

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – IP&D
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica

Felipe Santos de Almeida

**Avaliação da ação antimicrobiana da água ativada por plasma sobre membrana
amniótica**

**Evaluation of the Antimicrobial Action of Plasma Activated Water on Amniotic
Membrane**

São José dos Campos, SP
2023

Felipe Santos de Almeida

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DA ÁGUA ATIVADA POR PLASMA
SOBRE MEMBRANA AMNIÓTICA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Barros Sant'Anna
Coorientadora: Profa. Dra. Anelise Cristina Osório Cesar Doria

São José dos Campos, SP
2023

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

Ficha catalográfica

Almeida, Felipe Santos de
Avaliação da ação antimicrobiana da água ativada por plasma sobre membrana amniótica / Felipe Santos de Almeida; orientadora, Profa. Dra. Luciana Barros Sant'Anna; co-orientadora Profa. Dra. Anelise Cristina Osório Cesar Doria. - São José dos Campos, SP, 2023.

1 CD-ROM, 59 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica.

Inclui referências

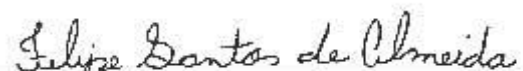
1. Engenharia Biomédica. 2. Âmnio. 3. Produtos com Ação Antimicrobiana. I. Sant'Anna, Profa. Dra. Luciana Barros, orient. II. Doria, Profa. Dra. Anelise Cristina Osório Cesar, co-orient. III. Universidade do Vale do Paraíba, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica. IV. Título.

Eu, Felipe Santos de Almeida, autor(a) da obra acima referenciada:

Autorizo a divulgação total ou parcial da obra impressa, digital ou fixada em outro tipo de mídia, bem como, a sua reprodução total ou parcial, devendo o usuário da reprodução atribuir os créditos ao autor da obra, citando a fonte.

Declaro, para todos os fins e efeitos de direito, que o Trabalho foi elaborado respeitando os princípios da moral e da ética e não violou qualquer direito de propriedade intelectual sob pena de responder civil, criminal, ética e profissionalmente por meus atos.

São José dos Campos, 3 de Julho de 2023.







Autor(a) da Obra

FELIPE SANTOS DE ALMEIDA

**“AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DA ÁGUA POR PLASMA SOBRE
MEMBRANA AMNIÓTICA.”**

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba - Univap, pela seguinte banca examinadora:

Prof.ª Dr.ª Juliana Ferreira Strixino	
Prof.ª Dr.ª Luciana Barros Sant'Anna	
Prof.ª Dr.ª Anelise C. O. C. Dória	
Prof. Dr. Rodrigo Sávio Pessoa	

Prof.ª Dr.ª Lúcia Vieira

Diretora do IP&D – Univap

São José dos Campos, 07 de março de 2023.

Agradecimento

Agradeço a Deus, por ter me dado saúde e força para superar minhas dificuldades.

À minha família, pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

À minha orientadora, Professora Doutora Luciana Barros Sant'Anna, por ter me aceitado de última hora, pelo suporte e incentivo.

A minha coorientadora, Professora Doutora Anelise Cristina Osório Cesar Dória, por ter me guiado por toda parte microbiológica e por ter respondido todas as minhas mensagens de última hora.

As minhas amigas, Amanda, Ana Clara Rezeck e Gabriela Tie, por ter me ajudado no processamento das Membranas.

À “Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP”, seu corpo docente por me dar a oportunidade de expandir a minha capacidade acadêmica.

À “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES” pelo apoio financeiro.

A todos que diretamente ou indiretamente colaboraram na elaboração desse trabalho

RESUMO

O potencial de utilização da Membrana Amniótica (MA) em diferentes aplicações tem sido amplamente estudado, e a necessidade de garantir a esterilidade desse material é essencial para o seu uso. Por causa do aumento da resistência bacteriana é importante a pesquisa de novas técnicas de esterilização, sendo o uso de água ativada por plasma (PAW) uma alternativa, que consiste em uma técnica onde se aplica o plasma elétrico na água a fim de funcionalizá-la, eliminando assim os pontos negativos do uso direto do plasma, como a temperatura. O objetivo do trabalho foi analisar a ação antimicrobiana da água de osmose reversa (OR) ativada por plasma, sobre Membrana Amniótica contaminada com cepa padrão ATCC® de *Escherichia coli* (25922), *Klebsiella pneumoniae* (13883), e *Staphylococcus aureus* (6538). A MA foi contaminada por um inóculo a 1×10^6 UFC/mL em salina, que ficou em contato por 3 min, após esse período a PAW foi colocada em contato com a MA por 90 min. Para a ativação da água foi utilizado o plasma, *gliding arc* de Argônio e ar comprimido com um tempo de ativação de 30 min, estudando a viabilidade celular após a exposição das amostras da Membrana Amniótica à ação da PAW. Os principais resultados obtidos foi a viabilidade celular de 11% com a PAW refrigerada e 15% com a PAW ambiente para a *K. pneumoniae*, 9% com a PAW refrigerada e 13% com a PAW ambiente para o *S. aureus* e 10% com a PAW refrigerada e 14% com a PAW ambiente para a *E. coli*, observando uma melhor ação antimicrobiana da PAW refrigerada. Foi observado uma maior redução das UFC quando utilizado a PAW refrigerada + MA e uma redução do pH de 7,04 para 3,41 da PAW refrigerada e uma redução de 7,05 para 3,61 com a PAW ambiente. A utilização da MA + PAW apresentou um melhor resultado do que utilizando apenas a PAW e a MA. Assim, conclui-se que as PAWs possuem uma ação antimicrobiana significativa, porém não o suficiente para realizar a esterilização da MA.

Palavras-chave: Membrana Amniótica, Ação Antimicrobiana, *gliding arc*, Água ativada por Plasma.

ABSTRACT

The potential use of the Amniotic Membrane (AM) in different applications has been widely studied and the need to guarantee the sterility of this material is essential for its use. Due to the increase in bacterial resistance, it is important to research new sterilization techniques, with the use of plasma-activated water being an alternative, which consists of a technique where electric plasma is applied to the water to functionalize it, thus eliminating the negative points of the direct use of plasma, such as temperature. The aim of this study was to analyze the antimicrobial action of plasma-activated reverse osmosis (RO) water on contaminated amniotic membrane using ATCC® standard strain of *Escherichia coli* (25922), *Klebsiella pneumoniae* (13883), *Staphylococcus aureus* (6538). The AM was contaminated by an inoculum at 1×10^6 CFU/mL in saline, which was in contact for 3 min, after which the PAW was placed in contact with the AM for 90 min. Plasma, gliding arc of argon and compressed air were used to activate the water with an activation time of 30 min, studying the cell viability after exposing the amniotic membrane samples to the action of PAW. The main results obtained were a cell viability of 11% with the refrigerated PAW and 15% with the ambient PAW for *K. pneumoniae*, 9% with the refrigerated PAW and 13% with the ambient PAW for *S. aureus* and 10% with the refrigerated PAW and 14% with the ambient PAW for *E. coli*, observing a better antimicrobial action of the refrigerated PAW. A greater reduction in CFU was observed when using refrigerated PAW + AM, and a reduction in pH from 7.04 to 3.41 with the refrigerated PAW and a reduction from 7.05 to 3.61 with the ambient PAW. The use of AM + PAW showed a better result than using only PAW and AM. Thus, it is concluded that PAWs have a significant antimicrobial action, but not enough to perform AM sterilization.

Keywords: Amniotic Membrane, Antimicrobial Action, gliding arc, Plasma Activated Water.

Lista de Ilustrações

Figura 1 - Mecanismo de transferência de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.	20
Figura 2 - Sequência dos procedimentos da metodologia	25
Figura 3 - Arranjo experimental: (A) Equipamento em funcionamento e (B) Montagem experimental.....	26
Figura 4 – Separação manual da MA. Seta laranja é o cordão umbilical e a seta preta é o cório.....	28
Figura 5 – Processamento da M A após ser separada do cório e lavada com solução de antifúngico e antibióticos. O círculo redondo, é o espaço do cordão umbilical removido.....	28
Figura 6 - Cortador circular sendo utilizado na MA para pegar os fragmentos.....	29
Figura 7 - Amostras de MA, já fragmentadas na dimensão adequada, em meio DMEN e glicerol 1:1, no freezer -80 °C.....	29
Figura 8 - Análise do pH ao longo do período estudado.	32
Figura 9 - Comparação da Viabilidade Celular (%) entre os diferentes microrganismos, após 24h e 48h da ativação da água, e com as diferentes águas ativadas por plasma, PAW ambiente e PAW refrigerada	34
Figura 10 - Comparação das médias de UFC/ml entre os diferentes tipos de PAW (a, ambiente; r, refrigerada) em cada tipo de microrganismos, após 0h, 24h e 48h da ativação da água. Teste ANOVA; *p<0.05 versus controle.	35
Figura 11 – Comparação das médias da Viabilidade Celular (%) entre os diferentes microrganismos do grupo associada a MA, imediatamente após a ativação da água das diferentes águas ativadas por plasma, PAW ambiente e PAW refrigerada.	37
Figura 12 - Comparação das médias de UFC/ml entre os diferentes tipos de PAW associada a MA em cada tipo de microrganismos, imediatamente após a ativação da água. Teste ANOVA; * p<0.05 versus controle; #. p<0.05 versus PAW ambiente.....	38
Figura 13 - Efeito da PAW e da PAW + MA analisado através da microscopia eletrônica por varredura: (A) Controle, (B) Bactéria + PAW, (C) Bactéria + PAW + Membrana. 1) <i>K. pneumoniae</i> , 2) <i>S. aureus</i> e 3) <i>E. coli</i> . Utilizando uma magnitude de 2000x com uma escala de 2µm.....	40

Lista de Abreviações

MA - Membrana Amniótica.

PAW - *Plasma Activated water*.

E. coli - *Escherichia coli*.

S. aureus - *Staphylococcus aureus*.

K. pneumoniae - *Klebsiella pneumoniae*.

ATCC®- *American Type Culture Collection*.

kGy- Quilos gray.

OH- Radical hidroxila.

O₂- Oxigênio.

N₂- Nitrogênio.

O₃- Ozônio.

H₂O₂- Peroxido de hidrogênio.

NO₃- Nitrato.

NO₂- Nitrito.

NO- Oxido Nítrico.

PCA- *Plate Count Agar*.

UFC- Unidade Formadora de Colônia.

W- Watts.

Hz- Hertz.

