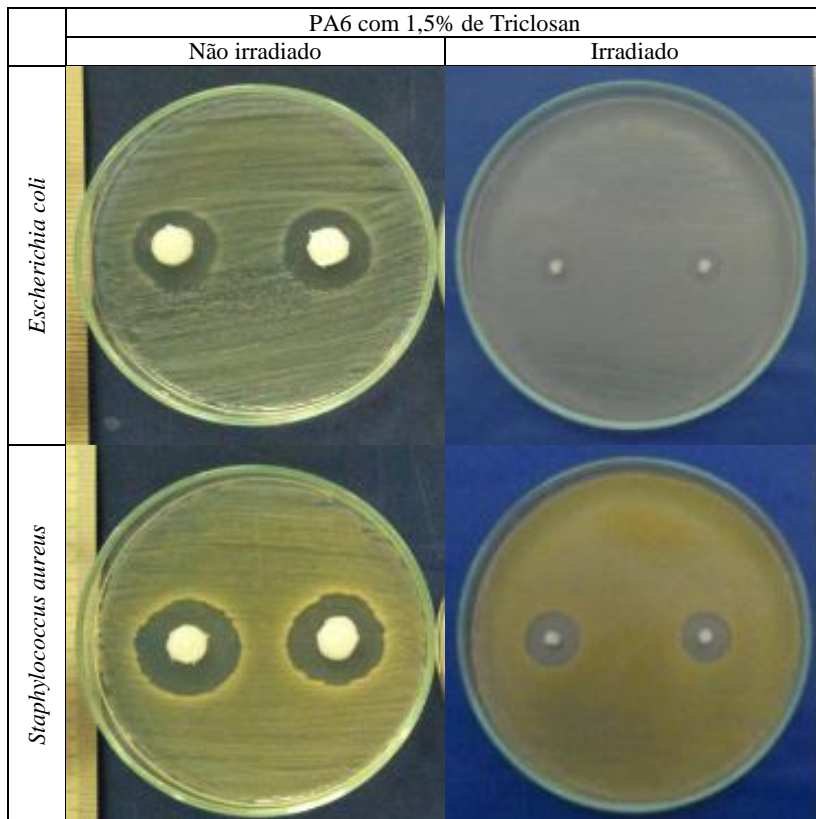


Figura 17 - Difusão em ágar do composto PA6/Triclosan com 1,5% de aditivo frente à *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, não irradiado e irradiado.

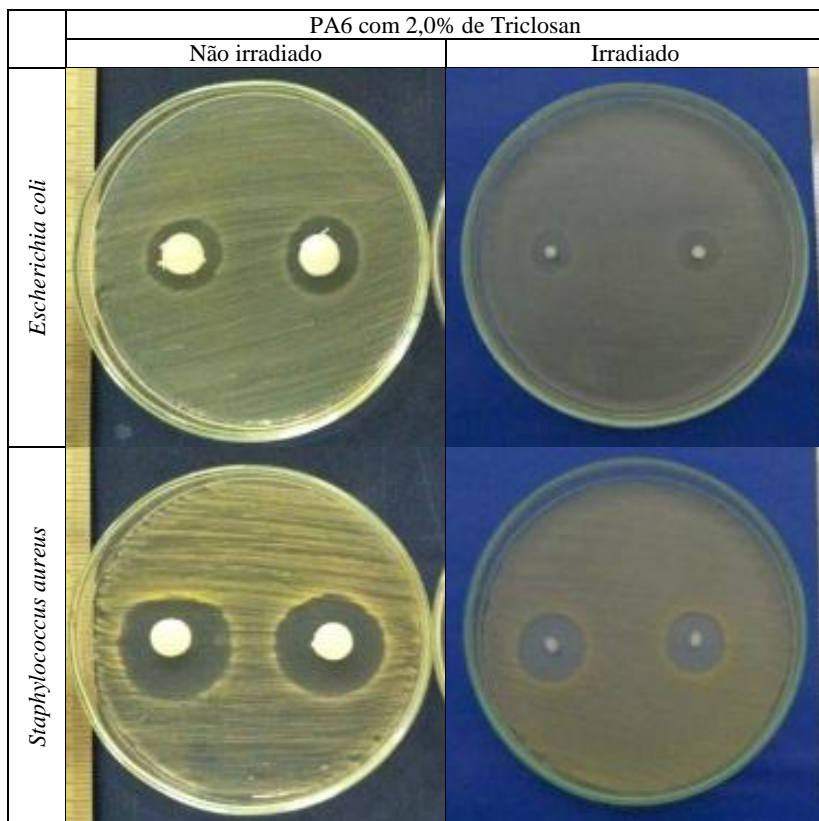


Figura 18 - Difusão em ágar do composto PA6/Triclosan com 2,0% de aditivo frente à *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, não irradiado e irradiado.

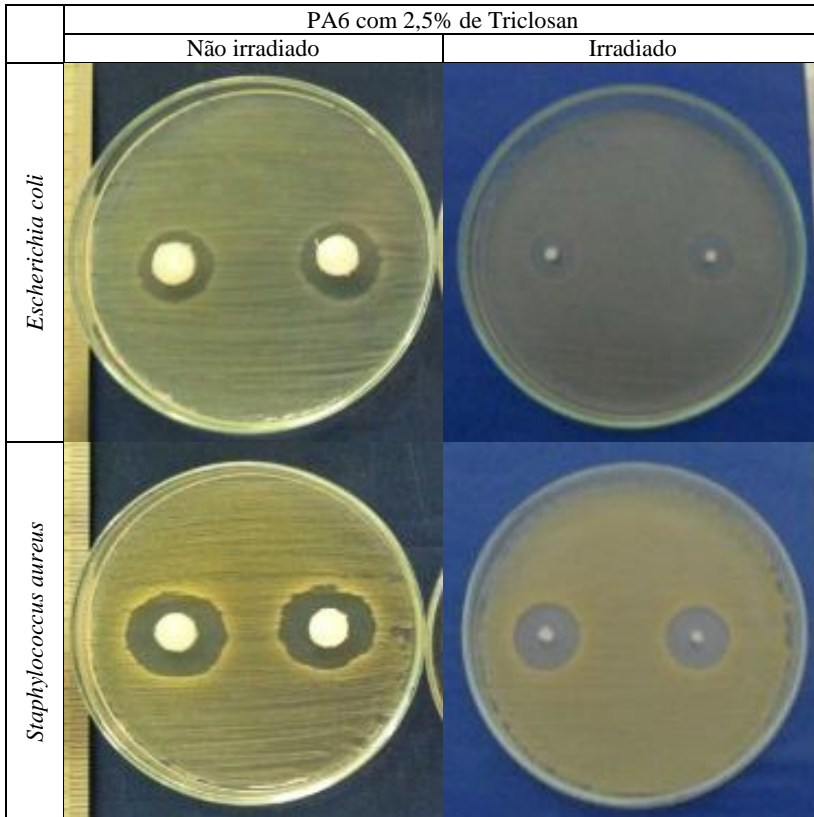


Figura 19 - Difusão em ágar do composto PA6/Triclosan com 2,5% de aditivo frente à *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, não irradiado e irradiado.

Embora ainda seja possível dimensionar o efeito antimicrobiano, é possível verificar que mesmo após o processo de irradiação o efeito antimicrobiano permanece presente.

Similar às amostras de PA6/Triclosan, o efeito antimicrobiano para as amostras de PEAD aditivado com Triclosan é comprovado com os resultados apresentados da Figura 20 à Figura 24. Da mesma forma, o efeito antimicrobiano mostrou-se maior para as bactérias do tipo *Staphylococcus aureus* do que para as do tipo *Escherichia coli*, comprovando que a irradiação não elimina o efeito antimicrobiano.

A grande diferença é observada quando se compara o tamanho dos halos inibitórios obtidos para o PEAD e para o PA6. Observa-se a formação halos maiores para as amostras de PEAD do que para as

amostras de PA6.

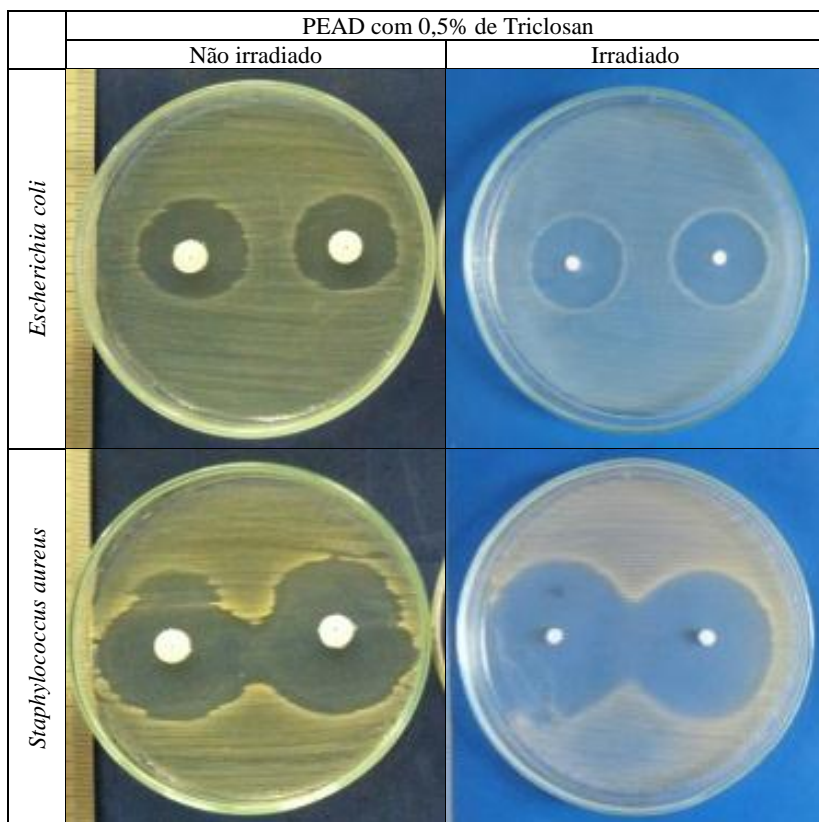


Figura 20 - Difusão em ágar do composto PEAD/Triclosan com 0,5% de aditivo frente à *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, não irradiado e irradiado.

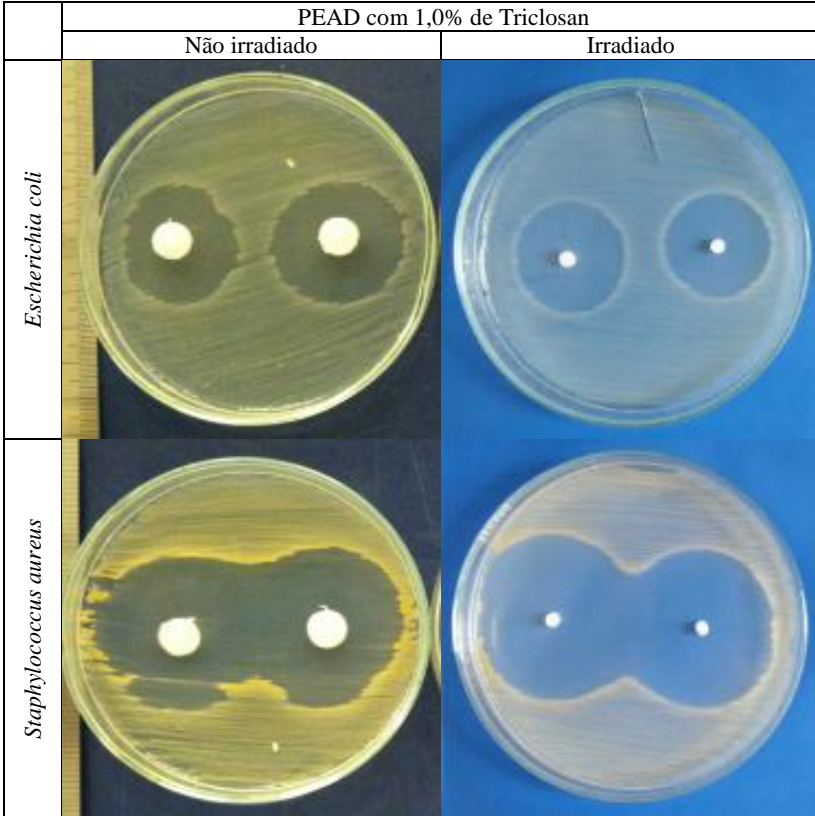


Figura 21 - Difusão em ágar do composto PEAD/Triclosan com 1,0% de aditivo frente à *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, não irradiado e irradiado

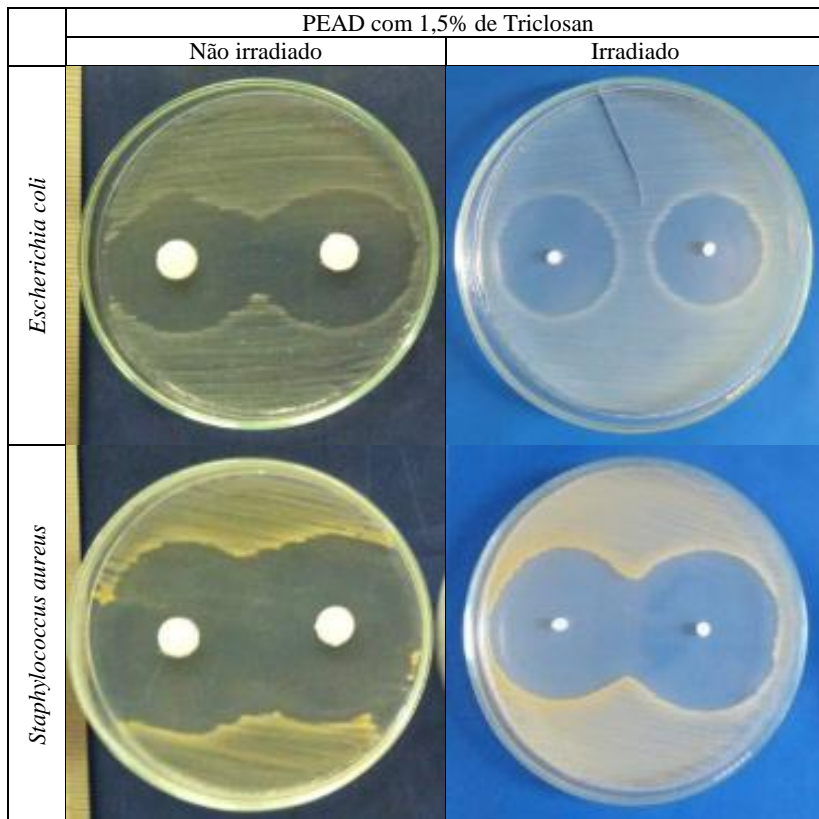


Figura 22 - Difusão em ágar do composto PEAD/Triclosan com 1,5% de aditivo frente à *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, não irradiado e irradiado

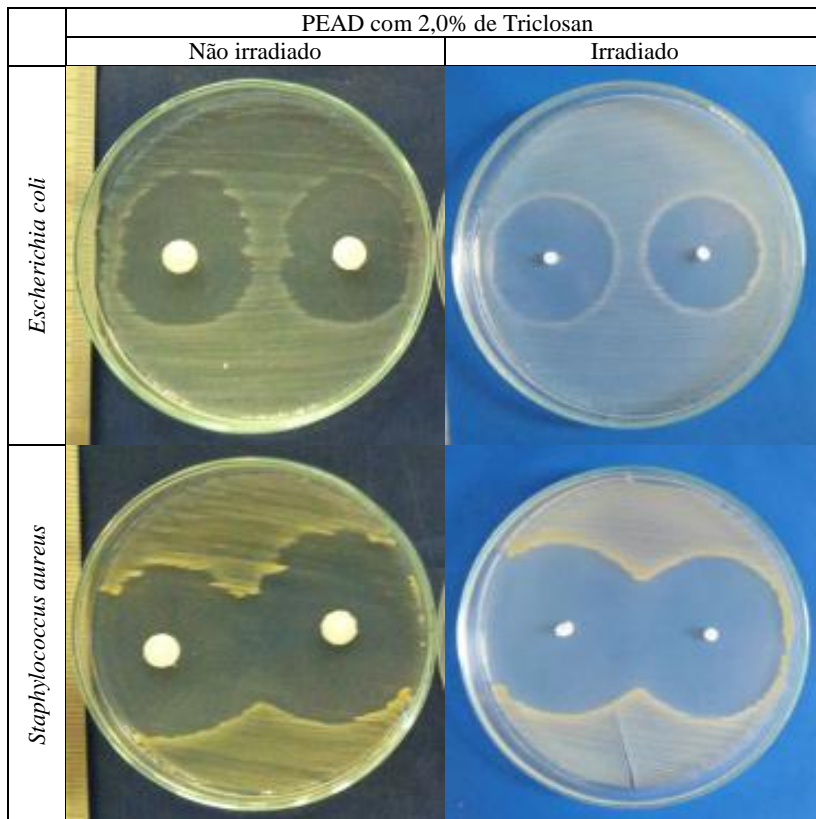


Figura 23 - Difusão em ágar do composto PEAD/Triclosan com 2,0% de aditivo frente à *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, não irradiado e irradiado

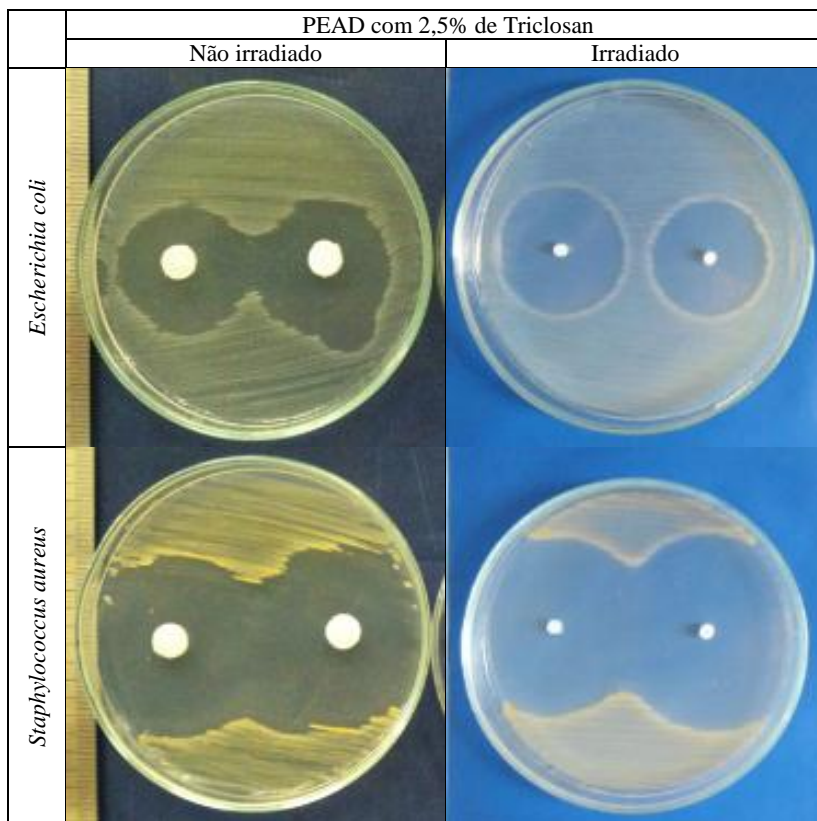


Figura 24 - Difusão em ágar do composto PEAD/Triclosan com 2,5% de aditivo frente à *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, não irradiado e irradiado

Na Figura 25 é apresentada em destaque a comparação entre as amostras de PA6 e de PEAD aditivadas com 1,0 % de Triclosan. É possível verificar uma diferença significativa no efeito antimicrobiano quando se compara os dois polímeros aditivados com o mesmo percentual de aditivo.

Essa diferença pode ser associada a alguns mecanismos de difusão e migração nos polímeros (PAOLI, 2008). Durante o processamento, devido às elevadas temperaturas de processamento, o aditivo se solubiliza na matriz polimérica e o processo promove sua dispersão completa. No entanto, após o resfriamento, a mobilidade do aditivo diminui. Caso o aditivo seja compatível com o polímero, permanecerá solubilizado na matriz, tanto na região amorfa quanto na

cristalina (embora em menor quantidade), com mobilidade suficiente para migrar até a superfície e compensar a variação no gradiente de concentração devido a sua perda para o meio. Caso a compatibilidade entre a matriz e o polímero não seja boa, o aditivo é expulso das regiões cristalinas, se concentrando nas regiões amorfas. Dessa forma, no caso de polímeros cristalinos, os cristalitos funcionam como obstáculos para os movimentos por difusão das moléculas do aditivo. Além disso, uma menor compatibilidade reduz a mobilidade molecular, dificultando a difusão do composto até a superfície da amostra (PAOLI, 2008) (FERNANDES, GARCIA e PADULA, 1987).

Como já citado, a radiação provoca alterações nas estruturas químicas dos polímeros, provocando tanto quebra das cadeias poliméricas quanto a formação de ligações cruzadas, dependendo do polímero. Portanto, é de se esperar que a radiação provoque alterações nos pesos moleculares dos polímeros e conseqüentemente alterações na permeabilidade e difusibilidade dos mesmos. No entanto, segundo Han (HAN, 2007), esse fenômeno provoca alterações principalmente na resistência mecânica dos polímeros, mas não altera significativamente a permeabilidade em filmes de PEAD e poliamidas.

No caso do Triclosan, os dois fenômenos ocorreram. O Triclosan é um composto apolar, com baixa solubilidade em água, mas solúvel em solventes orgânicos. Por isso, apresenta boa afinidade com o PEAD que também apresenta uma cadeia polimérica apolar (MAIA, 2013), ou seja, sua mobilidade é maior e logo gera maiores halos inibitórios nos testes de difusão em ágar (TOLINSKI, 2009).

Por sua vez, a matriz polimérica de PA6 é polar e a mobilidade das moléculas do Triclosan é reduzida (TOLINSKI, 2009), e conseqüentemente ocorre a geração de menores halos inibitórios.

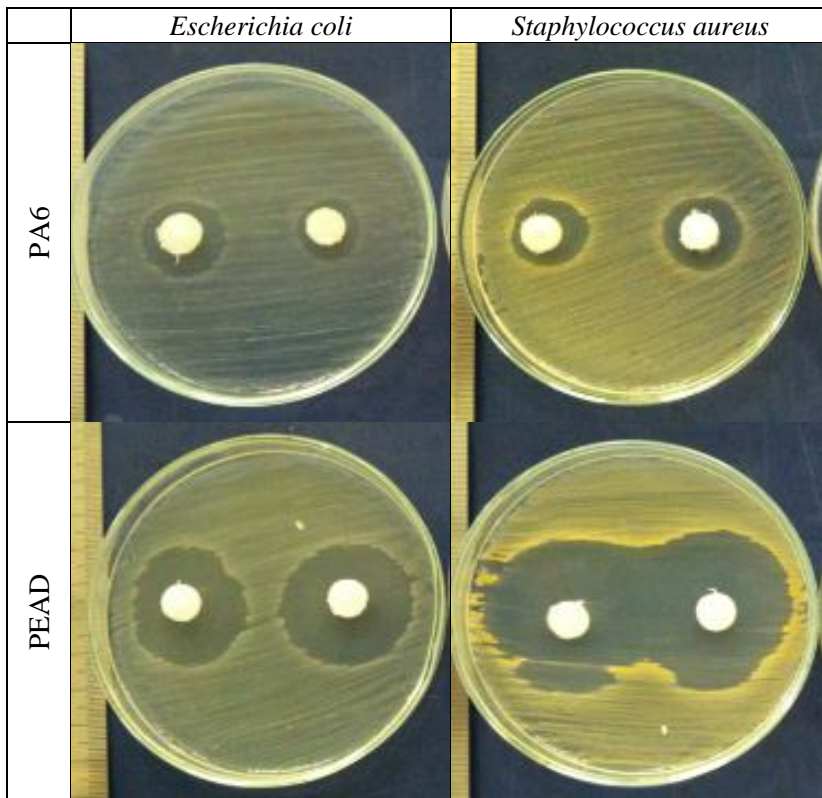


Figura 25 - Comparação entre os halos inibitórios de amostras de PEAD e PA6 aditivadas com 1,0% de Triclosan, não irradiadas.

4.1.1.2 Testes com os polímeros aditivados com o Vidro dopado com Zn^{+2}

Assim como nas amostras aditivadas com o Triclosan, foram realizados testes de difusão em ágar dos polímeros aditivados com o vidro dopado com Zn^{+2} . Da mesma forma, as amostras poliméricas continham percentuais de 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 e de 2,5 % em massa do aditivo e as bactérias testadas também foram do tipo *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Da Figura 26 a Figura 30, são apresentados os resultados microbiológicos para as amostras de PA6 aditivadas com o vidro dopado com Zn^{+2} . Conforme demonstrado pelos resultados o efeito antimicrobiano do PEAD aditivado não forma halos evidentes, sendo

visualmente identificado em algumas amostras.

Trabalhos científicos têm tratado de compostos com PEBD e PEBDL aditivados com o vidro dopado com Zn^{+2} e considerado que as espécies iônicas de zinco não são eliminadas pela matriz polimérica em quantidades expressivas. Assim, não forma o halo de inibição das colônias de bactérias devido à ausência destas espécies no meio de cultura celular. Fiori et al. (2014) exploraram os resultados de estudos de migração e demonstraram que quantidades inferiores a 2 ppm são liberadas do PEBD após 19 dias de imersão em meio aquoso. Porém, mesmo sem a liberação apresentam o efeito antimicrobiano, mas com magnitude muito inferior ao Triclosan (SANTOS, MACHADO, *et al.*, 2014).

Da mesma forma que nos testes anteriores, o efeito da radiação não se mostrou significativo.

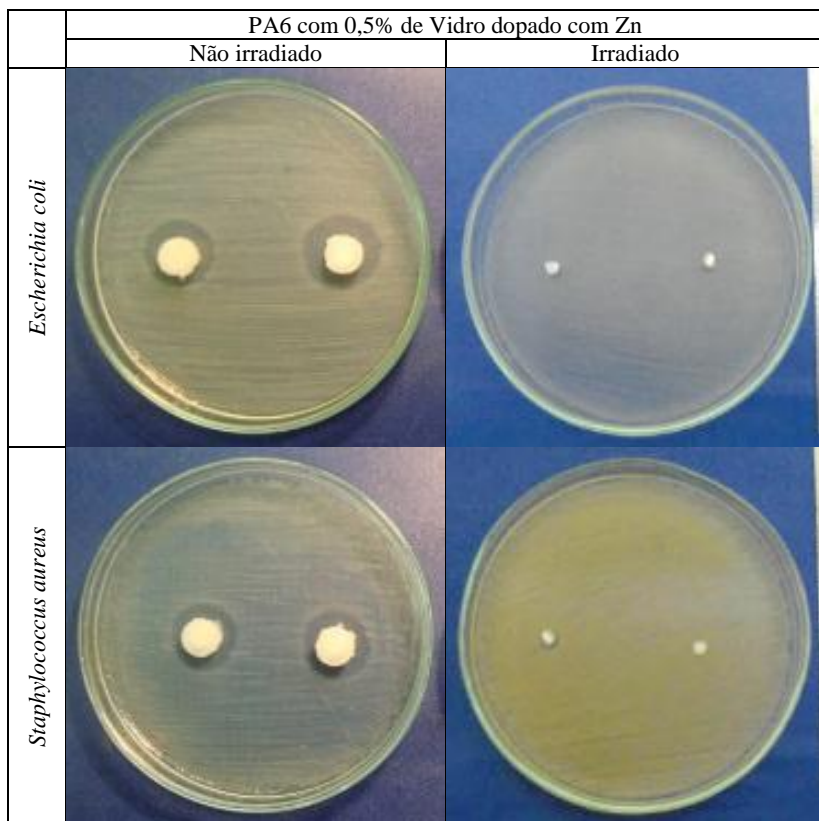


Figura 26 - Difusão em ágar do composto PA6/Vidro dopado com Zn com 0,5% de aditivo frente à *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, não irradiado e irradiado