MEV- Microscopia Eletrônica de Varredura.

ml- mililitro.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
1.1	OBJETIVO GERAL.....	14
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
1.3	JUSTIFICATIVA.....	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1	MEMBRANA AMNIÓTICA.....	16
2.2	PLASMA.....	18
2.2.1	Água ativada por plasma (PAW).....	19
2.3	MICROORGANISMOS.....	21
2.3.1	Escherichia coli.....	21
3	METODOLOGIA.....	24
3.1	ATIVAÇÃO DA ÁGUA.....	26
3.2	AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DA PAW SOBRE OS MICROORGANISMOS.....	26
3.3	COLHEITA DA PLACENTA.....	27
3.4	PROCEDIMENTOS COM A MEMBRANA AMNIÓTICA.....	27
3.5	VIABILIDADE CELULAR.....	30
3.6	MICROSCOPIA ELETRÔNICA POR VARREDURA (MEV).....	30
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
4	RESULTADOS.....	32
4.1	ANÁLISE DO PH.....	32
4.2	VIABILIDADE CELULAR DOS GRUPOS DE MICROORGANISMOS SUBMETIDOS À ÁGUA ATIVADA POR PLASMA.....	33
4.3	CONTAGEM DAS UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA DOS GRUPOS DE MICROORGANISMOS SUBMETIDOS À ÁGUA ATIVADA POR PLASMA... 34	34
4.4	VIABILIDADE CELULAR DOS GRUPOS DE MICROORGANISMOS CONTENDO A MEMBRANA AMNIÓTICA CONTAMINADA E SUBMETIDA À ÁGUA ATIVADA POR PLASMA.....	36
4.5	CONTAGEM DAS UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA DOS GRUPOS DE MICROORGANISMOS CONTENDO A MEMBRANA AMNIÓTICA CONTAMINADA E SUBMETIDA À ÁGUA ATIVADA POR PLASMA.....	37

4.6	ANÁLISE DO MEV.....	39
5	DISCUSSÃO.....	41
6	CONCLUSÃO.....	46
	REFERÊNCIAS	47
	ANEXO A – Aprovação do Projeto no Comitê de Ética	57
	ANEXO B: Resumo apresentado no Simpósio de Engenharia Biomédica do Vale do Paraíba	62

1 INTRODUÇÃO

A membrana amniótica (MA) é a parte interna das membranas fetais, a parte que fica mais próxima do feto e produz o líquido amniótico, e que é descartada após o parto juntamente com a placenta. Ela é uma membrana avascular, formada por um epitélio cúbico simples, uma membrana basal espessa, que tem em sua constituição o colágeno de tipo IV, e uma matriz estromal predomínio de colágeno tipo I, elastina, laminina, fibronectina e proteoglicanas, entre outras moléculas (FAIRBANKS *et al.*, 2003; MALHOTRA; JAIN, 2014).

A MA apresenta diversas propriedades, podendo ser aplicada em ferimentos, onde apresenta ação cicatrizante, anti-inflamatória (GONÇALVES; SANT'ANNA, 2021; ROZIN; CARDOSO; GUIMARÃES, 2020). Sant'Anna *et al.* (2016) demonstraram a ação anti-fibrotica em fibrose biliar em ratos. Vários estudos mostram que a Membrana Amniótica previne a apoptose epitelial (DUA *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2008, MALHOTRA; JAIN, 2014) e que também proporciona o crescimento de células epiteliais e a sua diferenciação (UHLIG *et al.*, 2015). Além dessas propriedades, a Membrana Amniótica possui outras propriedades, como a ação antimicrobiana, impedindo o crescimento e proliferação de novos microrganismos no local, regula a ação imunológica, tem ação anti-inflamatória, impede a criação de novos vasos sanguíneos e não tem a capacidade de criar tumores (SAMPAIO, 2017; MURRI *et al.*, 2018). Devidos às suas propriedades benéficas a MA tem sido aplicada em queimaduras, supressão de tumores, úlceras córneas, penfigóide cicatricial e na cicatrizações de feridas (MOURA *et al.*, 2017, UHLIG *et al.*, 2015, FAITA *et al.*, 2016).

Por possuir tantas aplicações, é necessário que a Membrana Amniótica esteja livre de contaminações, uma vez que a forma de coleta causa contaminação na membrana, com 61% das amostras coletadas em um banco de tecidos estando contaminadas sendo o microrganismo de maior prevalência o *Staphylococcus aureus*, onde a maior parte das contaminações foi registrada na hora da coleta, chegando a uma conclusão de que, os profissionais responsáveis pela coleta devem receber um treinamento adequado para evitar a contaminação (AGHAYAN *et al.*, 2013).

Sendo a MA um biomaterial que pode apresentar contaminação (JUNG *et al.*, 2021; KHOKHAR *et al.*, 2001; MARSIT *et al.*, 2019), e o aumento das bactérias resistentes a tratamentos convencionais, decorrentes do uso indiscriminado de

antibióticos e a redução no número de pesquisas para novos antibióticos (KOCH *et al.*, 2021; OLIVEIRA *et al.*, 2020), se tem a necessidade de utilizar técnicas para fazer a esterilização da MA.

Para fazer a esterilização da MA pode utilizar métodos químicos e físicos como a uso de antibióticos, radiação gama e ácido peracético. A radiação gama é uma das técnicas mais utilizadas para fazer a esterilização (FARRINGTON *et al.*, 2002; GHOLIPOURMALEKABADI *et al.*, 2020; MOREJÓN-ALONSO *et al.*, 2007), mas por ser uma técnica que utiliza radiação, pode causar destruição e desnaturalização das camadas da MA (RIAU *et al.*, 2010; VON VERSEN-HÖYNCK *et al.*, 2004). Uma técnica alternativa a ser estudada para a esterilização da Membrana Amniótica é a água ativada por plasma.

O plasma pode ser definido como um gás totalmente ou parcialmente ionizado com um número igual de partículas com cargas positivas e negativas (SHINTANI *et al.*, 2010). Os plasmas são divididos em duas categorias: Plasma Térmico e Plasma Não Térmico. O primeiro tipo basicamente ocorre quando os níveis de energia dos elétrons e das espécies reativas são próximos, esse equilíbrio Termodinâmico entre os elétrons e as espécies reativas gera um plasma quente o que confere o nome térmico a esse tipo de plasma, enquanto o segundo se configura em sistemas de baixa pressão, onde a energia média dos elétrons é muito maior do que aquela das espécies reativas, essa falta de equilíbrio Termodinâmico faz com que o plasma gerado seja frio dando o nome não térmico a esse plasma (DE AVILLEZ; ANELA; BREITSCHWERDT, 2018; GUPTA; AYAN, 2019).

Nos últimos anos, os estudos demonstraram um bom efeito antimicrobiano da água tratada por plasma sendo a água ativada por plasma (PAW) uma de suas variações. Seja em bactérias, em leveduras ou outros microrganismos, devido ao fato de possuir um pH baixo, variando de 0 a 7, ocorrendo a produção de peróxido de hidrogênio, nitrato e nitrito. Sabe-se também que soluções aquosas que contém íons nitrito (ácido nitroso) com pH menor que 4 são soluções antimicrobianas. A PAW é uma água tratada com plasma com o objetivo do tratamento e dar uma nova função para a água, e, por consequência, possui várias aplicabilidades, sendo elas: (i) o tratamento de células cancerígenas (XU *et al.* 2018), (ii) a esterilização de superfícies e de líquidos, também podendo ser aplicada na (iii) área da agricultura, promovendo a diminuição do tempo germinativo das sementes, estimulando seu crescimento e

atuando como fertilizante natural (KAMGANG-YOUBI *et al.*, 2009). Yong *et al.* (2018) verificaram que a PAW possui ação antimicrobiana e um potencial esterilizante, além de desfrutar de uma capacidade que preserva alimentos através da eliminação de bactérias, fazendo, por fim, um processo denominado *curing*, traduzido como “curar”.

Considerando o panorama de aplicações biomédicas do plasma e da água ativada por plasma (KAUSHIK *et al.*, 2018), a hipótese deste estudo é que esta água possa ser aplicada sobre membranas amnióticas promovendo sua desinfecção e/ou esterilização, assim como potencializar o efeito da membrana amniótica.

1.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo desse trabalho é analisar a ação antimicrobiana da água ativada por plasma (PAW) em Membrana Amniótica (MA) contaminada com *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*, a fim de possibilitar seu uso em diferentes aplicações.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar e comparar a ação antimicrobiana da água em temperatura ambiente e refrigerada ativadas por plasma;
- Avaliar a alteração de pH após a ativação da água;
- Avaliar qual microrganismo mostrou maior susceptibilidade a ação da PAW por meio de uma maior redução de UFC/ml e viabilidade celular após a exposição;
- Analisar o efeito antimicrobiano da água ativada por plasma em Membrana Amniótica contaminada;
- Comparar o efeito da água ativada por plasma com o efeito antimicrobiano da Membrana Amniótica associada a água ativada por plasma.

1.3 JUSTIFICATIVA

Para usar a MA nos procedimentos clínicos, é necessário ela estar livre de contaminações, assim como utilizar uma técnica de esterilização que não cause danos

a sua integridade estrutural, o que é imprescindível para a manutenção das suas propriedades biológicas e mecânicas. O plasma não térmico pode ser considerado uma tecnologia inovadora na eliminação de microrganismos em vários tipos de materiais, biológicos e não biológicos, além de ser uma tecnologia considerada limpa (GARCIA; BITTENCOURT, 2010). Então a busca por técnicas alternativas para a desinfecção e/ou esterilização da MA, como a água ativada por plasma é de grande interesse, considerando as propriedades antimicrobianas e a possibilidade de ser aplicada em tecidos biológicos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Neste capítulo será apresentado o levantamento bibliográfico realizado sobre os principais assuntos discutidos neste trabalho: Membrana Amniótica, plasma, água ativada por plasma, microrganismos.

2.1 MEMBRANA AMNIÓTICA

A MA é a camada mais interna da placenta, que fica mais próxima ao feto, possuindo espessura que varia de 0,02 a 0,05mm. Ela é uma membrana que não possui vascularização, músculos ou nervos, sendo sua parte externa conectada ao cório e a parte mais interna banhada no líquido amniótico (FERENCZY; SOUZA, 2020). A camada epitelial é constituída por células epiteliais cuboides, que ficam em contato com a membrana basal, permitindo que tenha um transporte de macromoléculas entre o espaço luminal e a membrana basal (DUA *et al.*, 2004; DUA; AZUARA-BLANCO, 1999; NEUMANN, 2014).

A MA é obtida a partir das placentas provenientes de cesáreas ou partos normais, porém vários pesquisadores tem preferência por membranas provenientes de partos cesáreas, pois diminui o risco de contaminação na hora da colheita (FERENCZY; SOUZA, 2020; GANATRA; DURRANI, 1996; PAGGIARO *et al.*, 2010). Para que o uso desse material seja possível, é necessário que a doadora tenha exames sorológicos negativos para HIV-1, Hepatite B, Hepatite C, sífilis, citomegalovírus e tuberculose (PENA *et al.*, 2007). Depois da colheita, a placenta é levada ao laboratório, onde a MA é separada do cório e processada por meio de lavagens com salina estéril, antibióticos e antifúngicos (RIAU *et al.*, 2010).

A MA é composta por uma camada epitelial e uma membrana basal, que além das moléculas de colágeno I, III, IV, V e VII, também é composta de outras moléculas, como a elastina, que confere elasticidade para a MA, também possui a laminina e fibronectina que promovem a adesão celular e os proteoglicanos que é a principal molécula da membrana basal (DUA *et al.*, 2004; MURRI *et al.*, 2018; PEREIRA *et al.*, 2005; SANGWAN *et al.*, 2007). Todas essas macromoléculas desempenham a função de regulação da proliferação celular, que promove o crescimento e remodelação tecidual (SAMPAIO, 2017; NASEER *et al.*, 2018). A camada mesenquimal ou estroma

da membrana se divide em camada compacta, fibroblástica e esponjosa a camada compacta é composta por fibronectina e colágeno I, III, V e VI, onde é responsável por dar a forma a MA, a camada fibroblástica apresentam células mesenquimais, que são responsáveis pela secreção dos colágenos, e com potencial de células tronco pluripotentes, já a camada esponjosa fica em contato com o cório, e é constituída por colágeno do tipo III, proteoglicanas e glicoproteínas, dando a ela a sua característica esponjosa (LEAL-MARIN *et al.*, 2021; NIKNEJAD *et al.*, 2008; ROZIN; CARDOSO; GUIMARÃES, 2020).

Por causa das suas propriedades regenerativas, anti-inflamatórias, antitumorais, antifibróticas, antimicrobianas (MAO *et al.*, 2017), antiparasitárias e pela sua baixa imunogenicidade a MA é utilizada na medicina e engenharia tecidual (SAMPAIO, 2017; FÉNELON *et al.*, 2021; MALHOTRA; JAIN, 2014), por causa da sua semelhança estrutural com as células tronco (NEJAD *et al.*, 2021). A MA é utilizada em diversos procedimentos médicos, como em queimaduras (MOURA *et al.*, 2017), supressão de tumores (JAFARI *et al.*, 2021), úlceras córneas (UHLIG *et al.*, 2015), penfigóide cicatricial e na cicatrizações de feridas (FAITA *et al.*, 2016). Vários estudos mostram que a Membrana Amniótica previne a apoptose epitelial (DUA *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2008; JAFARI *et al.*, 2021; YOSHIDA *et al.*, 2021; MALHOTRA; JAIN, 2014) e que também proporciona o crescimento de células epiteliais e a sua diferenciação (RAMUTA; KREFT, 2018; WASSMER; BERISHVILI, 2020). Além dessas propriedades, a MA possui outras propriedades, como a ação antimicrobiana, impedindo o crescimento e proliferação de novos microrganismos no local aplicado, regula a ação imunológica, impede a criação de novos vasos sanguíneos e não tem a capacidade de gerar tumores (SAMPAIO, 2017).

A ação antimicrobiana da MA se dá por meio da presença de peptídeos encontrados em seu epitélio, como as beta-defensinas 1-3, a proteína SLPI e a elafina (HEIDARZADEH *et al.*, 2018; MUNADZIROH *et al.*, 2022). Os efeitos antimicrobianos da MA foram estudados contra diversas espécies de microrganismos e obtendo bons resultados em *Escherichia coli*, *Streptococcus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (HEIDARZADEH *et al.*, 2018; RAMUTA; STARČIČ ERJAVEC; KREFT, 2020; ŠKET *et al.*, 2019).

Embora a MA seja estéril, no processo de colheita ela pode ser contaminada, seja pelo parto vaginal como pelo parto cesárea (LEAL-MARIN *et al.*, 2021; MARSIT

et al., 2019). Os principais microrganismos que infectam a MA durante a colheita são os *Staphylococcus* coagulase negativo *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus viridans*, *Enterobacter sp.*, *Neisseria sp.*, *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa* (HE *et al.*, 2020; JUNG *et al.*, 2021).

Com relação à forma de preservação, para tratamentos clínicos, a MA pode ser utilizada tanto na forma fresca como na forma preservada, e para isso ela precisa estar livre de qualquer contaminação, por esse motivo ela passa por procedimentos para garantir a sua esterilização (GHOLIPOURMALEKABADI *et al.*, 2020). Os principais métodos utilizados para a esterilização da MA são a radiação Gama e o Ácido Peracético (FARRINGTON *et al.*, 2002; HODDE; HILES, 2002). Quando se aplica a radiação gama se usa uma dose de 25kGy a 50kGy, porem alguns estudos demonstram que a radiação gama em altas concentrações pode causar destruição e degradação de todas as camadas da MA (VON VERSEN-HÖYNCK *et al.*, 2004), por isso utiliza-se uma menor dose de 25kGy (SINGH *et al.*, 2007). O Ácido Peracético apresenta propriedades antifúngicas, bactericida e antivirais (BALDRY, 1983). Um tratamento alternativo utilizado é com o uso de antibióticos e antifúngicos como a gentamicina, imipenem, nistatina, polimixina B e vancomicina, porem eles podem acabar sendo tóxicos para as células da MA (SHORTT *et al.*, 2009). Segundo Kaushik *et al.* (2018) o Plasma tem a capacidade de ser utilizado como uma técnica alternativa devido as suas propriedades antimicrobianas e sua utilização em tecidos biológicos.

2.2 PLASMA

Na ciência física, além dos estados clássicos da matéria: sólido, líquido e gasoso, existe um outro estado, que tem o nome de plasma. Estima-se que mais de 99% do universo visível se apresenta no estado de plasma (DE GEYTER; MORENT, 2012; SHINTANI *et al.*, 2010). De um modo geral, o plasma pode ser definido como, um gás total ou parcialmente ionizado, ou seja, um de elétron não está ligado a uma molécula, se convertendo em íons que ficam carregados positivamente (FRIDMAN; FRIEDMAN, 2013), possuindo um número igual de partículas carregadas positiva e negativamente (SHINTANI *et al.*, 2010). Sendo assim o plasma é um gás de partículas livres e partículas neutras que se movem de maneira aleatória (PESSOA, 2009).

Os plasmas podem ser classificados de acordo com as condições de trabalho: quando os níveis de energia dos elétrons e das espécies reativas são próximos, o plasma resultante é chamado de “plasma térmico”, altamente ionizado e geralmente gerado à alta pressão. Em sistemas de baixa pressão, a energia média dos elétrons é muito maior do que das espécies reativas e o plasma resultante é chamado “plasma-frio” ou “não-térmico”(MOREAU *et al.*, 2005).

Plasmas não-térmicos são gases ionizados gerados sob baixa pressão. A baixa pressão permite um percurso livre de colisões entre os elétrons acelerados e as partículas neutras e íons que estão próximas à temperatura ambiente, o que garante a exposição geral a temperaturas baixas (SHINTANI *et al.*, 2010). Por causa das suas vantagens técnicas e econômicas, os plasmas não-térmicos tem sido cada vez mais usados para a esterilização, purificação de água, medicina e agricultura (MILDAZIENE *et al.*, 2022). Os plasmas não-térmicos são geralmente usados na medicina para o tratamento de tecidos. Além das aplicações terapêuticas, também é usado para modificação de superfícies e descontaminação biológica (BRANÝ *et al.*, 2020).

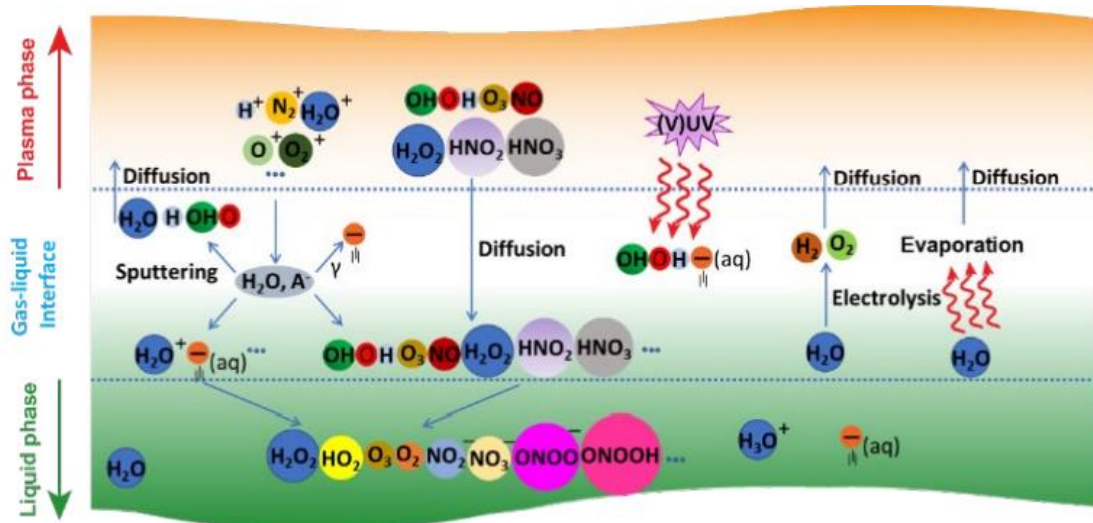
O plasma não-térmico reduz a viabilidade das bactérias pela formação de radiação UV, criação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e criação de corrente elétrica. As espécies reativas são formadas pela interação do plasma com o ar e pela interação do plasma com líquido. Os radicais hidroxila e óxidos nítricos são geralmente formados pela interação do plasma com o ar, os nitratos, nitritos e peróxido de hidrogênio são espécies reativas de vida longa e são formados pelas interações do plasma com líquidos (BRUGGEMAN *et al.*, 2016).

2.2.1 Água ativada por plasma (PAW)

A PAW é uma água onde o plasma é aplicado procurando funcionalizá-la, e, por consequência, possui várias aplicabilidades, sendo elas: (i) o tratamento de células cancerígenas (XU *et al.*, 2018), (ii) a descontaminação de superfícies e de líquidos, também podendo ser aplicada na (iii) área da agricultura, com o objetivo de diminuir do tempo de germinação das sementes e estender o tempo de prateleira de frutas e legumes (AL-SHARIFY *et al.*, 2020), com a vantagem de não causar alterações na coloração e aspectos visuais, quando comparada com a aplicação direta do plasma (KAMGANG-YOUBI *et al.*, 2009). Nos últimos anos, estudos demonstraram que a PAW

tem um bom desempenho antimicrobiano, devido ao fato de possuir um pH baixo, variando de 0 a 7 e a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), como radical hidroxila (OH), oxigênio (O), ozônio (O₃) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e de nitrogênio (ERN), como o peroxinitrito, nitrato (NO₃) e nitrito (NO₂) (Figura 1), uma vez que soluções aquosas que contém íons nitrito (ácido nitroso) com pH menor que 4 são sabidamente, soluções antimicrobianas (KONG *et al.*, 2009; LAURITA *et al.*, 2015).

Figura 1 - Mecanismo de transferência de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.



Fonte: Zhou *et al.*, (2018).

As espécies reativas podem alterar os processos químicos da membrana celular ou a permeabilidade da célula, já que pode produzir efeitos nocivos ao interagir com biomoléculas, especialmente com DNA, causando quebras de fitas e possíveis danos que podem levar a mutação e morte celular (VLAD *et al.*, 2019). Estudos comprovam que as espécies reativas geradas pelo plasma têm a capacidade de permanecer no líquido por um longo período de tempo se armazenados em condições adequadas e a duração e quantidade de espécies reativas na PAW estão diretamente relacionadas ao tempo de tratamento ao qual a água é submetida (TRAYLOR *et al.*, 2011).

As concentrações de espécies reativas na água estão relacionadas com o tipo de plasma utilizado na ativação da água, o tempo de ativação e na temperatura inicial da água, onde diferentes sistemas de plasma e gases utilizados para a geração do plasma vão gerar diferentes quantidades de espécies reativas (THIRUMDAS *et al.*, 2018; ZHOU *et al.*, 2020), quanto maior o tempo de ativação da água maior vai ser a

concentração de espécies reativas geradas (OH *et al.*, 2018; ZHAO *et al.*, 2021b) e a temperatura inicial da água utilizada para a ativação influencia na quantidade de espécies reativas encontradas, pois de acordo com a Lei de Henry, a solubilidade de gases na água é inversamente proporcional a temperatura, ou seja quanto maior a temperatura da água menor a solubilidade dos gases (PANG *et al.*, 2022).

A PAW possui várias aplicações, porém uma das principais é a inativação de microrganismos, como *Escherichia coli* (XIANG *et al.*, 2019), *Salmonella*. (LIN *et al.*, 2019), *Klebsiella pneumoniae* (MUHAMMAD *et al.*, 2019), *Staphylococcus aureus* (SHEN *et al.*, 2016; XU *et al.*, 2018).

2.3 MICRORGANISMOS

Existem microrganismo de importância médica com grande prevalência nas contaminações de MA e que sofrem a ação da PAW, como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*.