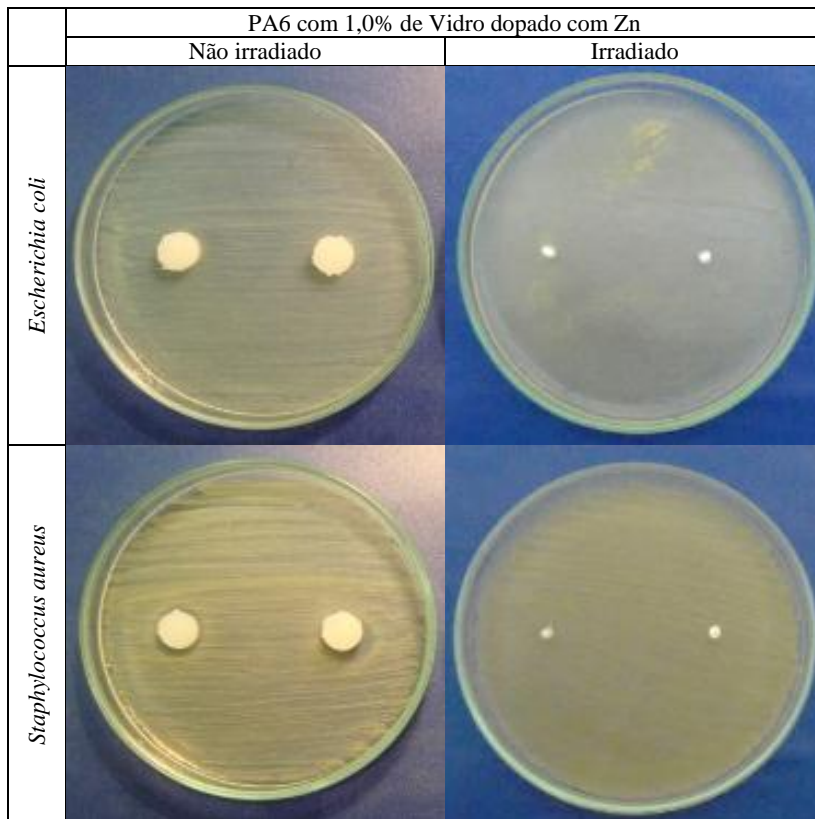


Figura 27 - Difusão em ágar do composto PA6/Vidro dopado com Zn com 1,0% de aditivo frente à *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, não irradiado e irradiado

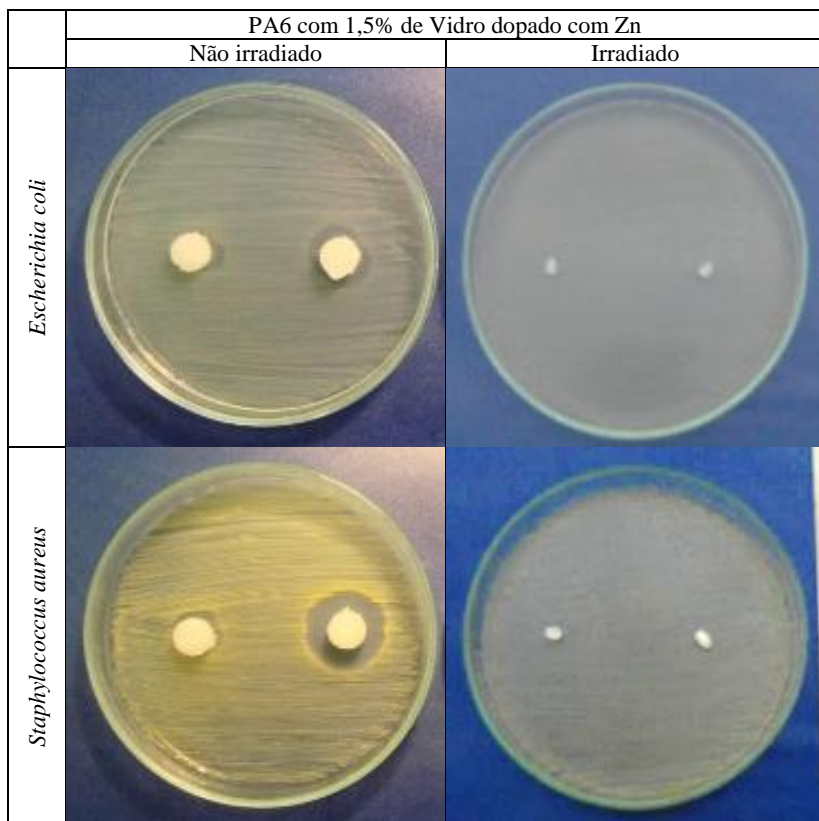


Figura 28 - Difusão em ágar do composto PA6/Vidro dopado com Zn com 1,5% de aditivo frente à *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, não irradiado e irradiado

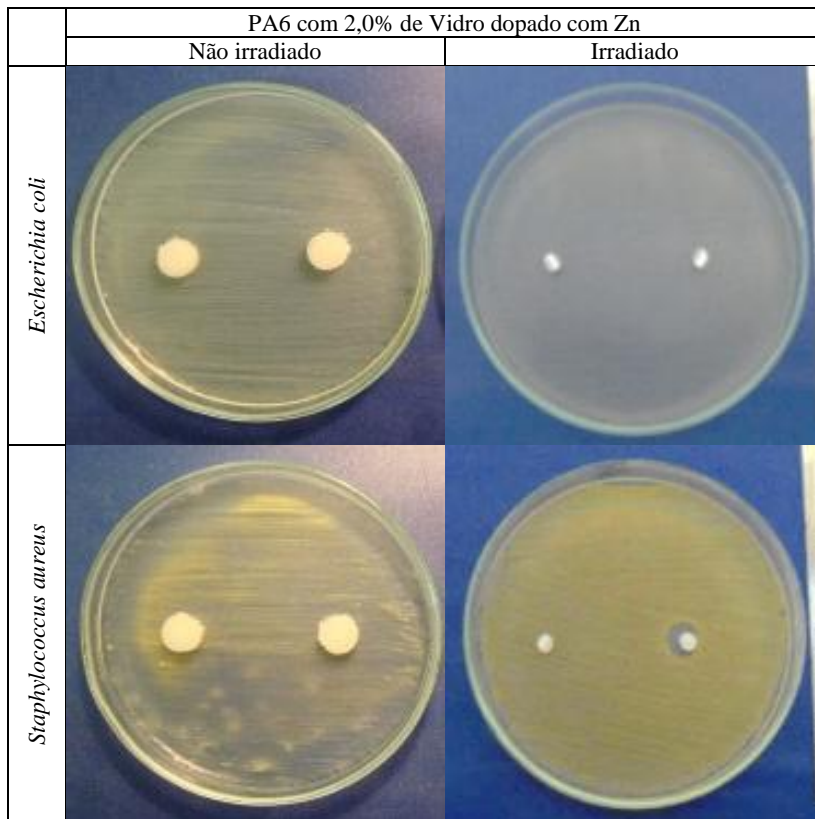


Figura 29 - Difusão em ágar do composto PA6/Vidro dopado com Zn com 2,0% de aditivo frente à *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, não irradiado e irradiado

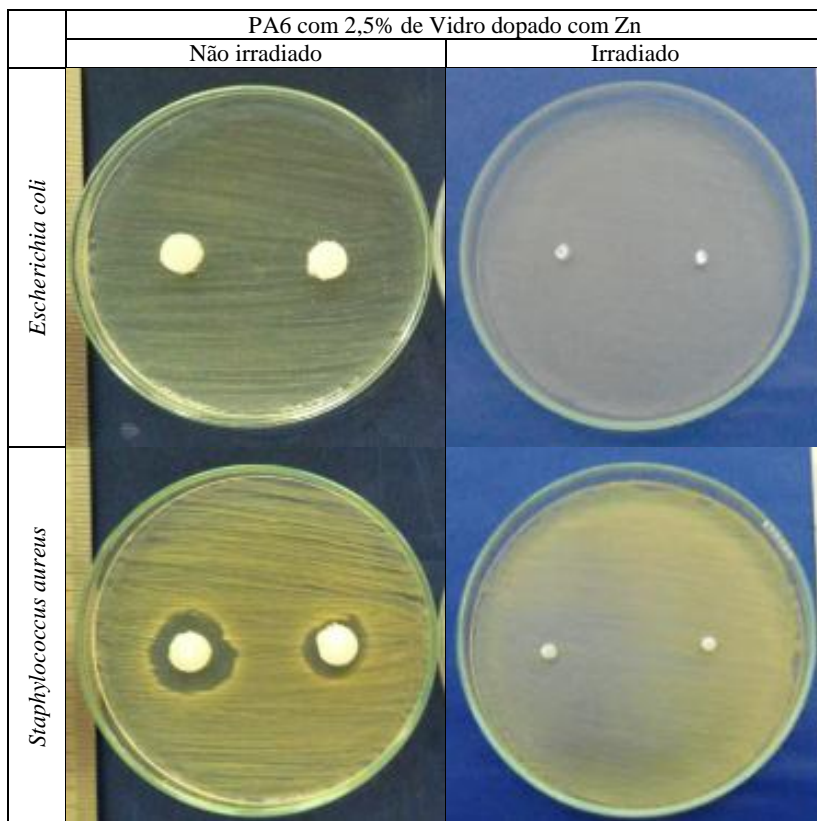


Figura 30 - Difusão em ágar do composto PA6/Vidro dopado com Zn com 2,5% de aditivo frente à *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, não irradiado e irradiado

Assim como nos testes de difusão em ágar com as amostras de PA6, os testes com o PEAD aditivados com o vidro dopado com íons de zinco também não apresentaram halos expressivos, manifestando assim um comportamento similar, (Figura 31 à Figura 35).

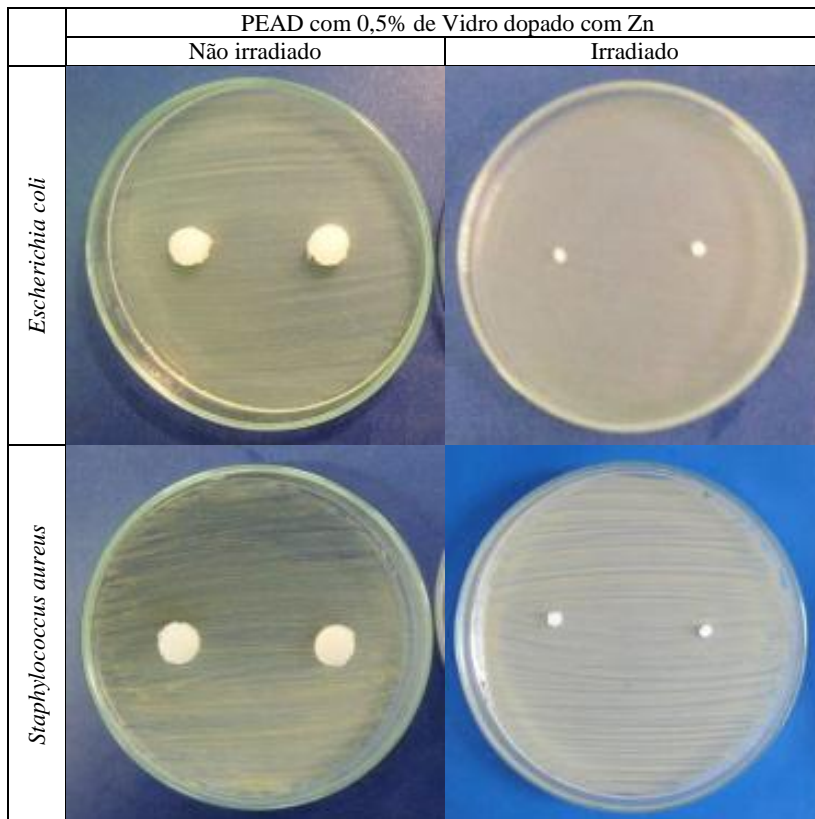


Figura 31 - Difusão em ágar do composto PEAD/Vidro dopado com Zn com 0,5% de aditivo frente à *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, não irradiado e irradiado

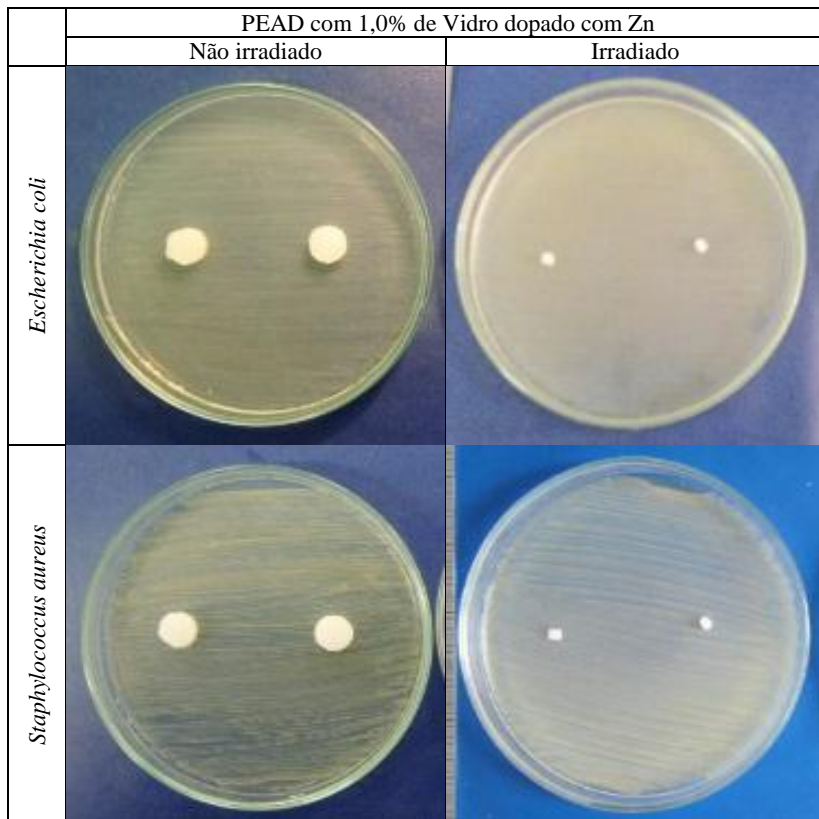


Figura 32 - Difusão em ágar do composto PEAD/Vidro dopado com Zn com 1,0% de aditivo frente à *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, não irradiado e irradiado

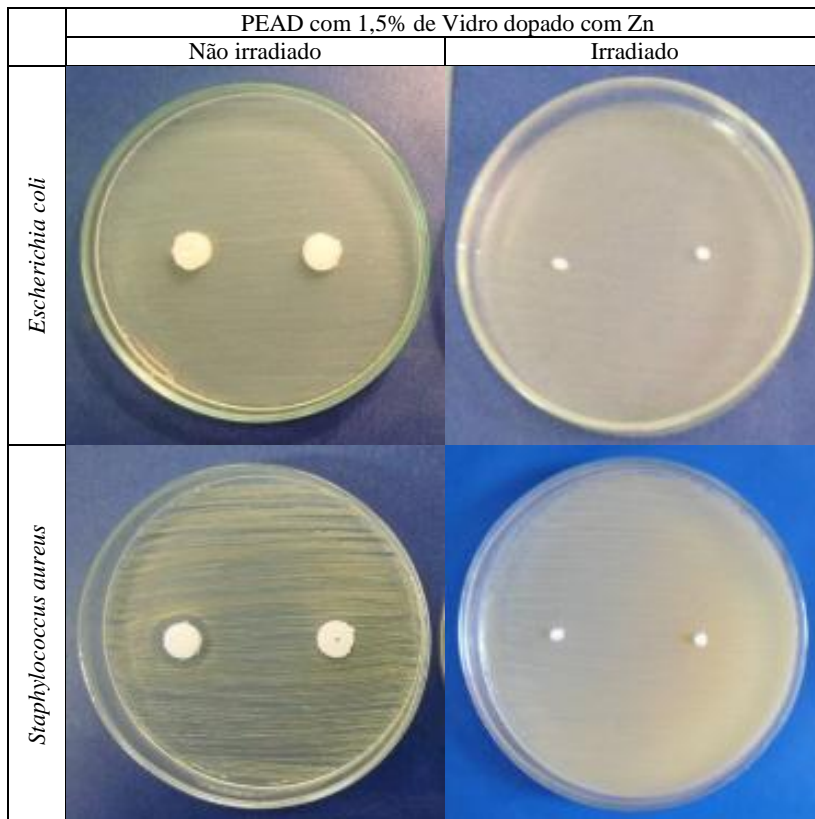


Figura 33 - Difusão em ágar do composto PEAD/Vidro dopado com Zn com 1,5% de aditivo frente à *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, não irradiado e irradiado

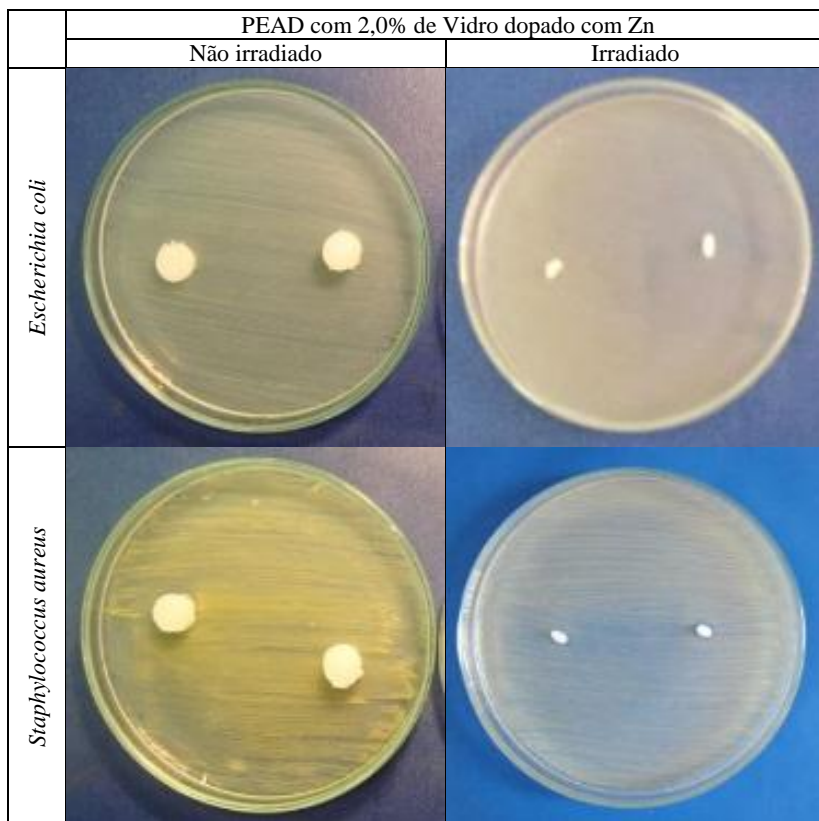


Figura 34 - Difusão em ágar do composto PEAD/Vidro dopado com Zn com 2,0% de aditivo frente à *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, não irradiado e irradiado

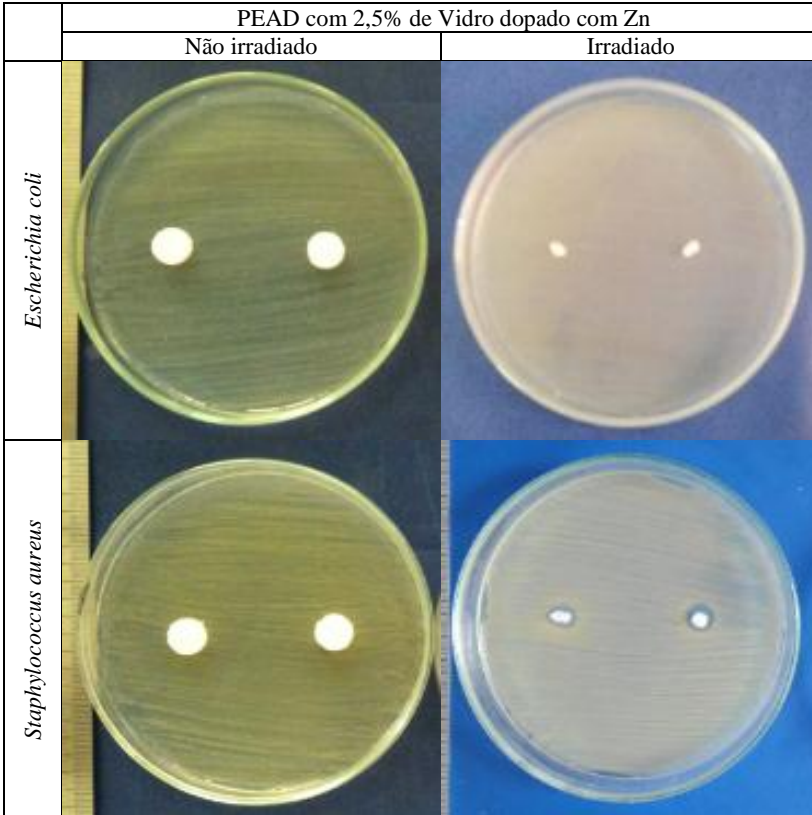


Figura 35 - Difusão em ágar do composto PEAD/Vidro dopado com Zn com 2,5% de aditivo frente à *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, não irradiado e irradiado

4.1.2 Testes de Concentração Inibitória Mínima - CIM

4.1.2.1 Compostos aditivados com vidro dopado com Zn⁺²

Da

Figura 36 até a Figura 43 são apresentados os resultados microbiológicos de Concentração Inibitória Mínima para as amostras de PA6 e de PEAD, aditivadas com o vidro dopado de zinco iônico e com diferentes percentuais. Em todos os resultados são comparados os compostos sem a irradiação e com a irradiação por radiação γ . Os resultados são expressos em absorbância da radiação visível no pico

correspondente a 640nm. Essa medida é feita medindo-se a turbidez da solução, que é ocasionada pela presença de células bacterianas na solução, que provocam uma dispersão na luz transmitida através da amostra, reduzindo a intensidade do sinal detectado pelo equipamento. Em condições ideais de desenvolvimento, as bactérias se reproduzem aumentando o número dessas células provocando um aumento na turbidez da amostra, ou seja, aumentando a absorção da luz transmitida.

Os dados mostrados na

Figura 36 correspondem a absorbância dos testes de CIM para o PA6 aditivado com o vidro dopado de zinco não irradiado. Foram realizadas medidas de absorbância após 4, 8 e 24 horas de imersão do composto no meio de cultura.

Em todos os ensaios realizados não foi observado uma ação antimicrobiana significativa, conforme a comparação da curva de controle com as demais curvas do composto aditivado.

Conforme Fiori et. al. este comportamento já é esperado, pois como não ocorre a liberação das espécies iônicas de zinco em percentuais significativos para o meio de cultura líquido, não é observada a inibição das colônias bacterianas. Como consequência observa-se a multiplicação celular seguido do aumento da intensidade da absorbância (SANTOS, MACHADO, *et al.*, 2014).

Na Figura 37 são apresentadas as curvas para os testes com os mesmos compostos, porém, irradiados com radiação γ . Embora na comparação visual das curvas percebe-se uma diferença nos valores de absorbância, a incerteza da técnica não permite afirmar que ocorre uma diferença significativa no comportamento antimicrobiano, tanto em relação às concentrações testadas quanto no efeito da irradiação sobre os compostos.

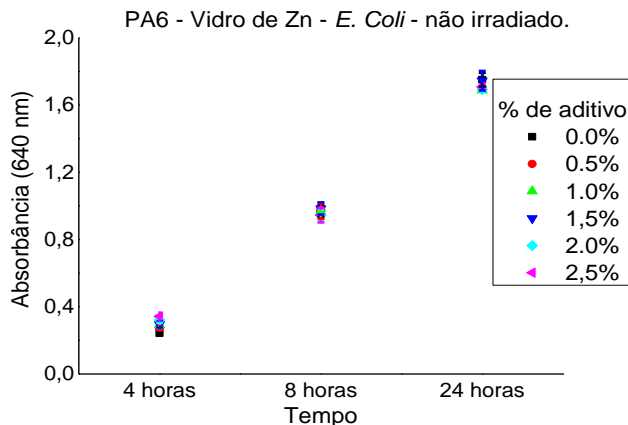


Figura 36 - Resultados microbiológicos de CIM para o PA6 aditivado com o vidro dopado com Zn^{+2} e não irradiado com bactérias *Escherichia coli*.

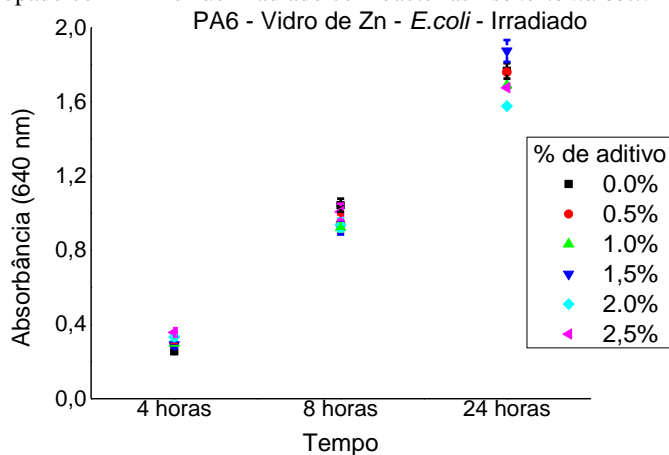


Figura 37 - Resultados microbiológicos de CIM para o PA6 aditivado com o vidro dopado com Zn^{+2} irradiado com bactérias *Escherichia coli*

Na **Erro! Fonte de referência não encontrada.** são apresentados os resultados dos testes de CIM realizados para o mesmo composto de PA6 aditivado com o vidro dopado com Zn^{+2} com as bactérias do tipo *Staphylococcus aureus*. Os resultados são similares aos obtidos com PA6 frente à *Escherichia coli* não é percebido um efeito bactericida expressivo em função do percentual e do tempo de imersão. Da mesma forma, o processo de irradiação das amostras não causou mudanças significativas nas características antimicrobianas do PEAD aditivado

com o aditivo vítreo (Figura 39).

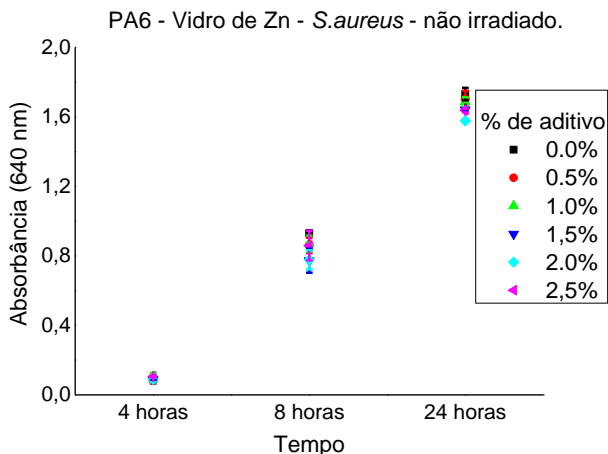


Figura 38 - Resultados microbiológicos de CIM para o PA6, aditivado com o vidro dopado com Zn^{+2} não irradiado com bactérias *Staphylococcus aureus*.

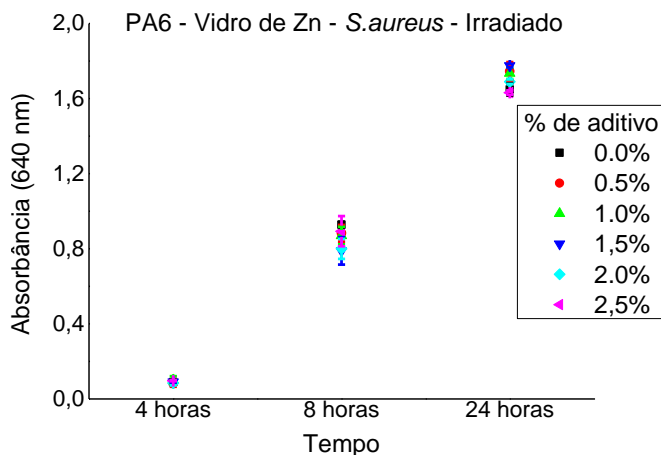


Figura 39 - Resultados microbiológicos de CIM para o PA6, aditivado com o vidro dopado com Zn^{+2} irradiado com bactérias *Staphylococcus aureus*.

Na Figura 40 são apresentados os resultados microbiológicos de CIM para o PEAD aditivado com o vidro dopado com Zn^{+2} não irradiados e com a bactéria *Escherichia coli*. Os resultados não demonstraram mudanças significativas no comportamento antimicrobiano. Da mesma forma, quando analisados os resultados das

amostras irradiadas, Figura 41, o comportamento é similar.

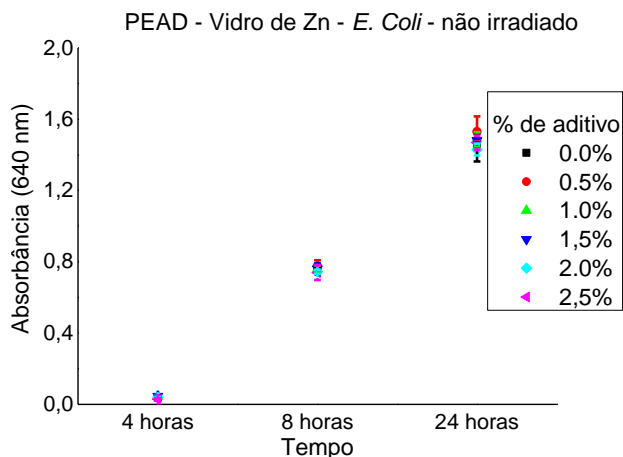


Figura 40 - Resultados microbiológicos de CIM para o PEAD aditivado com o vidro dopado com Zn^{+2} , não irradiado, com bactérias *Escherichia coli*.