2.3.1 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é uma bactéria pertencente à família *Enterobacteriaceae*, com formato de bacilo e Gram-negativa, onde tem a capacidade de se reproduzir em um ambiente com ar e ambientes sem ar, sendo assim uma bactéria anaeróbica facultativa. Pode ser encontrada na microbiota intestinal de seres humanos e animais, no solo e na água (ERCAN *et al.* 2018, SOUZA *et al.* 2016).

Embora a *Escherichia coli* seja uma bactéria comensal, ou seja, vive em uma situação simbiótica e harmônica com nosso organismo, se ocorrer um desequilíbrio do nosso sistema imune ou se houver migração de sítio, ela pode se tornar uma bactéria patogênica, causando várias doenças, como: infecções urinárias, diarreias, colite, meningite e sepse (SOUZA *et al.* 2016).

A *E. coli* é uma das bactérias mais prevalentes encontradas em hospitais (CARNEIRO *et al.*, 2008; NOGUEIRA *et al.*, 2009), tendo a capacidade de adquirir atributos de virulência e se tornando patogênicas. Essas bactérias podem ser divididas em: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) que produz toxinas indutoras da liberação dos fluidos intestinais; *E. coli* enteropatogênica (EPEC), causa infecção

frequente induzindo diarreia infantil (SOUZA *et al.*, 2016); *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) que invade a célula do intestino se multiplicando dentro e causam destruição das células do cólon intestinal (FERRASSO *et al.*, 2014); *E. coli* enteroagregativa (EAEC), a qual forma agregados bacterianos que diminuem a absorção de nutrientes pelo intestino causando assim diarreia mucoide (ANDRADE; HAAPALAINEN; FAGUNDES-NETO, 2011) e a *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) que é a variante mais grave, pois ao liberar a toxina Shiga causa lesões das células epiteliais do intestino e rins, e ao se internalizar nas células, se conectam ao RNAr (ácido ribonucleico ribossômico) interrompendo a síntese proteica e destruindo as vilosidades intestinais, diminuindo assim a absorção de nutrientes. Também aumenta a perda de líquido, ao entrar em contato com o glomérulo renal, faz com que diminua a capacidade de filtração glomerular causando a síndrome hemolítica urêmica (NGUYEN; PERANDIO, 2012; ROSA; BARROS; SANTOS, 2016).

2.3.2 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae é um bastonete Gram-negativo e anaeróbico facultativo, porém o seu crescimento é melhor em condições aeróbicas, possui colônias grandes e imóveis, o tamanho da colônia se dá pela presença da capsula mucóide polissacarídica, que protege contra a fagocitose e auxilia em sua aderência (UMED, 2002; VALENZUELA-VALDERRAMA; GONZÁLEZ; PALAVECINO, 2019).

Os principais sintomas de infecção com *Klebsiella pneumoniae* são febres, taquicardia, problemas de respiração, hipotensão, inchaço e falência múltipla de órgãos. O gênero *Klebsiella* faz parte da família *Enterobacteriaceae* e pode ser encontrado no meio ambiente e nas mucosas de seres humanos e animais. (EFFAH *et al.*, 2020; KURATOMI, 2008).

A *Klebsiella pneumoniae* é uma bactéria frequentemente encontrada em infecções hospitalares na ala de terapia intensiva (UTI), principalmente a *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC), que é uma bactéria que possui resistência aos antibióticos carbapenêmicos, além de inativar a ação de penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos (DIENSTMANN *et al.*, 2010; HUSSEIN *et al.*, 2022; SMITH MOLAND, 2003; TSIOUTIS; EICHEL; MUTTERS, 2021), e esses medicamentos são cerca de 95% de todos os medicamentos disponíveis (CASTRO, 2000; PLAZAK;

TAMMA; HEIL, 2018; SPAZIANTE *et al.*, 2020). Um fator que complica ainda mais a sua infecção é que normalmente as pessoas internadas já possuem alguma doença base, como pneumonia e infecções por outros microrganismos, estando assim com a imunidade baixa (SOUSA; RAMALHO; CAMARGO, 2020; SOUSA *et al.*, 2007).

2.3.3 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é um coco Gram-positivo, pertencente a microbiota humana, é uma bactéria oportunística que ataca o corpo humano, e anaeróbica facultativa que possui um melhor crescimento em situações aeróbicas do que anaeróbicas (SANTOS *et al.*, 2007). É uma bactéria de um grande interesse médico por ser um agente etiológico de infecções nosocomiais e comunitárias (ALMEIDA *et al.*, 2016).

Mesmo fazendo parte da nossa microbiota o *Staphylococcus aureus* é uma bactéria oportunista, causando doenças quando se tem uma migração de sítio ou imunidade baixa, os principais sintomas são: inchaço da pele, abscessos, bolhas, febre, dor muscular, náusea, dor abdominal, diarreia e vômito (POLLITT *et al.*, 2018).

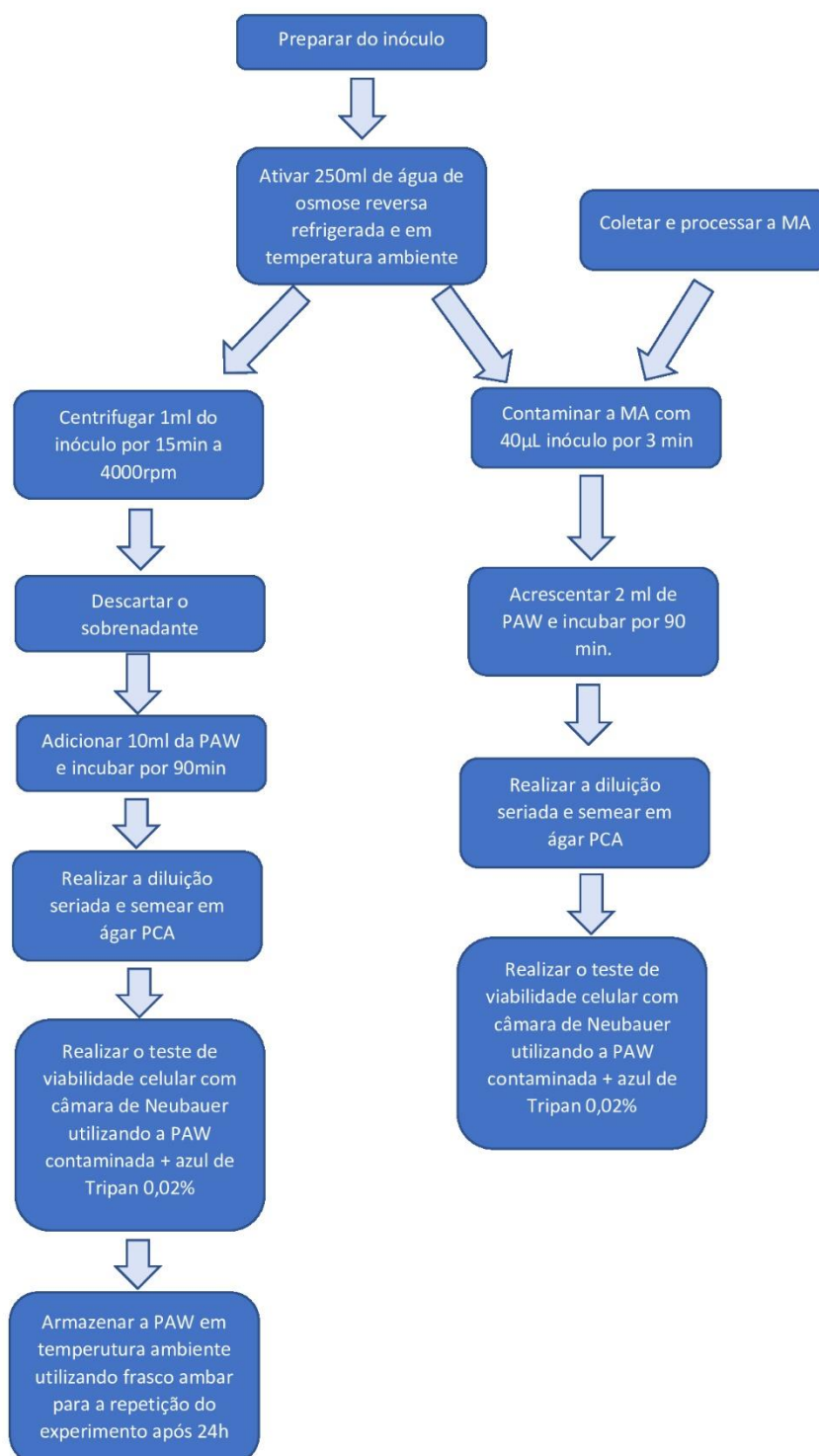
Uma importante variante do *Staphylococcus aureus* é a MRSA (*Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina), que é resistente a todos os medicamentos Beta-lactâmicos, antibióticos muito utilizados em infecções por *S. aureus*. Estes antibióticos inibem a síntese da barreira celular, causando assim a lise da bactéria, (BARBERATO-FILHO *et al.*, 2020; GELATTI *et al.*, 2009). Ela acomete principalmente pessoas internadas em hospitais, porém recentemente há casos de infecções encontradas na comunidade, algo preocupante já que é uma bactéria de difícil identificação e que possui grande resistência a antibióticos (GELATTI *et al.*, 2009). As principais estratégias utilizadas para a sua prevenção é identificação de pacientes assintomáticos, controle da utilização de antimicrobianos e a lavagem de mãos e superfícies em que os profissionais da saúde e pacientes entram em contato (ANDRADE *et al.*, 2021; CALFEE *et al.*, 2008).

3 METODOLOGIA

O presente estudo foi devidamente submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Vale do Paraíba (parecer nº 5.277.784), conforme o Anexo A.

O trabalho foi realizado em duas etapas: 1) Avaliação da viabilidade celular e da contagem de UFC/mL da PAW ativada em temperatura ambiente (27 °C) e da PAW ativada refrigerada (4,0 °C); 2) Avaliação da viabilidade celular e da contagem de UFC/mL da PAW ativada em temperatura ambiente (27 °C) associada a MA e da PAW ativada refrigerada (4,0 °C) associada a MA. Todo o experimento foi realizado em triplicata. O procedimento realizado durante o trabalho pode ser observado de forma simplificada na figura 2.

Figura 2 - Sequência dos procedimentos da metodologia



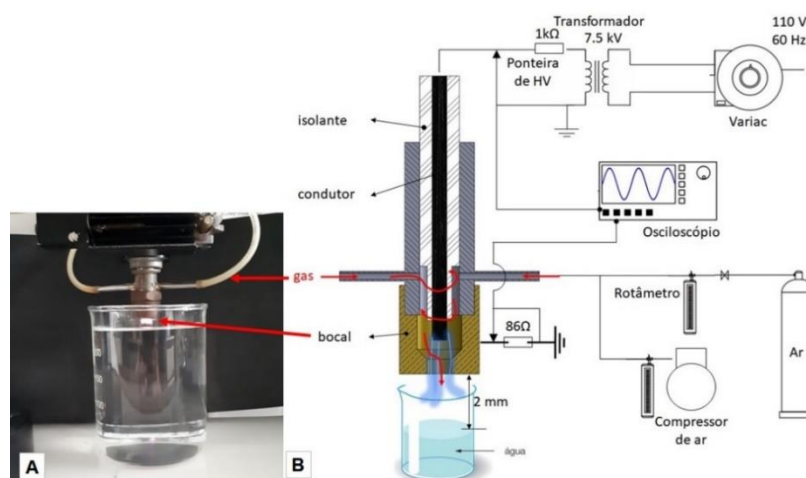
Fonte: Autor

3.1 ATIVAÇÃO DA ÁGUA

As amostras de água de osmose reversa (OR) foram obtidas utilizando um sistema purificador do modelo OS 10 LXE, pertencente à marca Gehaka, onde 250 ml de água de osmose reversa (resistividade > 1,0 M Ω -cm) foi refrigerada a 4.0 °C em geladeira do modelo Consul CRD37 e depois ativada, enquanto outra amostra de 250 ml foi armazenada em temperatura ambiente para ser ativada.