Resultados semelhantes são apresentados pelos testes de CIM com as bactérias *Staphylococcus aureus*. Tanto nos resultados apresentados na Figura 43 para as amostras não irradiadas, quanto nos resultados apresentados na Figura 44 o efeito da concentração do aditivo antimicrobiano não é significativo no comportamento antimicrobiano.

Os resultados microbiológicos demonstraram que o efeito da radiação γ sobre o comportamento antimicrobiano dos compostos poliméricos aditivados com o material vítreo não é significativo. Seu comportamento microbiológico não apresenta variações significativas, o que indica que a radiação γ não promove degradações significativas no princípio ativo.

Vale ressaltar que embora os resultados dos testes com os polímeros aditivados com vidro dopado com Zn^{+2} tenham demonstrado um efeito antimicrobiano muito baixo, o efeito existe e já é comprovado nas concentrações testadas por Fiori et al. (SANTOS, MACHADO, *et al.*, 2014).

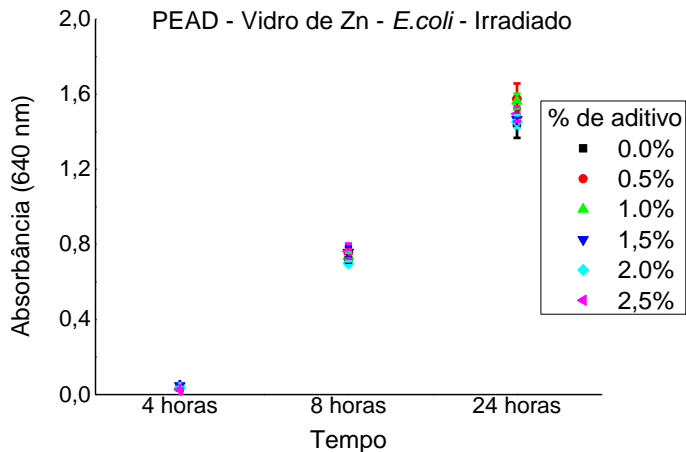


Figura 41 - Resultados microbiológicos de CIM para o PEAD, aditivado com o vidro dopado com Zn^{+2} e irradiado, com bactérias *Escherichia coli*.

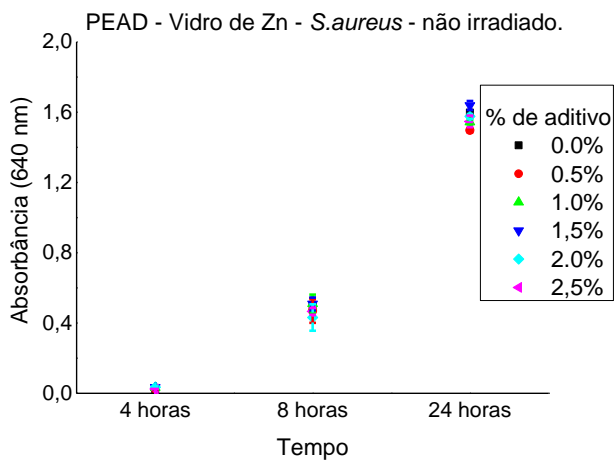


Figura 42 - Resultados microbiológicos de CIM para o PEAD, aditivado com o vidro dopado com Zn^{+2} e não irradiado com bactérias *Staphylococcus aureus*

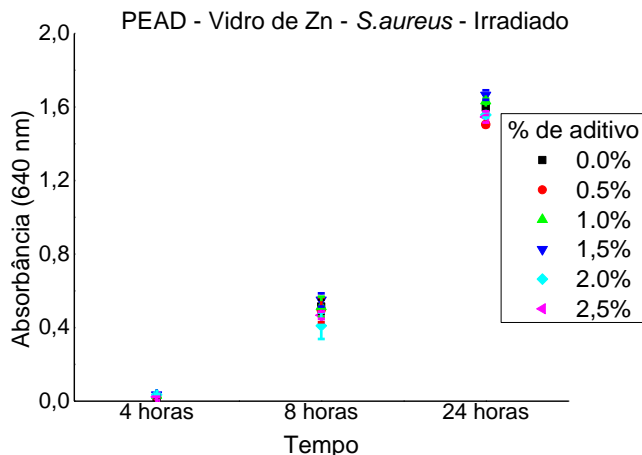


Figura 43 - Resultados microbiológicos de CIM para o PEAD, aditivado com o vidro dopado com Zn e irradiado, com bactérias *Staphylococcus aureus*.

4.1.2.2 Compostos aditivados com Triclosan

Assim como nos experimentos com vidro dopado com zinco iônico, foram realizados testes de CIM com as amostras poliméricas aditivadas com Triclosan, irradiadas e não irradiadas com radiação γ , com as bactérias do tipo *Escherichia coli*. e *Staphylococcus aureus*.

Os resultados microbiológicos mostrados da Figura 44 até a Figura 52 relacionam o efeito antimicrobiano dos polímeros aditivados com os diferentes percentuais de Triclosan e compara o efeito da radiação γ na propriedade avaliada por CIM.

Em todos os testes os resultados de CIM para o PA6 e para o PEAD, irradiado ou não irradiado e aditivado com Triclosan, indicam um efeito antimicrobiano elevado do Triclosan para todos os percentuais empregados nos polímeros.

Fica evidente que no meio de cultura bacteriana, sem a presença de material polimérico aditivado, ocorre o aumento do número de células bacterianas no período de 24 h.

A Figura 44 e a Figura 45 mostram os resultados de CIM para o PA6, não irradiados e irradiados respectivamente, e contendo diferentes percentuais de Triclosan e imersos em meio de cultura contendo *Escherichia coli*. Percebe-se que a partir do percentual de 1,0 % de Triclosan, o composto apresenta máximo efeito e não há variação significativa da absorbância, indicando que esse percentual é o valor mais adequado em PA6 para a utilização em processos de esterilização

frente à bactéria *Escherichia coli*.

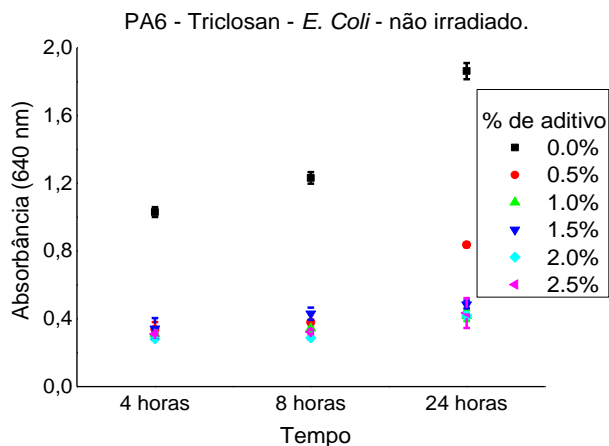


Figura 44 - Resultados microbiológicos de CIM para o PA6 aditivado com o Triclosan não irradiado com bactérias *Escherichia coli*.

Da mesma forma, quando comparados os resultados dos compostos aditivados antes e após a irradiação os efeitos são praticamente os mesmos, evidenciando que a radiação γ não promove alterações significativas nas propriedades bactericidas dos compostos.

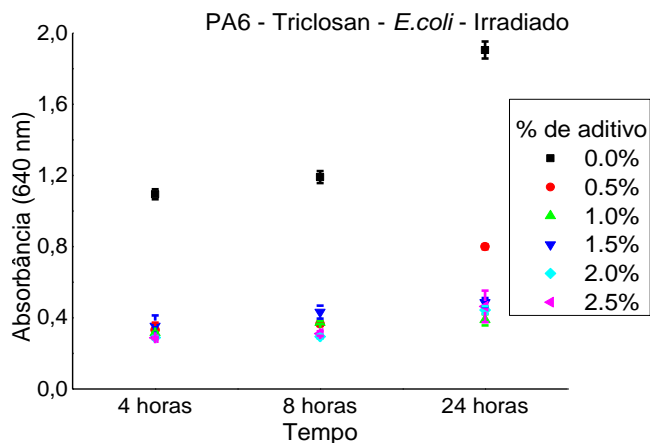


Figura 45 - Resultados microbiológicos de CIM para o PA6 aditivado com o Triclosan irradiado com bactérias *Escherichia coli*.

Quando testados com as bactérias *Staphylococcus aureus*, os compostos de PA6 aditivados com Triclosan também mostraram grande efeito bactericida, Figura 46, mas menos pronunciado que nos testes com as bactérias *Escherichia coli*, além de demonstrar uma tendência do aumento da eficiência no efeito antimicrobiano com o aumento da concentração do aditivo.

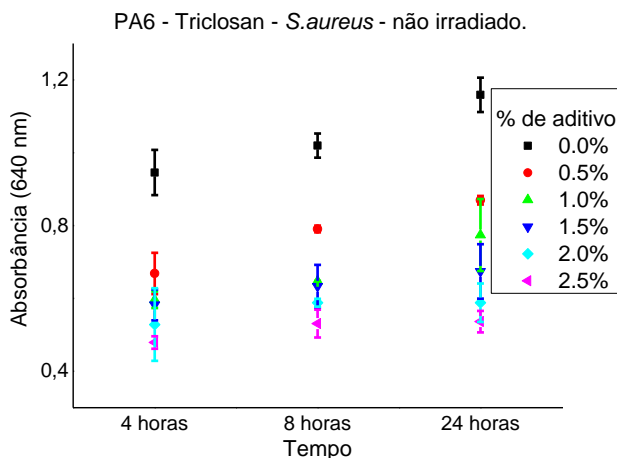


Figura 46 - Resultados microbiológicos de CIM para o PA6 aditivado com o Triclosan não irradiado com bactérias *Staphylococcus aureus*.

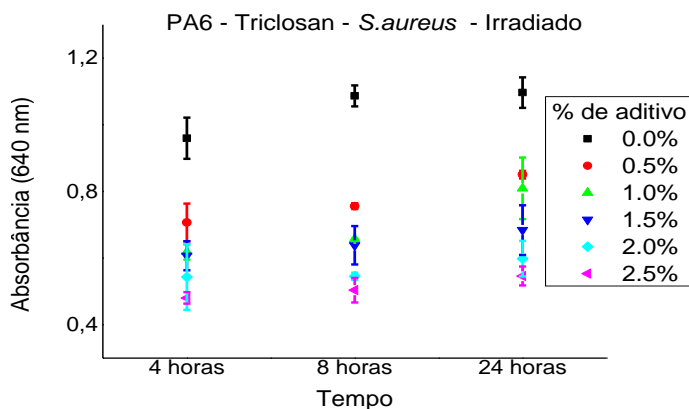


Figura 47 - Resultados microbiológicos de CIM para o PA6 aditivado com o Triclosan irradiado com bactérias *Staphylococcus aureus*.

Da mesma forma, a radiação γ não alterou as características bactericidas dos compostos poliméricos aditivados com Triclosan, uma vez que o comportamento antimicrobiano apresentado pelas amostras irradiadas é similar aos apresentados pelas as amostras não irradiadas, Figura 47.

Nos testes de CIM aplicados aos compostos de PEAD aditivados com Triclosan, o efeito bactericida foi muito elevado e dispensou as medidas de absorbância após 12 h de ensaio.

Na Figura 48 e Figura 49, fica evidente o efeito antimicrobiano pronunciado para as bactérias *Escherichia coli* tanto para as amostras irradiadas quanto para as amostras não irradiadas com radiação γ .

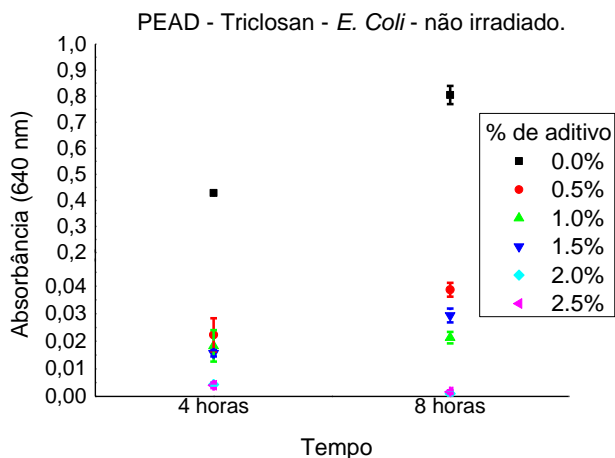


Figura 48 - Resultados de CIM para o PEAD aditivado com o Triclosan e não irradiado com bactérias *Escherichia coli*

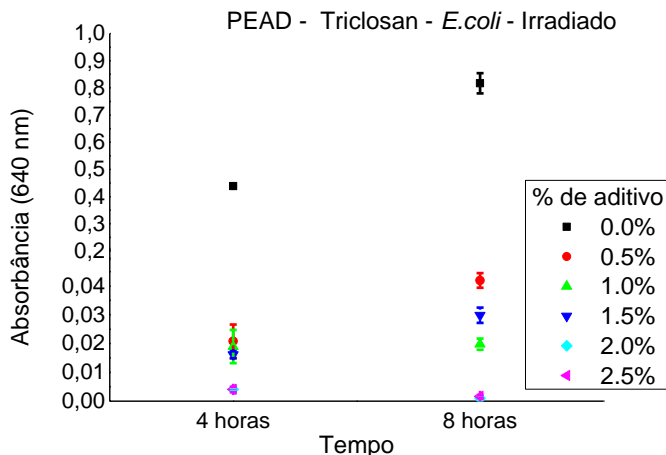


Figura 49 - CIM para o PEAD, aditivado com o Triclosan e irradiado com bactérias *Escherichia coli*.

De forma semelhante aos resultados dos testes de CIM para o PA6, verifica-se uma taxa de morte menor para as bactérias *Staphylococcus aureus*, Figura 50, porém ainda com elevado efeito antimicrobiano. É possível constatar que com o aumento do percentual de Triclosan ocorre um aumento na ação bactericida do composto. De qualquer forma, mesmo com o menor percentual (0,5%) o efeito bactericida é bastante pronunciado.