Para a ativação da água, foi utilizado um sistema de plasma do tipo *gliding arc* (Figura 3), com potência de 18,4 W e 60 Hz de frequência, utilizando 6 L/min de Argônio + 4 L/min de ar comprimido para geração da descarga. A distância utilizada entre a saída do plasma e a amostra (superfície da água) foi de 2 mm com um tempo de ativação de 30 minutos. As águas tiveram o seu pH medido antes e após a sua ativação utilizando o pHmetro PG1800 da Gehaka.

Figura 3 - Arranjo experimental: (A) Equipamento em funcionamento e (B) Montagem experimental.



Fonte: Adaptado de Doria (2019).

3.2 AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DA PAW SOBRE OS MICRORGANISMOS

Um inóculo de cepa padrão de *E. coli* ATCC® (25922), *S. aureus* ATCC® (6538) e *K. pneumoniae* ATCC® (13883) de 10⁸ UFC/mL foi preparado em caldo BHI (Brain Heart Infusion) da fabricante KASVI e incubado por 24h. Após esse período o inóculo foi centrifugado a 4000 rpm por 15 min e o pellet ressuspendido com 10 mL de PAW e incubado por 90 minutos (agitado em vórtex a cada 20 min). Amostras

controle foram incubadas em águas sem o tratamento. Após a incubação de 90 minutos do microrganismo na PAW, foi realizado uma diluição celular 1:10⁷ para semear em ágar PCA (Plate Counting Agar) da marca KASVI.

O restante da PAW foi armazenado em frascos ambares, onde experimento foi repetido 24h e 48h após a ativação da água, onde as partes repetidas foram a da incubação do inóculo na PAW, semeadura e avaliação da viabilidade celular.

3.3 COLHEITA DA PLACENTA

Foram utilizadas três placentas humanas com um período gestacional de 37 semanas ou superior, colhidas de cesarianas eletivas de pacientes com gestação normal, no centro cirúrgico obstétrico do Maternidade Santa Casa de São José dos Campos, após consentimento prévio da parturiente (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado) e após todos os exames negativos para HIV -1 e 2, hepatite B e C, sífilis e COVID-19.

3.4 PROCEDIMENTOS COM A MEMBRANA AMNIÓTICA

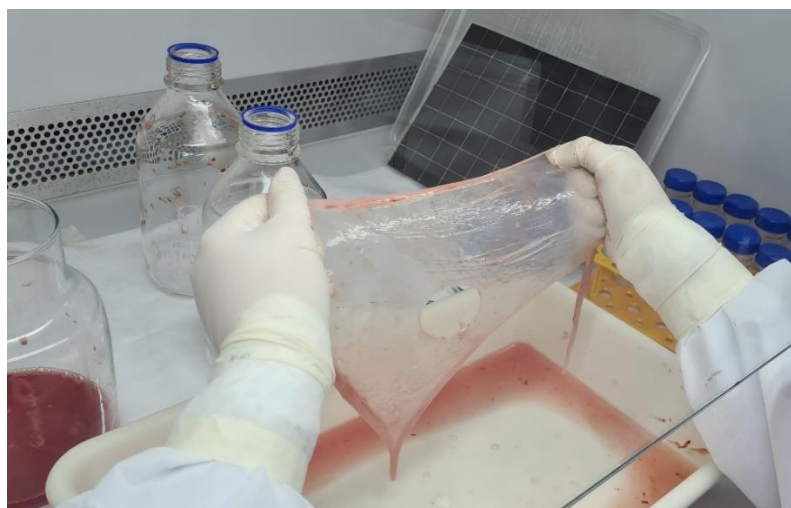
As Placentas foram coletadas na Maternidade da Santa Casa, e levadas para o Laboratório de Histologia e Terapia Regenerativa para serem processadas. O processo foi realizado no fluxo vertical, onde a Membrana Amniótica foi retirada do cório, cortando primeiro o local do cordão umbilical para facilitar a retirada (Figura 4). Após a separação manual da MA do cório, ela foi lavada extensivamente com solução fisiológica contendo 100 µg/ml de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e anfotericina B (LIFE TECH BRASIL COM IND PROD BIO LTDA) (Figura 5). Após o processamento da MA, foram cortados 12 fragmentos por placenta de 1,5 cm de diâmetro da região anatômica RA ('reflected amnion' – amnion da membrana fetal extraplacentária) utilizando um cortador circular (Figura 6) e posteriormente armazenados pelo método de criopreservação, em meio DMEM/glicerol 1:1 a -80 °C por 7 dias (DEMEM da marcaSigma-Aldrich Brasil Ltda) (Figura 7).

Figura 4 – Separação manual da MA. Seta laranja é o cordão umbilical e a seta preta é o cório.



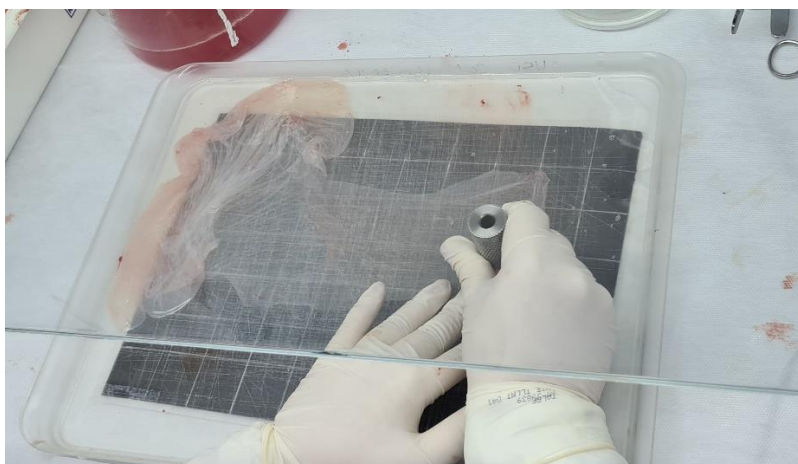
Fonte: Autor

Figura 5 – Processamento da M A após ser separada do cório e lavada com solução de antifúngico e antibióticos. O círculo redondo, é o espaço do cordão umbilical removido.



Fonte: Autor

Figura 6 - Cortador circular sendo utilizado na MA para pegar os fragmentos.



Fonte: Autor

Figura 7 - Amostras de MA, já fragmentadas na dimensão adequada, em meio DMEN e glicerol 1:1, no freezer - 80 °C.



Fonte: Autor

Após a criopreservação, os fragmentos descongelados foram divididos em quatro grupos para cada microrganismo estudado: Controle positivo, controle negativo, grupo tratado com a temperatura ambiente e grupo tratado refrigerado. Cada fragmento de MA foi colocado em tubos Falcon de 15 ml, e contaminados com 40 μ l de um inóculo com 10^6 UFC/ml das bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae* e deixadas em contato com o inóculo por 3 minutos para garantir a aderência das células bacterianas.

O tratamento das amostras de MA contaminadas foi realizado adicionando 2 ml de PAW (refrigerada ou à temperatura ambiente) imediatamente após a sua ativação

em frascos cônicos estéreis e incubados por 90 min. As amostras do grupo controle foram incubadas em água sem ativação. Todas as amostras foram semeadas em ágar PCA (Plate Counting Agar), após diluição seriada 1:10⁴ imediatamente após o tratamento, e incubadas a 37°C por 24h. Em seguida foi realizado a contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFCs).

3.5 VIABILIDADE CELULAR

Após a incubação dos microrganismos na PAW, foi preparada uma solução 1:1 da suspensão bacteriana e azul de Tripán 2% e incubada por 15 min, após esse período, um volume de 10 µl foi analisado em Câmara de Neubauer® para quantificação da viabilidade celular fazendo a contagem nos quatro quadrantes. Por esta técnica, as células translúcidas são consideradas viáveis e as coradas de azul são consideradas inviáveis. O cálculo utilizado para a determinação do percentual de viabilidade celular foi:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{n.º de células viáveis nos 4 quadrantes} \times 100}{\text{total de células nos 4 quadrantes}}$$

3.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA POR VARREDURA (MEV)

A análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi realizada utilizando o equipamento modelo EVO MA 10 (Zeiss), localizado na Central Analítica Multiusuário do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba. Para a metalização com ouro, foi colocando 70 µl da PAW contaminada em lamínulas de vidro, e ao secarem estas foram colocadas em um suporte ou porta amostra com o auxílio de fitas de carbono e inseridos na metalizadora da Emitech modelo K550X.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a realização da análise estatística o método ANOVA foi empregado, para avaliar a presença de diferenças significativas entre os grupos, quando comparado com o grupo controle, com a finalidade de afastar a possibilidade de que os resultados

sejam frutos de mera casualidade. Foi utilizado o software Origin® 2015 com um $\alpha = 0,05$.

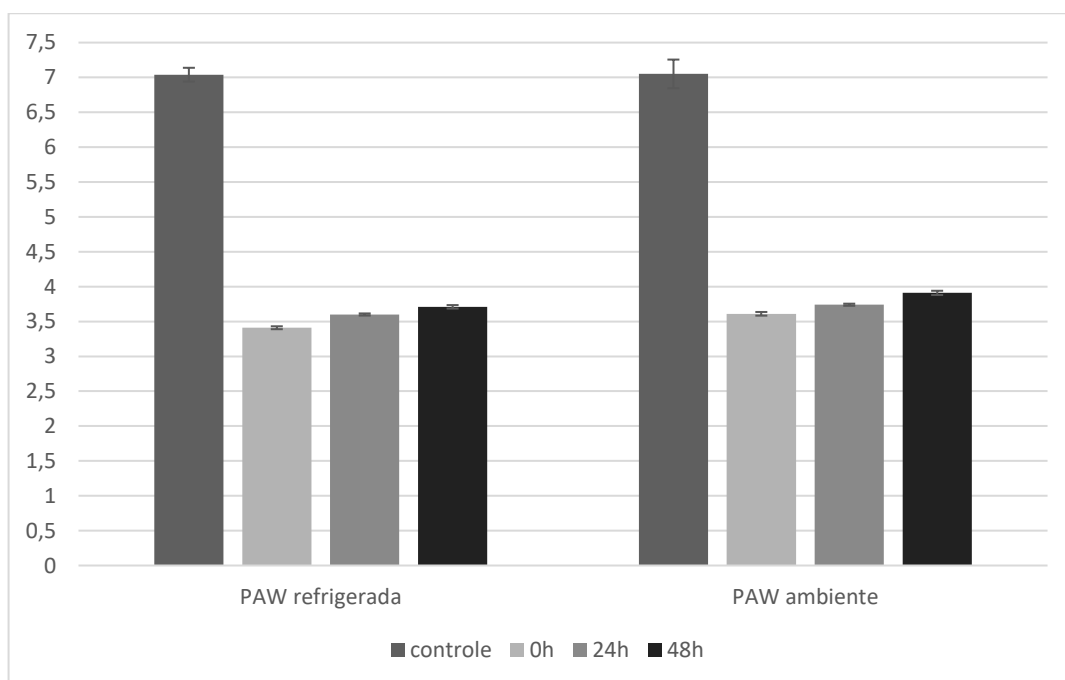
4 RESULTADOS

Após a realização da metodologia descrita no item 3, os resultados obtidos estão descritos abaixo.