Figura 50 - CIM para o PEAD, aditivado com o Triclosan com bactérias *Staphylococcus aureus*, não irradiado

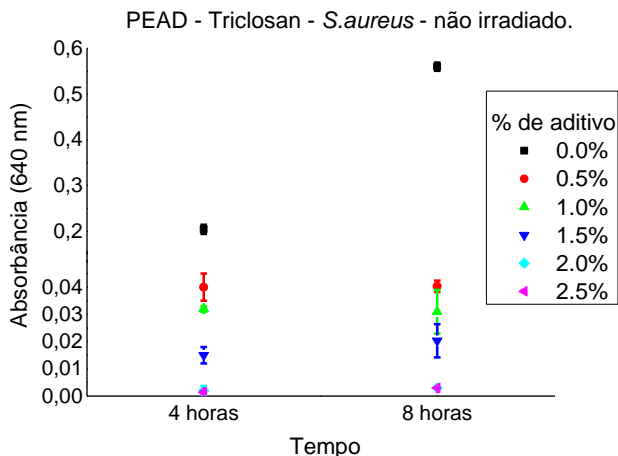


Figura 51 - CIM para o PEAD, aditivado com o Triclosan com bactérias *Staphylococcus aureus*, não irradiado

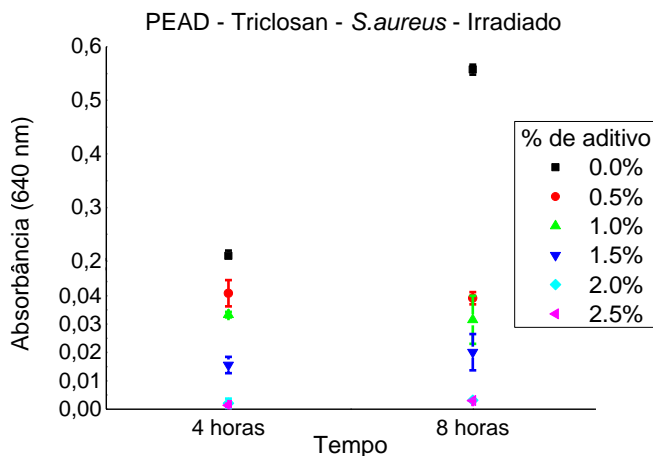


Figura 52 - CIM para o PEAD, aditivado com o Triclosan com bactérias *Staphylococcus aureus*, irradiado.

O PEAD aditivado com Triclosan e irradiado mostrou um comportamento similar ao não irradiado por radiação γ , o que corrobora com a tese de que o processo de irradiação não influencia significativamente a ação bactericida dos princípios ativos quando

imersos em matrizes poliméricas (Figura 50).

Estudos realizados por Ustündağ (USTÜNDAĞ e KORKMAZ, 2009) afirmam que o Triclosan apresenta sensibilidade à radiação γ , sofrendo degradação de maneira semelhante à provocada pela radiação ultravioleta. No entanto, conforme visto esse fenômeno não se mostra significativo no efeito antimicrobiano dos compostos polímero/Triclosan. Estas observações ocorrem essencialmente por três fatores:

- A concentração de Triclosan nos compostos é bastante baixa, sendo assim, a dose de radiação recebida pelo aditivo é proporcional a sua concentração em massa no polímero, ou seja, entre 0,125 (0,5%) a 0,625 kGy (0,5%);
- A medida de sensibilidade do Triclosan a radiação é de 0,12 (conforme item 2.7), ou seja, embora apresente alguma sensibilidade, o seu nível de degradação não é tão elevado a ponto de comprometer sua eficiência;
- Os subprodutos gerados pela degradação do Triclosan (Figura 13), ainda mantém o efeito antimicrobiano, uma vez que a sua atuação como agente bactericida ocorre por mais de um mecanismo. (RUSSELL, 2004);

Conforme descrito no item 2.7, diversos outros compostos podem se formar como resultado da degradação do triclosan pela radiação, tais como o dibenzodiclóro-p-dioxina (DCDD), dibenzo-p-dioxina, clorofenol, diclorofenol e fenol (SON, KO e ZOH, 2009). No entanto, esses compostos somente são formados na presença do radical OH⁻, que se origina da interação da água com a radiação γ . Por estar incorporado a matriz polimérica, o Triclosan fica protegido tanto da presença de água líquida, quanto da umidade do ar.

Testes microbiológicos tradicionais, como os utilizados nas análises dos compostos polímero/aditivo, são bastante conhecidos e eficientes, no entanto, são realizados quase que exclusivamente com bactérias. Como um dos objetivos desse trabalho é avaliar a potencialidade de utilização dos compostos em embalagens de produtos médicos e de alimentos, optou-se também por testes antimicrobianos envolvendo também fungos, uma vez que as condições ambientais de proliferação destes e das bactérias podem divergir bastante.

Por exemplo: bolores e leveduras crescem de maneira ótima em

ambientes com pH entre 4 e 6,5, tolerando valores mínimos entre 1,5 e 3,5. Já as bactérias tem seu pH ideal de crescimento entre 6,5 e 7,5, tolerando um valor mínimo de 4,5 (ROBERTSON, 2009). Além do pH, a atividade de água (A_w) é um fator que difere bastante entre os fungos e as bactérias. Os bolores podem crescer com valores de A_w a partir de 0,8, enquanto as bactérias exigem no mínimo uma A_w de 0,9. Essas características contribuíram para que se buscasse um método de avaliação do poder antifúngico dos compostos e dos aditivos.

De todos os possíveis testes envolvendo diversos tipos de fungos, um dos que mais desperta a atenção é o de medida de teor de açúcar de uma solução fermentável por leveduras *Saccharomyces Cerevisiae*. Embora não seja um método desenvolvido para a análise de materiais antimicrobianos, é muito utilizado principalmente na produção de bebidas fermentadas para avaliar a evolução do processo de fermentação. Essa técnica é baseada em medidas da atividade metabólica dos microrganismos (JAY, 2000). Avalia-se a taxa de produção ou consumo de um determinado produto para se estimar a população microbiana, como por exemplo, na formação de ácidos durante a produção de vitaminas por bactérias. (TORTORA, FUNKE e CASE, 2012). Dentre as principais características que levou a adaptação desse método, destacam-se o baixo custo dos materiais, e a facilidade na execução.

Inicialmente foram realizados testes envolvendo tanto os aditivos puros, quanto os compostos polímero/aditivo, no entanto, apenas os testes envolvendo os aditivos puros demonstraram alterações perceptíveis nas curvas de atenuação. Por esse motivo, apenas os aditivos puros foram testados por essa técnica.

4.1.3 Determinação da melhor concentração de aditivo

Conforme citado, as curvas de atenuação são muito empregadas para o estudo e monitoramento do controle da fermentação por fungos e bactérias nas indústrias de bebidas e alimentos. Este estudo foi realizado utilizando algumas concentrações de aditivos puros nas soluções fermentáveis, de maneira a identificar quais seriam os melhores valores para a concentração de aditivo e que permitissem avaliar seus efeitos antifúngicos. Esse controle é feito medindo o nível de açúcar presente nas soluções em teste, onde uma concentração maior de açúcares indica uma presença menor de células de leveduras capazes de metabolizá-lo em CO_2 e álcool.

Após diversos testes com várias concentrações diferentes de

aditivos na solução de teste, concluiu-se que os melhores resultados em relação ao efeito antimicrobiano estão entre 0,0 a 0,06g/l. Dessa forma, optou-se por utilizar concentrações de 0,00, 0,02, 0,04 e de 0,06g/l para cada aditivo.

Para as soluções contendo o Triclosan, não foram verificadas diferenças significativas das concentrações do aditivo na capacidade de eliminação das leveduras, Figura 53. Este efeito deve-se provavelmente a baixa solubilidade do Triclosan na água, que é de aproximadamente 0,017g/l (LAMEIRA, 2008). Com isso, o contato entre as células da levedura que permanecem em suspensão na solução e o agente antimicrobiano é reduzido. No entanto, optou-se em utilizar as mesmas concentrações utilizadas com o aditivo vítreo, para fins de comparação entre os dois aditivos.

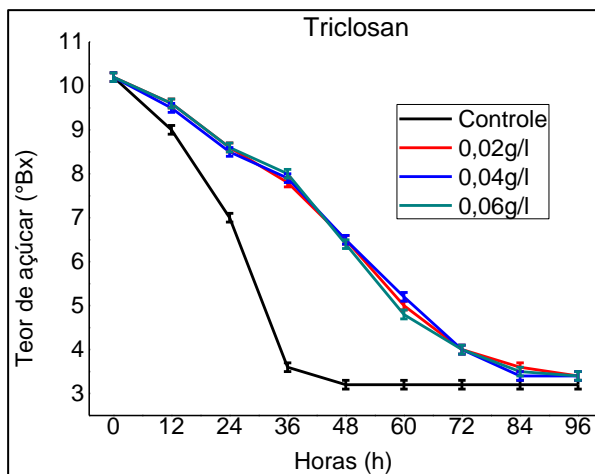


Figura 53 - Comparativo das curvas de atenuação de açúcar para soluções contendo Triclosan não irradiado, nas três concentrações de teste e controle.

A partir dos resultados de atenuação da Figura 53, quando comparadas às curvas das amostras contendo o Triclosan com a curva da solução de controle, é possível verificar que a diminuição no teor de açúcar ocorre de maneira mais suave nas amostras contendo o aditivo, indicando uma redução da taxa de consumo do açúcar pelas leveduras. Além disso, a concentração final de açúcar é superior nas soluções aditivadas e tendendo a uma estabilização.

No entanto, por ser um agente antimicrobiano tão eficaz, espera-se que o Triclosan elimine todas as células da levedura e o teor de açúcar

rapidamente e mantenha-se constante durante todo o experimento, ou que sua redução seja muito pequena, mesmo nas menores concentrações.

Este comportamento ocorre por dois motivos: i) o Triclosan não é um agente fungicida muito eficiente, por isso, a taxa de crescimento da levedura é levemente inferior a de morte, permitindo que se desenvolva o suficiente para consumir parte do açúcar da solução e ii) a baixa solubilidade do Triclosan na água limita ainda mais a capacidade fungicida do aditivo. De qualquer forma, os resultados mostram que essa técnica pode ser utilizada de maneira comparativa entre os aditivos irradiados e não irradiados na avaliação do efeito do processo de irradiação com radiação γ no efeito fungicida dos aditivos ou compostos.

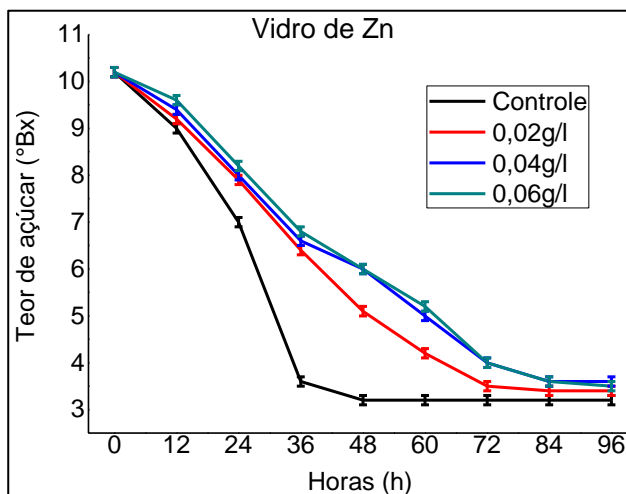


Figura 54 - Comparativo das curvas de atenuação de açúcar para soluções contendo vidro dopado com Zn^{+2} , não irradiado, nas três concentrações de teste e controle.

Para os testes com o vidro dopado com Zn^{+2} , os efeitos nas curvas de atenuação de açúcar também são evidentes, Figura 54. Os efeitos são semelhantes aos apresentados pelo Triclosan, com uma atenuação mais suave e valores de teores de açúcar finais superiores ao da solução de controle.

As medidas finais do teor de açúcar foram de 3,2°Bx para o controle, e 3,4, 3,5 e 3,6°Bx respectivamente para as concentrações de 0,02, 0,04 e 0,06g/l de vidro dopado. Além disso, percebe-se que entre a 36ª e 84ª hora, a diferença entre a curva de atenuação correspondente a

concentração de 0,02g/l e as demais é bastante grande. Na 48ª hora (Figura 55), por exemplo, as medidas são de 3,2°Bx para o controle e 5,1°Bx para a concentração de 0.02g/l e 6°Bx para as concentrações de 0.04 e 0.06g/l de vidro dopado.

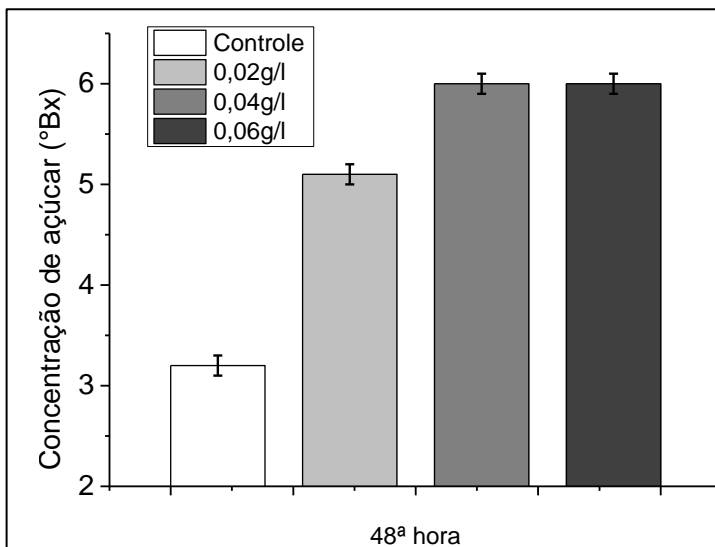


Figura 55 - Comparação do teor de açúcar na 48ª hora nas diferentes concentrações de vidro dopado com Zn²⁺, não irradiado

4.1.4 Efeito da radiação nas curvas de atenuação

Na Figura 56 é possível verificar o efeito do vidro dopado com Zn²⁺ na curva de atenuação do teor de açúcar da solução de teste, comparando o aditivo irradiado do não irradiado.

Nestes resultados identifica-se o efeito fungicida dos íons de Zn²⁺ pelo efeito direto do retardamento do processo de fermentação. Verifica-se que após 48 h de ensaio, na amostra de controle o processo de conversão do açúcar é encerrado e mantido em 3,2°Bx, enquanto nas amostras aditivadas o processo continuou de forma mais lenta, até 84 h de ensaio, com valor de 3,6°Bx. Ainda de acordo com os resultados apresentados na Figura 56 é possível verificar que o processo de irradiação não alterou o comportamento antimicrobiano do aditivo, uma vez que suas curvas de atenuação são praticamente idênticas.