4.1 ANÁLISE DO PH

Na Figura 8, observa-se que houve uma diminuição do pH após a ativação, e que ao decorrer do período estudado o pH teve um leve aumento. Dentre as PAW estudadas a PAW refrigerada apresentou uma maior redução do pH, baixando de 7.04 para 3.41 imediatamente após a ativação em termos de valor médio, aumentando para 3,60 e 3,71 após 24h e 48h respectivamente. Já a PAW em temperatura ambiente apresentou uma redução inicial do pH de 7.05 para 3.61, aumentando para 3.69 e 3.89 após 24h e 48h respectivamente.

Figura 8 - Análise do pH ao longo do período estudado.



Fonte: Autor

Além de observar a alteração de pH após a ativação da PAW, também foi observado a mudança de temperatura, sendo que a água em temperatura ambiente

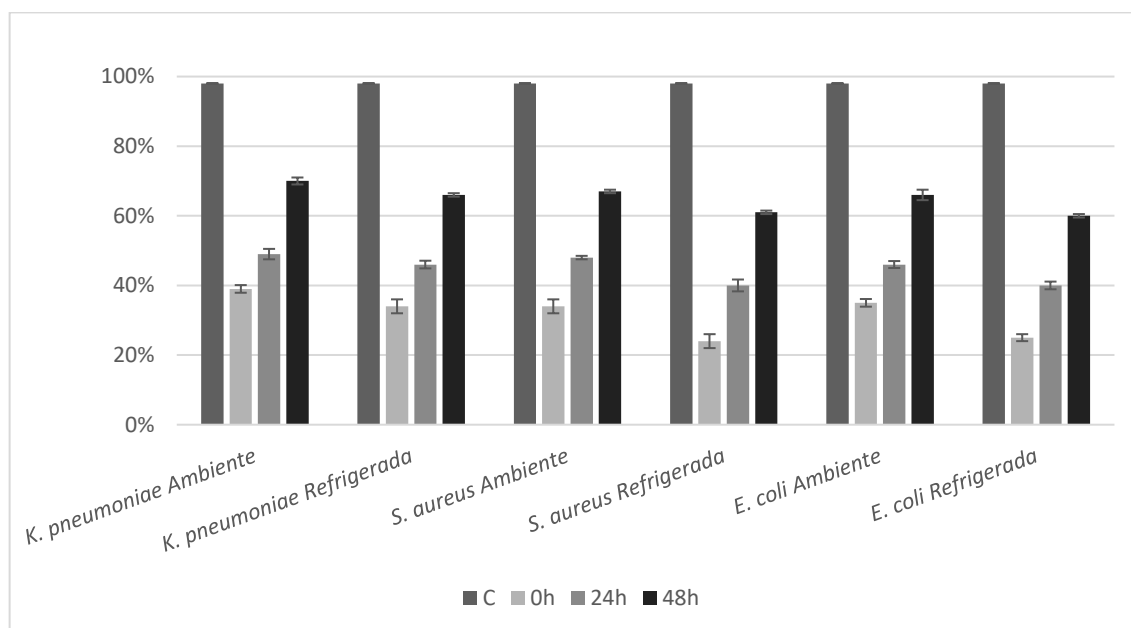
estava a 27.3 °C antes da ativação e 53.5 °C após a ativação, já a água refrigerada apresentava uma temperatura de 4.1 °C e após a ativação ficou em 27.6 °C.

4.2 VIABILIDADE CELULAR DOS GRUPOS DE MICRORGANISMOS SUBMETIDOS À ÁGUA ATIVADA POR PLASMA

Os resultados obtidos demonstraram que a PAW refrigerada, quando comparada com a PAW em temperatura ambiente, possui uma melhor ação antimicrobiana sobre todas as cepas padrão ATCC® estudadas.

Para ambas as águas a *Klebsiella pneumoniae* apresentou a menor redução da viabilidade celular dentre as bactérias estudadas, possuindo uma viabilidade celular inicial de 39% para a PAW em temperatura ambiente e aumentando para 49% após 24h do tratamento e 70% após 48h, já na viabilidade celular da PAW refrigerada houve uma maior redução da viabilidade celular, observando imediatamente após a ativação da água a viabilidade de 34%, aumentando para 46% após 24h e chegando a 66% de viabilidade celular após 48h. A *Escherichia coli* e o *Staphylococcus aureus* apresentaram resultados similares, sendo que a *Escherichia coli* em contato com a PAW em temperatura ambiente apresentou uma viabilidade de 35% imediatamente após, aumentando para 46% após 24h e 66% após 48h. O *Staphylococcus aureus* apresentou uma redução da viabilidade inicial de 34% para PAW em temperatura ambiente, 48% para 24h após a ativação da água e 67% no final do tempo estudado. Já para a PAW refrigerada foi observado uma maior redução da viabilidade celular, sendo que a *Escherichia coli* apresentou uma viabilidade de 25% após a ativação da água, e foi aumentando para 40% após 24h e 60% após 48h. Já a viabilidade celular do *Staphylococcus aureus* foi de 24% inicialmente, para 40% 24h após a ativação da água, chegando a 61% após 48h. A diferença da viabilidade celular entre as bactérias e entre as diferentes PAWs é observada na Figura 9.

Figura 9 - Comparação da Viabilidade Celular (%) entre os diferentes microrganismos, após 24h e 48h da ativação da água, e com as diferentes águas ativadas por plasma, PAW ambiente e PAW refrigerada

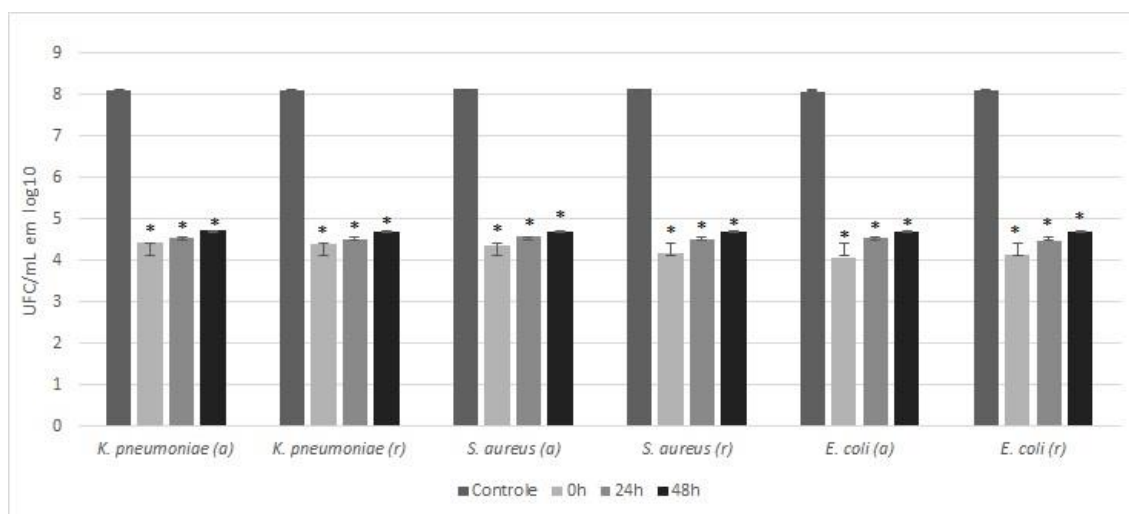


Fonte: Autor

4.3 CONTAGEM DAS UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA DOS GRUPOS DE MICRORGANISMOS SUBMETIDOS À ÁGUA ATIVADA POR PLASMA

Na Figura 10 podemos verificar que os grupos de *K. pneumoniae*, *E. coli* e *S. aureus* tiveram os números de UFC/mL reduzido ao decorrer do experimento quando comparado com o controle. A Figura 10 apresenta resultados da comparação entre o grupo controle com os grupos de microrganismos tratados com os diferentes tipos de água ativada por plasma, o que está representado pelo símbolo * ($p < 0,05$). Ao examinar os resultados obtidos por meio da análise estatística pelo método ANOVA e teste de Tukey verificou-se, que ao comparar todos os valores obtidos com seus respectivos grupos controle todos os resultados foram significativos.

Figura 10 - Comparação das médias de UFC/ml entre os diferentes tipos de PAW (a, ambiente; r, refrigerada) em cada tipo de microrganismos, após 0h, 24h e 48h da ativação da água. Teste ANOVA; *p<0.05 versus controle.



Fonte: Autor

Foi constatado por meio da análise estatística, que ao comparar os resultados obtidos nos grupos tratados com seus respectivos grupos controle, todos resultados foram estatisticamente significativos, comprovando que a PAW é eficiente na inativação das cepas ATCC de *K. pneumoniae*, *E. coli* e *S. aureus*.

Para todas as bactérias estudadas a maior redução das UFC foi no tempo 0h. Após analisar os dados obtidos foi constatado que a PAW refrigerada apresentou uma maior redução no número de UFC/ml ao comparar com a PAW ambiente em todos os microrganismos estudados, mostrando que a PAW refrigerada apresenta uma melhor inativação das cepas estudadas. Embora os resultados da *E. coli* tenham sido similares em ambas as PAWs no tempo de 0h, é possível verificar que ao decorrer do tempo a PAW refrigerada apresentou uma maior redução da UFC/ml. Houve uma redução logarítmica de 8 logs para 4 logs em todas as bactérias estudadas e em ambas as PAWs, porém quando utilizada a PAW refrigerada foi observado uma maior redução logarítmica quando comparada com a PAW em temperatura ambiente.

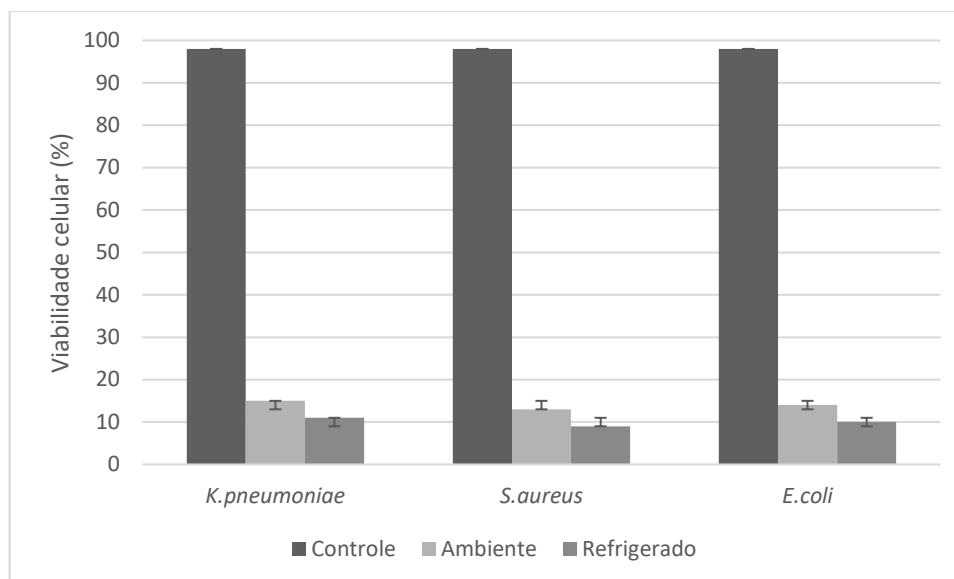
Também foi possível constatar que a PAW refrigerada conseguiu manter uma melhor ação antimicrobiana durante os tempos estudados, fato possível de ser analisado ao observar a redução logarítmica, onde a PAW refrigerada tem uma menor perda da ação antimicrobiana ao longo do tempo do que a PAW ambiente.