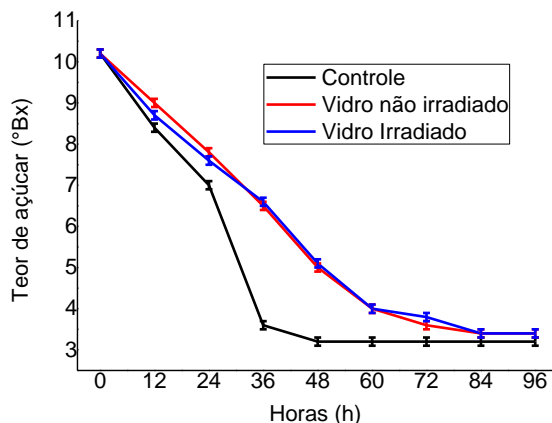


Figura 56 - Curva de atenuação do teor de açúcar para soluções contendo vidro dopado com Zn^{+2} , irradiado e não irradiado por radiação γ .

Para as curvas de atenuação das soluções contendo o Triclosan, Figura 57, os resultados são semelhantes. São observadas curvas de atenuação mais suaves com estabilização em $3,6^{\circ}Bx$ após 84 h. Da mesma forma, as curvas do aditivo irradiado e não irradiado por radiação γ também se mostraram praticamente idênticas, ou seja, o processo de irradiação não alterou a capacidade antimicrobiana do aditivo.

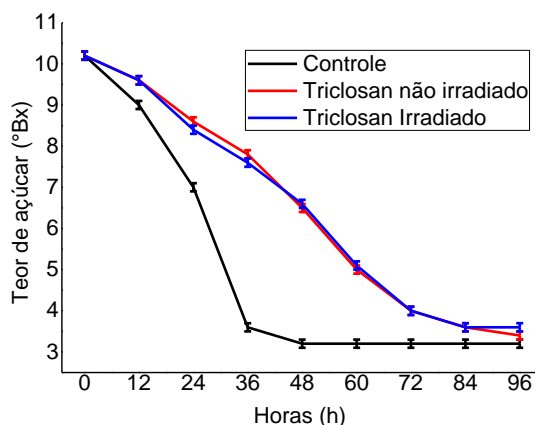


Figura 57 - Curva de atenuação do teor de açúcar para soluções contendo Triclosan irradiado, não irradiado e controle

A Figura 58 mostra a comparação dos resultados de atenuação nas

soluções contendo o vidro dopado com Zn^{+2} e o Triclosan, ambos irradiados e não irradiados bem como o controle.

É possível verificar que o Triclosan apresenta um efeito mais pronunciado do que o vidro dopado com Zn^{+2} , no que diz respeito à inclinação das curvas de atenuação. No entanto, vale ressaltar que, embora com efeito menor, o vidro dopado com Zn^{+2} mostra-se presente.

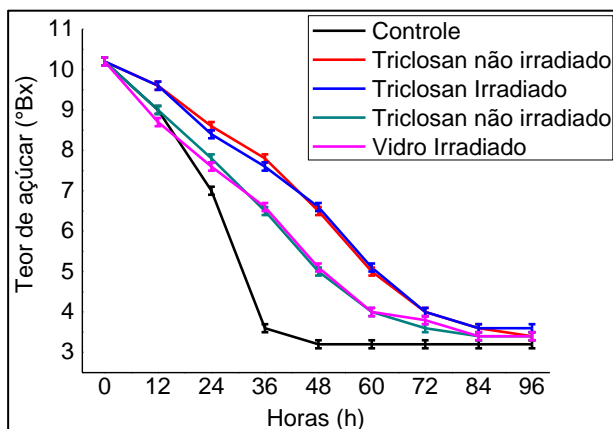


Figura 58 - Curva de atenuação comparando o Triclosan e o vidro dopado com Zn, ambos irradiados e não irradiados

4.1.5 Espectroscopia de infravermelho

A Figura 59-a mostra o espectro de infravermelho obtido para o Triclosan puro antes da sua irradiação por radiação γ . É possível identificar que a maior parte das bandas de absorção está no intervalo de 900 cm^{-1} a 1700 cm^{-1} . No intervalo de 600 cm^{-1} a 850 cm^{-1} as bandas de absorção são relativas aos modos vibracionais das ligações do tipo C-Cl (SILVERSTEIN, BASSLER e MORRILL, 2005). Os sinais entre 450 cm^{-1} e 580 cm^{-1} , bem como a banda em 1594 cm^{-1} , são característicos das estruturas aromáticas das unidades de fenol da molécula do Triclosan. Entre 800 cm^{-1} e 1000 cm^{-1} são observados sinais fortes e estreitos, característicos aos modos vibracionais dos grupos alcanos e alcenos, bem como as ligações do tipo R-CO-Cl e Cl-CO-O. Entre 3000 cm^{-1} e 3500 cm^{-1} , os sinais são referentes aos grupos hidroxilas ligados nas estruturas aromáticas do Triclosan (SILVERSTEIN, BASSLER e MORRILL, 2005).

Bandas próximas a 1150 cm^{-1} e 1058 cm^{-1} são características de ligações do tipo C-O-C, estruturas aromáticas e ligações do tipo C-Cl.

Em 1335 cm^{-1} e 1640 cm^{-1} os sinais são referentes aos grupos OH das estruturas do tipo C-OH e dos álcoois fenólicos.

Quando comparados os espectros para o Triclosan antes, Figura 59 -a, e após o processo de irradiação, Figura 59-b, não é perceptível alterações nos espectros. Com a sobreposição verifica-se que os espectros obtidos são praticamente idênticos. Esta dificuldade de observação das diferenças nos espectros se deve, ao fato de, apesar do Triclosan apresentar certa sensibilidade à radiação γ (USTÜNDAĞ e KORKMAZ, 2009) a quantidade de compostos formados pelo processo de degradação pela radiação não é suficiente para ser identificado via FTIR. Nesse caso, uma técnica mais interessante seria a *Cromatografia líquida de alta eficiência*, mais conhecida como HPLC (High Performance/Pressure Liquid Chromatography). Cálculos baseados no trabalho de Ustündağ e Korkmaz (USTÜNDAĞ e KORKMAZ, 2009), demonstram que para os percentuais de aditivos e a dose de irradiação utilizada, a degradação do triclosan vai de $44,87 \times 10^{-6}\%$ para os compostos com 0.5% e $224.4 \times 10^{-6}\%$ para os aditivados com 2,5% de triclosan, ficando abaixo do nível de detecção do equipamento. Mais detalhes dos cálculos sobre o efeito da radiação no Triclosan estão demonstrados no Anexo 1.

Baseado nos resultados mostrados na Figura 59, é possível afirmar que, nas condições testadas, a radiação γ não provoca mudanças significativas nas moléculas de triclosan, permitindo seu uso como aditivo antimicrobiano, não apenas no PEAD e na PA6 testados nesse trabalho, mas também em outros tipos de polímeros.

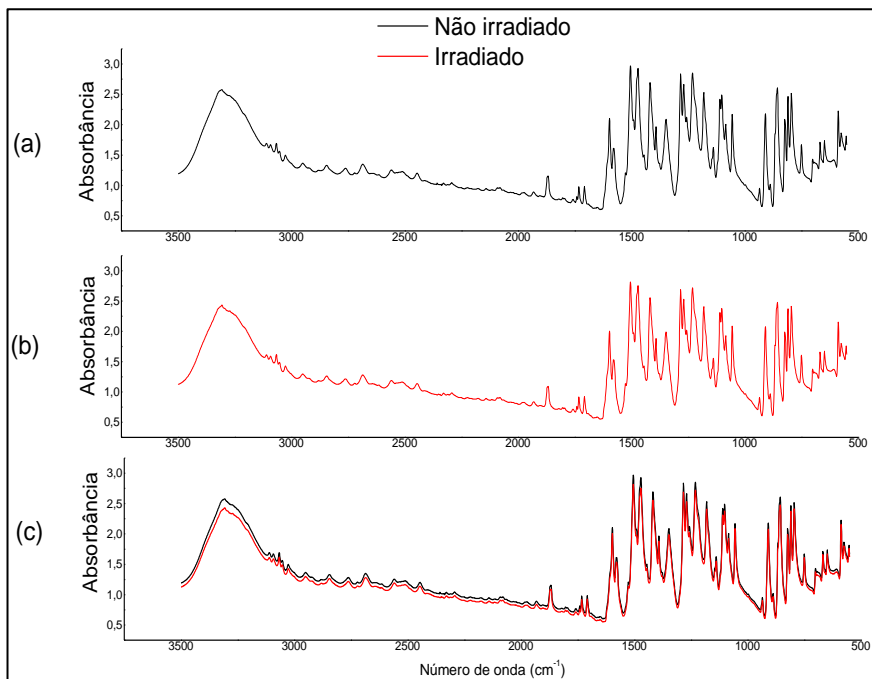


Figura 59 - Espectros de FTIR para o Triclosan. (a) antes da irradiação, (b) após a irradiação e (c) sobreposição dos espectros.

4.1.6 Efeito da radiação no vidro dopado com Zn^{+2}

Os mecanismos de degradação provocados pela radiação γ ocorrem ionizando os átomos e quebrando ligações covalentes. Neste caso, o zinco já se apresentava na forma iônica devido ao processo de incorporação no vidro e não se esperava qualquer efeito de ionização pela radiação γ no aditivo vítreo.

4.2 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos com os compostos aditivados com o vidro dopado com Zn^{+2} apresentaram pouco efeito no que diz respeito ao poder bactericida, embora em algumas teses de difusão em ágar tenha apresentando alguns resultados positivos. Para esses compostos, o efeito da irradiação não foi significativo, pois o princípio ativo deste aditivo é o Zn^{+2} , ou seja, um elemento já ionizado, portanto, a radiação γ não

provocaria nenhuma alteração no seu efeito antimicrobiano.

Se o zinco estivesse presente na forma reduzida ou como óxido, o efeito da radiação poderia aumentar a eficiência antimicrobiana, pois por se tratar de uma radiação ionizante, provocaria a formação de íons Zn^+ e Zn^{+2} .

Nos testes utilizando apenas o aditivo puro, frente a leveduras, o efeito antimicrobiano mostrou-se presente, mas como esperado, não foi alterado pelo efeito da radiação γ .

Em todos os testes envolvendo o Triclosan, o efeito antimicrobiano foi expressivo. Tanto os testes de difusão em ágar quanto os de CIM demonstraram o elevado efeito bactericida do composto. Conforme o esperado. Embora alguns estudos indiquem certa suscetibilidade do Triclosan à radiação, os níveis de degradação foram muito baixos, não resultando em uma alteração significativa do efeito antimicrobiano. Esse fato foi confirmado quando testado o aditivo puro irradiado e não irradiado, frente a leveduras, ou seja, a quantidade de radiação utilizada não foi suficiente para degradar o aditivo a ponto de ser detectado no FT-IR e nos testes antimicrobianos.

5 CONCLUSÕES

Os compostos polímero/triclosan se mostraram muito eficientes nos testes de difusão em ágar, apresentando halos bastante visíveis em todas as concentrações testadas. Chama a atenção à diferença entre o efeito biocida dos compostos a base de triclosan, onde as amostras de PEAD apresentam um efeito antimicrobiano mais acentuado do que as de PA6.

Os testes de CIM demonstraram o efeito antimicrobiano foi significativo em todas as concentrações testadas, nos dois polímeros base.

Tanto para os compostos a base de PA6 quanto para os a base de PEAD, o efeito da radiação não se mostrou significativo nos testes de difusão em ágar e CIM.

Os compostos a base do vidro dopado mostraram resultados pouco significativos tanto nos testes de difusão em ágar, quanto nos testes de CIM, indicando a necessidade de mais estudos quando ao efeito antimicrobiano. Assim como nos testes com os compostos a base de triclosan, a irradiação não demonstrou efeito significativo nos compostos aditivados com o vidro.

Nos testes de avaliação da curva de atenuação, o triclosan puro apresentou efeito antimicrobiano, não sendo detectadas diferenças entre as curvas do aditivo irradiado e não irradiado.

Nos testes de avaliação da curva de atenuação na presença do vidro dopado com Zn, os resultando também indicaram efeito antimicrobiano. Da mesma forma que nos testes com o triclosan, a irradiação a 25kGy não afetou o efeito antimicrobiano do aditivo.

Os testes de “avaliação da curva de atenuação”, apresentaram resultados positivos quanto a sua aplicabilidade em testes antimicrobianos, no entanto, novos estudos serão necessários de forma a padronizar a técnica.

Por fim, ficou demonstrado que mesmo as matrizes poliméricas e o aditivo antimicrobiano orgânico (triclosan), apresentarem sensibilidade à radiação γ , nas condições de teste desse trabalho, não foram percebidas alterações no efeito biocida dos compostos e dos aditivos.

6 REFERÊNCIAS

ANGIOLLETO, E. **Desenvolvimento de Processo para a Fabricação de Cerâmicas com Propriedades Antimicrobianas**. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2003.

ARVANITOYANNIS, I. S. **Irradiation of Food Commodities: Techniques, Applications, Detection, Legislation, Safety and Consumer Opinion**. 1^a. ed. San Diego: Academic Press, 2010.

AZEREDO, H. M. C. D.; FARIA, J. D. A. F.; AZEREDO, A. M. C. D. Embalagens ativas para alimentos. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, Campinas, v. 20, Dezembro 2000. ISSN 1678-457X.

BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, January–February 2008. 89–105.

BARKLEY, W. E. et al. **Manual de segurança biológica em laboratório**. 3^a. ed. Genebra: Organização Mundial da Saúde, 2004.

CALLISTER, W. D. **Materials science and engineering: an introduction**. 7^a. ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2007.

CALVO, W. A. P. **Desenvolvimento do Sistema de Irradiação em um Irradiador Multipropósito de Cobalto-60 Tipo Compacto**. Intituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. São Paulo, p. 159. 2005.

CASCANTE, M.; CURTO, R. Comparative characterization of the fermentation pathway of *Saccharomyces cerevisiae* using biochemical systems theory and metabolic control analysis: Steady-state analysis. **Mathematical Biosciences**, November 1995. 51–69.

CHARLESBY, A. Radiation Mechanisms in Polymers. **Irradiation of Polymers**, v. 66, p. 1-21, Junho 1967.

CHEREDNICHENKO, G. et al. Triclosan impairs excitation–contraction coupling and Ca²⁺ dynamics in striated muscle. **PNAS**, Washington, v. 109, n. 40, October 2012. ISSN 0027-8424.