4.4 VIABILIDADE CELULAR DOS GRUPOS DE MICRORGANISMOS CONTENDO A MEMBRANA AMNIÓTICA CONTAMINADA E SUBMETIDA À ÁGUA ATIVADA POR PLASMA

Após verificar os resultados obtidos pelos testes utilizando apenas a PAW sem a membrana, conforme descrito no item 4.1, foi utilizado a PAW imediatamente após a sua ativação.

A redução da Viabilidade Celular dos microrganismos avaliados associando a Membrana Amniótica foi maior do que a da Viabilidade Celular usando apenas a Água Ativada por Plasma. Ao analisar as viabilidades celulares foi possível avaliar que não houve uma grande diferença entre os microrganismos estudados, porém ao comparar as diferentes águas ativadas por plasma foi possível observar que a PAW refrigerada apresentou uma maior redução da Viabilidade Celular, assim como observado no estudo realizado apenas com a Água Ativada por Plasma. A *Klebsiella pneumoniae* apresentou uma viabilidade celular de 15% para a PAW em temperatura ambiente e 11% para a PAW refrigerada, a *Escherichia coli* teve 14% para a PAW em temperatura ambiente e 10% para a PAW refrigerada e o *Staphylococcus aureus* apresentou a maior redução da viabilidade celular, sendo de 13% para a PAW em temperatura ambiente e 10% para a PAW refrigerada. Na Figura 11 é possível observar o comportamento da Viabilidade Celular.

Figura 11 – Comparação das médias da Viabilidade Celular (%) entre os diferentes microrganismos do grupo associada a MA, imediatamente após a ativação da água das diferentes águas ativadas por plasma, PAW ambiente e PAW refrigerada.



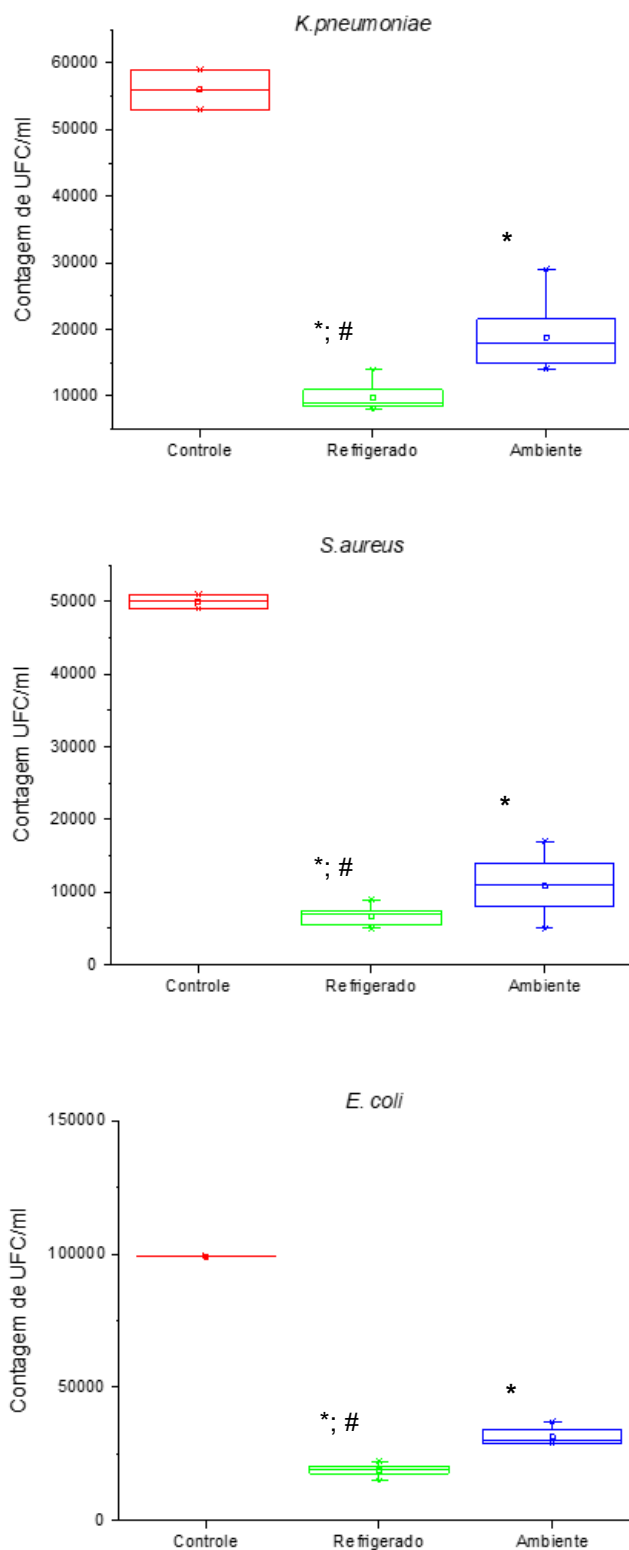
Fonte: Autor

A princípio é possível avaliar que a associação da MA com PAW, proporcionou um sinergismo da ação antimicrobiana, diminuindo ainda mais a viabilidade celular observada quando utilizando apenas a PAW, mantendo ainda uma maior ação antimicrobiana quando utilizada em conjunto com a PAW refrigerada. Todo o experimento foi realizado em triplicata.

4.5 CONTAGEM DAS UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA DOS GRUPOS DE MICRORGANISMOS CONTENDO A MEMBRANA AMNIÓTICA CONTAMINADA E SUBMETIDA À ÁGUA ATIVADA POR PLASMA

Os resultados obtidos demonstraram que tanto a PAW refrigerada, quanto a de PAW em temperatura ambiente, possuem uma ação antimicrobiana significativa sobre cepa padrão ATCC® de *E. coli*, *S. aureus* e *K. pneumoniae* quando comparada com o grupo controle. Porém ao comparar os resultados da PAW refrigerada com a PAW ambiente, foi possível notar que a PAW refrigerada apresentou uma maior redução das UFC/mL, conforme observado na Figura 12.

Figura 12 - Comparação das médias de UFC/ml entre os diferentes tipos de PAW associada a MA em cada tipo de microrganismos, imediatamente após a ativação da água. Teste ANOVA; * $p < 0.05$ versus controle; #. $p < 0.05$ versus PAW ambiente.



Fonte: Autor

As Figuras apresentam a comparação entre o grupo de controle e os grupos tratados com cada tipo de PAW e tipo de microrganismo, avaliando a contagem de unidades formadoras de colônias. Podemos observar que houve pouca dispersão dos resultados, sendo o grupo da *E. coli* o grupo com a menor dispersão, já os grupos da *K. pneumoniae* e *S. aureus* apresentaram as dispersões de seus resultados similares. Ao observar o número de UFC/, é possível analisar que o grupo PAW ambiente + MA, apresentou uma menor redução das UFC do que a PAW refrigerada + MA, e que o grupo da *K. pneumoniae* apresentou uma menor diminuição nas UFC em comparação com os outros dois grupos e que o grupo do *S. aureus* apresentou uma maior diminuição nas UFC.

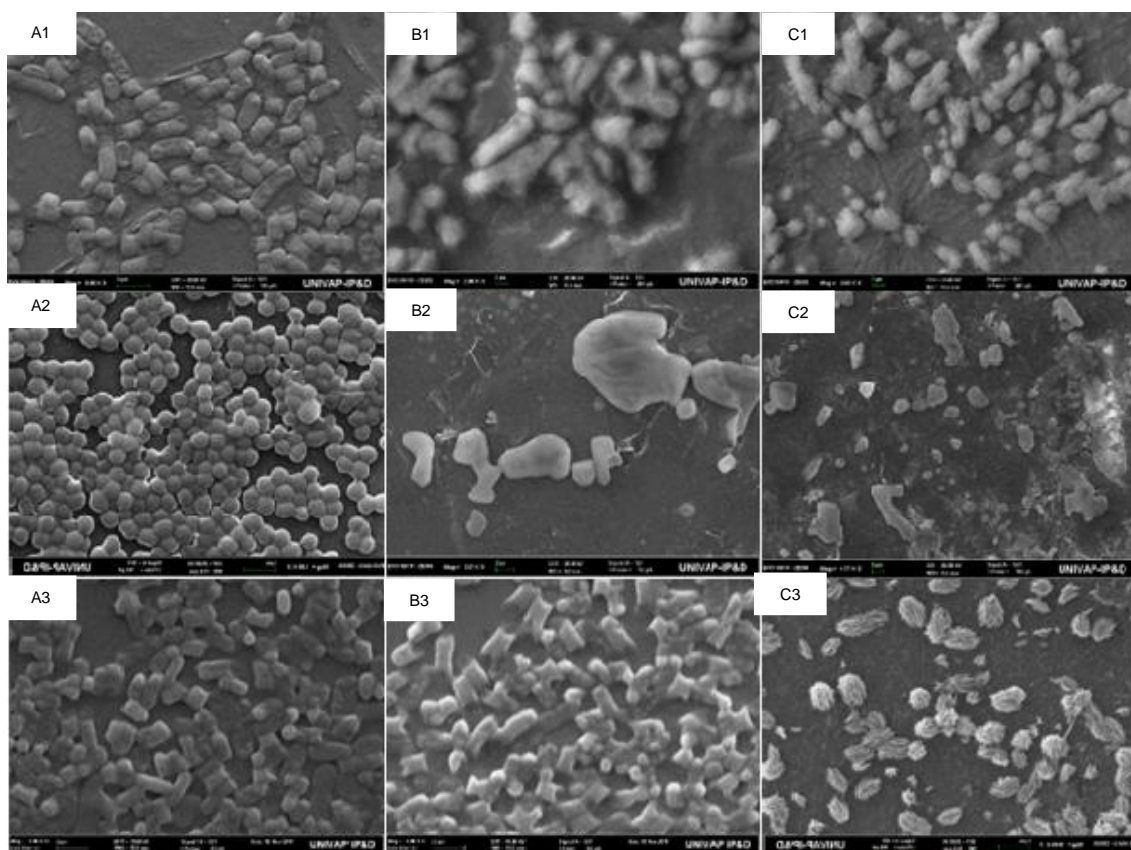
Para o grupo *S. aureus*, o grupo controle (MA + água de osmose reversa) apresentou 4,69 e 4,7 log, que foi uma redução de 2,83 e 2,84 log comparando com o inóculo, o grupo da MA + PAW refrigerada apresentou 3,82 log, que foi uma redução de 0,87 log em relação ao controle e 3,6 log em relação ao inóculo. Já o grupo MA + PAW ambiente apresentou 4,03 log, que foi uma redução de 0,67 log em relação ao controle e 3,49 log em relação ao inóculo. O controle do grupo *K. pneumoniae* apresentou 4,72 e 4,77 log, que foi uma redução de 2,28 e 2,23 log comparando com o inóculo, o grupo da MA + PAW refrigerada apresentou 3,99 log, que foi uma redução de 0,73 log em relação ao controle e 3,01 log em relação ao inóculo. Já o grupo MA + PAW ambiente apresentou 4,27 log, que foi uma redução de 0,5 log em relação ao controle e 2,73 log em relação ao inóculo. Para o grupo *E. coli*, o grupo controle apresentou 4,99 log, que foi uma redução de 2,48 log comparando com o inóculo, o grupo da MA + PAW refrigerada apresentou 4,27 log, que foi uma redução de 0,72 log em relação ao controle e 3,2 log em relação ao inóculo. Finalmente o grupo MA + PAW ambiente apresentou 4,49 log, que foi uma redução de 0,5 log em relação ao controle e 2,98 log em relação ao inóculo.