CHYTIRI, S. et al. Thermal, mechanical and permeation properties of gamma-irradiated multilayer food packaging films containing a buried layer of recycled low-density polyethylene. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 75, n. 3, p. 416-423, Março 2006. ISSN 0969-806X.

CHYTIRI, S. et al. Determination of radiolysis products in gamma-irradiated multilayer barrier food packaging films containing a middle layer of recycled LDPE. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 77, n. 9, p. 1039-1045, Setembro 2008. ISSN 0969-806X.

COLES, R.; MCDOWELL, D.; KIRWAN, M. J. (Eds.). **Food Packaging Technology**. Boca Raton: CRC Press, 2003.

DEAN, D. A.; EVANS, E. R.; HALL, I. H. (Eds.). **Pharmaceutical Packaging Technology**. 3^a. ed. London: Taylor & Francis, 2005.

DENYER, S. P.; MAILLARD, J. Y. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-negative bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 35S–45S, 2002.

DEOPURA, B. L. et al. (Eds.). **Polyesters and polyamides**. Boca Raton: Woodhead Publishing Limited, 2008.

D'GRATIS Farmácia. Disponível em:
<http://dgratisfarmacia.blogspot.com.br/2010_07_01_archive.html>.
Acesso em: 5 Outubro 2013.

FERNANDES, M. H. C.; GARCIA, E. E. C.; PADULA, M. **Migração de componentes de embalagens plásticas para alimentos**. Campinas: Centro de Tecnologia de Embalagem de Alimentos – CETEA, ITAL/SBCTA, 1987.

FIORI, M. A. **Desenvolvimento e Avaliação de Compósitos do Tipo Polímero-Madeira com Propriedades Biocidas**. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, p. 157. 2008.

FIORI, M. A. et al. Bactericide glasses developed by Na⁺/Ag⁺ ionic exchange. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, n. 5, p. 1569–1573, junho 2009. ISSN 0928-4931.

FORMIGHIERI, E. F. **Genoma de Moniliophthora perniciosa: montagem e anotação da mitocôndria e desenvolvimento de sistema de anotação semi-automática de genes.** Universidade Estadual de Campinas. Campinas. 2006.

FRAISE, A. P.; LAMBERT, P. A.; MAILLARD, J.-Y. **Russell, Hugo & Ayliffe's Principles and practice of disinfection.** 4ª. ed. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2004.

GOOCH, J. W. **Biocompatible Polymeric Materials and Tourniquets for Wounds.** New York: Springer, 2010.

HAN, J. H. (Ed.). **Packaging for Nonthermal Processing of Food.** 1ª. ed. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2007.

HARPER, C. A. (Ed.). **Modern plastics handbook.** New York: McGraw-Hill, 2000.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **Trends in radiation sterilization of health care products.** Vienna: [s.n.], 2008. ISBN ISBN 978-92-0-111007-7.

JAY, J. M. **Modern Food Microbiology.** 6ª. ed. Gaithersburg: Aspen Publishers, Inc, 2000.

JONES, R. D. et al. Triclosan: A review of effectiveness and safety in health care settings. **American Journal of Infection Control**, v. 28, n. 2, p. 184-196, Abril 2000. ISSN 0196-655.

KATO, E. E. **Mapeamento e Monitoramento do Conhecimento dos solos no Ensino Fundamental e Médio.** Universidade de Mogi das Cruzes. Mogi das Cruzes. 2006.

KOWALSKI, W. **Ultraviolet Germicidal Irradiation Handbook: UVGI for Air and Surface Disinfection.** 1ª. ed. New York: Springer, 2009.

KUPTSOV, A. H.; ZHIZHIN, G. N. **Handbook of Fourier Transform Raman and Infrared Spectra of Polymers.** Amsterdam,: Elsevier, 1998.

KURTZ, S. M. **UHMWPE biomaterials handbook**. 2^a. ed. London: Academic Press, 2009.

LAMEIRA, V. **Estudo dos efeitos letais e subletais (reprodução e teratogênese) do fármaco triclosan para *Daphnia similis*, *Ceriodaphnia dubia*, *Ceriodaphnia silvestrii***. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - Ipen. São Paulo. 2008.

MAIA, J. M. A. F. **Estudio de los parámetros clave implicados en la migración de componentes de materiales destinados al contacto con alimentos**. Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela, p. 257. 2013.

MAKUUCHI, K.; CHENG, S. **Radiation Processing Of Polymer Materials And Its Industrial Applications**. 1^a. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc, 2012.

MANIVANNAN, G. (Ed.). **Disinfection and decontamination: principles, applications, and related issues**. Boca Raton: CRC Press, 2007.

MARK, H. F. **Encyclopedia of Polymer Science and Technology**. 3^a. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, v. III, 2003.

MASSEY, L. K. **The Effect of Sterilization Methods on Plastics and Elastomers**. 7^a. ed. Norwich: William Andrew, 2004.

MCDONNELL, G.; RUSSELL, A. D. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, Janeiro 1999. 147–179.

MELO, N. S. D. **Comportamento Mecânico do Policarbonato Exposto à Radiação Gama**. Instituto Militar De Engenharia. Rio de Janeiro. 2004.

MURPHYA, A.; KAVANAGH, K. Emergence of *Saccharomyces cerevisiae* as a human pathogen: Implications for biotechnology. **Enzyme and Microbial Technology**, Outubro 1999. 551–557.

OCCLOO, F. C. K. et al. Effect of Gamma Irradiation on Antibacterial Properties of Sea Crab Shell Chitosan. **European Journal of Food Research & Review**, v. 3, n. 2, p. 69-78, Abril 2012. ISSN 2347-5641.

OLIANI, W. L. **Estudo da Formação de Nanogéis e Microgéis de Polipropileno Modificado por Radiação Gama e Incorporação de Nanopartículas de Prata Visando à Ação Biocida**. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. São Paulo, p. 140. 2013.

OLIVEIRA, L. M. D. (Ed.). **Requisitos de proteção de produtos em embalagens plásticas rígidas**. [S.l.]: Cetea/Ital, 2006.

PAOLI, M. A. D. **Degradação e estabilização de polímeros**. 2ª ed. São Paulo: Artliber, 2008.

PENTIMALLI, M.; RAGNI, P.; G RIGHINI, D. C. Polymers and paper as packaging materials of irradiated food. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 57, n. 3–6, p. 385-388, Março 2000. ISSN 0969-806X.

POWEL, C. D.; QUAIN, D. E.; SMART, K. A. The impact of brewing yeast cell age on fermentation performance, attenuation and flocculation. **FEMS Yeast Research**, April 2003. 149–157.

RADIATION Biology: A Handbook for Teachers and Students. **Training Course Series 42**, Vienna, March 2010. ISSN 1018-5518.

RATNER, B. D. et al. (Eds.). **Biomaterials Science - An Introduction to Materials in Medicine**. 2ª. ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2004.

ROBERTSON, G. **Food packaging and shelf life: a practical guide**. Boca Raton: CRC Press, 2009.

ROONEY, M. L. **Active Food Packaging**. 1ª. ed. Glasgow: Blackie Academic & Prof, 1995.

RUSSELL, A. D. Whither triclosan. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, n. 5, p. 693-695, 2004.

SANTOS, M. F. et al. Application of glass particles doped by Zn²⁺ as an antimicrobial and atoxic compound in LLDPE and HDPE. **Materials Science and Engineering: C**, v. 39, p. 403-410, junho 2014. ISSN 0928-4931.

SATYANARAYANA, T.; KUNZE, G. (Eds.). **Yeast Biotechnology: Diversity and Applications**. 1^a. ed. [S.l.]: Springer Netherlands, 2009.

SCHWEIZER, H. P. Triclosan: a widely used biocide and its link to antibiotics. **FEMS Microbiology Letters**, 7 agosto 2001. 1-7.

SICKAFUS, K. E.; KOTOMIN, E. A.; UBERUAGA, B. P. (Eds.). **Radiation Effects in Solids**. Dordrecht: Springer, 2004.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, E. T. C. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 7^a. ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2005.

SOARES, E. V. **Beer in Health and Disease Prevention**. 1st. ed. San Diego: Academic Press, 2008.

SOCCOL, C. R.; PANDEY, A.; LARROCHE, C. (Eds.). **Fermentation Processes Engineering in the Food Industry**. 1^a. ed. Boca Raton: CRC Press, 2013.

SOMMERS, C. H.; FAN, X. (Eds.). **Food irradiation research and technology**. 1^a. ed. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2006.

SON, H.-S.; KO, G.; ZOH, K.-D. Kinetics and mechanism of photolysis and TiO₂ photocatalysis of triclosan. **Journal of hazardous materials**, 2009. 954-60.

SORRIBAS, A. Comparative characterization of the fermentation pathway of *Saccharomyces cerevisiae* using biochemical systems theory and metabolic control analysis: Model validation and dynamic behavior. **Mathematical Biosciences**, November 1995. 71-84.

SPOTHEIM-MAURIZOT, M.; BELLONI, J.; DOUKI, T. **Radiation Chemistry: From basics to applications in material and life sciences**. 1^a. ed. Courtaboeuf: EDP Sciences, 2008.

TESTE de sensibilidade aos antimicrobianos. **ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo5/interpretacao2.htm>. Acesso em: 01 set. 2013.

TOLINSKI, M. **Additives for Polyolefins**. 1ª. ed. Burlington: Elsevier Inc, 2009.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10ª. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TSAI, D. **Aplicação Da Radiação Por Feixe De Elétrons Como Agente Esterilizante De Microrganismos Em Substrato Turfoso**. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. São Paulo. 2006.

USTÜNDAĞ, I. O.; KORKMAZ, M. Spectroscopic, kinetic and dosimetric features of the radical species produced after radiodegradation of solid triclosan. **Radiation and Environmental Biophysics**, New York, 14 Fevereiro 2009. 159-167.

VERMEIREN, L. et al. Developments in the active packaging of foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, n. 3, p. 77–86, Março 1999. ISSN 0924-2244.

VIGGIANO, L. E.; GODOI, I.; MARTINS, A. Esterilização de produtos e artigos médico-hospitalares por óxido de etileno - Parte I. Disponível em: <http://www.sbcc.com.br/revistas_pdfs/ed%2013/13ArtigoTecnicoEsteriliza%E7%E3o.pdf>. Acesso em: 10 fevereiro 2011.

WALDER, J. M. M.; CAMARGO, A. C. D. Equipamentos Utilizados para Irradiação de Alimentos e/ou Outros Materiais. **Divulgação da tecnologia da irradiação de alimentos e outros materiais**, 2005. Disponível em: <<http://www.cena.usp.br/irradiacao/equipamentos.htm>>. Acesso em: 27 agosto 2014.

WALDER, J. M. M.; CAMARGO, A. C. D. Divulgação da tecnologia de irradiação de alimentos e outros materiais. **Irradiação de Outros Materiais**. Disponível em: <<http://www.cena.usp.br/irradiacao/outrosmateriais.html>>. Acesso em: 1

fevereiro 2014.

WIEBECK, H.; HARADA, J. **Plásticos de Engenharia**. São Paulo: Artliber Editora, 2005.

WILLEY, J. M.; SHERWOOD, L. M.; WOOLVERTON, C. J. **Prescott, Harley, and Klein's Microbiology**. 7^a. ed. New York: McGraw-Hill, 2008.

WU, J.-L. et al. Triclosan determination in water related to wastewater treatment. **Talanta**, v. 72, n. 5^a, p. 1650-1654, July 2007. ISSN 0039-9140.

7 ANEXO 1

Efeito da irradiação sobre o Triclosan

Üstündağ e Korkmaz (USTÜNDAĞ e KORKMAZ, 2009) estudaram os efeitos da radiação γ no Triclosan e afirmam que este é bastante sensível à radiação γ , tendo um “valor G ” de 0,12. O “valor G ” é utilizado como referencia em termos de suscetibilidade ao efeito das radiações ionizantes e indica o número de eventos (formação de ligações cruzadas, cisões, ionização de moléculas, etc.) provocados por cada 100 eV de energia absorvida, isto é, o número de ligações químicas modificadas por cada 100 eV (MELO, 2004). Baseado nessas informações é possível estimar o nível de degradação sofrido pelo Triclosan.

Considerando-se que:

- O valor de “ G ” para o Triclosan de $12,4 \times 10^{-9}$ mol/J, ou seja, para cada 1J de energia irradiante absorvida, tem-se $12,4 \times 10^{-9}$ mol de reações de degradação;
- Os aditivos puros foram irradiados com 25 kGy (25 kJ/kg), ou seja, 25 J/g;
- O peso molecular do Triclosan é de 289,5 g/mol.
Temos que:
- Para cada Joule absorvido, há uma degradação de $3,590 \cdot 10^{-6}$ g de Triclosan;
- Cada 1g de amostra absorveu 25J durante a irradiação, portanto, sofre uma degradação de $89,75 \cdot 10^{-6}$ g, ou seja, $8,975 \cdot 10^{-3}$ %.

Assim, tem-se a formula:

Equação 1 - Cálculo do percentual de degradação do Triclosan irradiado

$$\%_{\text{degradado}} = G \times E_{\text{ab}} \times M \times 100\%$$

Onde:

$G \rightarrow$ Valor de G , em mol/J

$E_{\text{ab}} \rightarrow$ Dose da irradiação em KGy

$M \rightarrow$ massa molecular do Triclosan

No caso dos polímeros aditivados, a dose total é dividida entre a matriz e os aditivos de maneira proporcional a massa, portanto, o nível de degradação nos compostos também é proporcional a sua concentração. Assim tem-se:

Equação 2 - Cálculo do percentual de degradação do Triclosan irradiado presente no composto

$$\%_{\text{degradado}} = G \times E_{\text{ab}} \times (C \times 100^{-1}) \times M \times 100$$

Ou

$$\%_{\text{degradado}} = G \times E_{\text{ab}} \times C \times M$$

Onde:

G → Valor de G, em mol/J

E_{ab} → Dose da irradiação em KGy

C → concentração percentual do aditivo

M → massa molecular do Triclosan

A Tabela 6 mostra os valores de degradação dos aditivos para nos compostos em função da concentração:

Tabela 6 - dose de radiação absorvida e nível de degradação do Triclosan

Concentração %	Dose de radiação absorvida (kGy)	% de degradação (10 ⁻⁶)	Degradação em PPM
0,5	0,125	44,87	0,449
1,0	0,250	89,75	0,897
1,5	0,375	134,6	1,346
2,0	0,500	179,6	1,795
2,5	0,625	224,4	2,244