4.6 ANÁLISE DO MEV

A Figura 13 mostra as imagens obtidas pela Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), onde é possível observar a destruição celular causada nas bactérias pela ação da Membrana associada a PAW, onde o controle da *E. coli* utilizado não possui dano em sua parede celular, quando comparado com as bactérias que

passaram pela membrana associada a PAW, também é possível notar que a bactéria que sofreu apenas o efeito da PAW, visualmente, sofreu menos danos à sua parede celular. Para o *S. aureus* pode ser observado um grande dano na parede celular e lise celular nos grupos PAW e Membrana associada PAW. Já para a *K. pneumoniae* não foi possível ver nenhum dano nos grupos, devido a característica da bactéria de produzir muco.

Figura 13 - Efeito da PAW e da PAW + MA analisado através da microscopia eletrônica por varredura: (A) Controle, (B) Bactéria + PAW, (C) Bactéria + PAW + Membrana. 1) *K. pneumoniae*, 2) *S. aureus* e 3) *E. coli*. Utilizando uma magnitude de 2000x com uma escala de 2µm.



Fonte: Autor

5 DISCUSSÃO

A busca de uma nova técnica para a descontaminação da MA é processo que necessita inovações nas pesquisas clínicas, que propõem a redução dos efeitos negativos apresentados nas técnicas convencionais utilizadas. A PAW é um novo método que vem sendo pesquisado para a realização de descontaminação de superfícies e materiais biológicos, apresentando um bom efeito antimicrobiano. O seu uso pode ser uma importante técnica na inativação de microrganismos que possam estar presentes na MA, contribuindo na diminuição dos efeitos indesejáveis que as técnicas convencionais apresentam (KAUSHIK *et al.*, 2018).

Uma das principais características da PAW é a sua grande variedade de parâmetros que podem ser utilizados para a sua obtenção, onde o conjunto de gases, potência elétrica, sistema de plasma e distância do bocal para a superfície afetam o efeito antimicrobiana da PAW. Neste experimento foi utilizado os gases de argônio e ar comprimido, com o sistema de geração do plasma chamado *gliding arc*, a junção de argônio + ar comprimido faz com que se tenha uma maior geração de espécies reativas de vida longa. Quando a descarga do plasma é gerada apenas com Argônio se tem uma criação de espécies reativas de vida curta como o peróxido de hidrogênio, oxigênio e hidroxila, porém quando a descarga é gerada em conjunto com outro gás como o ar comprimido, este auxilia na criação de espécies de vida longa como o nitrato, nitrito e ozônio, sendo que essas espécies reativas possuem um maior grau de efeito antimicrobiano do que as espécies de vida curta (DORIA, 2019; KONDETI *et al.*, 2018).

Foram escolhidas para a geração da PAW a água de osmose reversa refrigerada a 4°C e em temperatura ambiente a 27°C, pois sabe-se que a solubilidade de gases na água é inversamente proporcional a sua temperatura. Pang e colaboradores em um estudo realizado em 2021, atendeu a água em quatro temperaturas diferentes sendo elas 4°C, 25°C, 40°C e 70°C por 10 min e mantendo as temperaturas estáveis com gelos e superfícies aquecidas, e chegou a observar que quanto maior a temperatura da água maior a sua taxa de evaporação, algo que diminui a absorção de gases na água pois aumenta a distância do bocal para a superfície da água, além disto ele também observou que a água a 25°C apresentou um maior concentração de espécies reativas do que a água a 4°C, já que a água a 4°C apresenta uma ligação de

hidrogênio mais forte dificultando a absorção dos gases na água. No presente estudo a PAW refrigerada 4°C apresentou uma melhor ação antimicrobiana quando comparada com a PAW em temperatura ambiente 27°C, onde a PAW em temperatura ambiente apresentou uma maior formação de bolhas e vapor além de ter tido a sua temperatura aumentada.

Com o passar do tempo a ação antimicrobiana foi reduzida, devido ao consumo das espécies reativas presentes na água, isso se dá naturalmente e é influenciado pela forma e temperatura de armazenamento, no presente estudo optou-se por armazená-la em temperatura ambiente para analisar o decaimento natural da ação antimicrobiana da PAW. Esse comportamento foi avaliado por Shen e colaboradores de 2016, que analisaram o tipo de armazenamento ideal para garantir a maior eficácia da ação antimicrobiana da PAW, concluindo que, quanto menor a temperatura de armazenamento, maior a duração da ação antimicrobiana, fato que auxilia no entendimento dos resultados obtidos no presente estudo, uma vez que esclarece o motivo da redução do efeito antimicrobiano da PAW ao longo de três dias, fato demonstrado também por Figueira (2019), onde além do fato da temperatura baixa de armazenamento influenciar na maior quantidade de nitrato e nitrito na PAW, demonstrou também que as concentrações dessas espécies reativas vão diminuindo com o passar do tempo.

Kutasi e colaboradores em seu artigo publicado em 2021, estudou o decaimento das espécies, foi demonstrado que a quantidade de NO_2^- começa a decair imediatamente, e após 200 min desaparece completamente da PAW, a quantidade de H_2O_2 decai até a metade do seu valor inicial durante os 100 minutos e estabiliza nesse valor, porém a quantidade de NO_3^- aumenta, pois ele é um dos produtos da reação $\text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}^+$. Todas essas espécies reativas são responsáveis pela ação antimicrobiana da PAW e com a diminuição delas se tem uma redução de sua ação, fato que foi possível observar por meio dos resultados de 24h e 48h após a ativação da PAW.

O efeito antibacteriano da PAW está conectado sinergicamente com o seu pH baixo. Para se obter um pH baixo é necessário ter uma alta concentração de H^+ , e sua principal fonte é por meio da ionização de nitrato e nitrito (MIZOI *et al.*, 2022). O nitrato e nitrito são gerados a partir da dissolução do NO_x , que é gerado a partir de espécies reativas de N_2 e O_2 , porém a dissolução de NO_x vai diminuindo de acordo

com o aumento da temperatura da água, possuindo uma maior taxa de dissolução em temperaturas mais baixas (DAUBERT, 1998; PANG *et al.*, 2021).

Xu e colaboradores em seu artigo publicado em 2020, estudou o efeito da PAW gerado por descarga de plasma Corona utilizando ar atmosférico em biofilmes de *S. aureus*, onde reduziu 2,24 log das UFC/ml atingindo um pH de 3,10 após 30 minutos e uma redução 4,72 log das UFC/ml e um pH de 2,56 após 60 minutos. A diferença de resultados do presente onde a redução das UFC/ml foi de 3,75 log e atingiu um pH de 3,41, se dá pelo diferente sistema de plasma e as bactérias utilizados no estudo de XU estavam em formato de biofilme enquanto o do presente estudo estava em forma planctônica.

E. coli e *S. aureus* são bactérias encontradas nas contaminações de MA (HE *et al.*, 2020; JUNG *et al.*, 2021). No presente estudo o grupos das membranas contaminadas por *E. coli* e *S. aureus* que foram submetidos ao tratamento com a PAW em diferentes temperaturas obtiveram resultados similares, obtendo uma redução de 3 log, o que está de acordo com Chiappim e colaboradores em estudo publicado em 2021, no qual 250 mL de água de torneira foram ativados utilizando o sistema *gliding arc*, com um fluxo de gás de 5 L/m de ar comprimido por 30 min. Chiappim e colaboradores (2021) utilizando a PAW em *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*, observaram uma redução de 3 log das UFC/mL para as bactérias, porém não se teve uma redução significativa para a *C. albicans*. Adicionalmente foi observado que a *E. coli* apresentou uma maior susceptibilidade para os efeitos antimicrobianos da PAW, quando comparado ao *S. aureus*, sendo este resultado diferente ao observado no presente estudo. Este achado pode ser explicado pelo uso de diferentes tipos de gases, assim como diferentes tempos de incubação dos microrganismos na PAW.

A *E. coli* e o *S. aureus* foram as bactérias que mais apresentaram susceptibilidade para a ação da PAW, porém não foi o suficiente para inibir o crescimento bacteriano. Chen e colaboradores em seu trabalho realizado em 2018, utilizou uma concentração bacteriana de 2×10^8 UFC/mL, e observou o efeito da PAW em bactérias planctônicas e em biofilmes verificando que tanto as bactérias na forma planctônicas, quanto os biofilmes não conseguiram sobreviver após 30 min e 3h de incubação na PAW, respectivamente. Esta diferença dos resultados se dá pela diferença do sistema de plasma utilizado que foi o micro catodo oco (MHCD) utilizando dois tipos de gases, e tempo de ativação diferentes, onde a PAW gerada por ar

comprimido atingiu um pH de 2,6 após 10 min de ativação e pH de 2,1 após 30 min, e a PAW de oxigênio atingiu um pH de 2,8 e pH de 2,3 após 30 min. Como mencionado previamente o pH baixo está relacionado com a geração de espécies reativas, sendo possível concluir que a principal diferença dos resultados da ação microbiana entre o presente estudo e o estudo de Chen pode ter ocorrido pelos diferentes parâmetros utilizados para a geração da PAW, os quais podem ter ocasionado um menor pH do que o encontrado no presente estudo.

Considerando todas as bactérias estudadas a *K. pneumoniae* foi a que apresentou uma maior resistência a ação antimicrobiana da PAW. Essa resistência foi observada por Bălan e colaboradores em 2018, onde ele utilizou a PAW gerada pelo sistema *gliding arc* utilizando ar comprimido, para fazer a limpeza de duodenoscópio, e observou que a *E. coli* foi mais suscetível à ação da PAW do que a *K. pneumoniae*, uma vez que esta bactéria necessitou de um tempo maior de exposição à PAW para atingir uma redução de UFC significativa. Esse resultado foi similar ao presente estudo, sendo a *E. coli* a bactéria mais suscetível à ação antimicrobiana da PAW, quando comparado a *K. pneumoniae*, embora ambas sejam bactérias Gram - negativas.

Muhammad e colaboradores 2019 utilizando ar comprimido em um sistema de plasma comercial da Tonson Hi-Tech Automation Equipment Co., Ltd., ativou 400 mL de água deionizada durante três tempos: 3, 7 e 10 minutos, e deixou um contato com a *K. pneumoniae* por 15 minutos, e observou que a PAW com o maior período de ativação apresentou um maior efeito antibacteriano e um menor pH, tendo uma redução de 3.7 log das UFCs de *K. pneumoniae*. Foi observado que o pH da PAW decaiu de 6.47 para 2.71, além de avaliar que a concentração de NO_3^- , NO_2^- e H_2O_2 foi maior no tempo de 10 min de ativação. Resultados similares foi observado no presente estudo, porém foi necessário um maior tempo de exposição para obter os resultados, uma vez que o tempo de exposição utilizado e o pH obtido foram diferentes.

Li e colaboradores (2017), utilizou a PAW como enxaguante bucal *in vitro* nas bactérias, *Actinomyces viscosus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus mutans* observando a geração de espécies reativas, as quais induziram um forte estresse oxidativo e dano celular fazendo com que ocorresse um vazamento das proteínas intracelulares e do DNA após o tratamento com PAW. No presente trabalho, a análise

das imagens obtidas no MEV demonstrou também dano celular causado pela PAW nas paredes celulares, principalmente na *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Ao sofrer ação da PAW, as células de *S. aureus* exibiram dano na parede celular, podendo ser observado que a parede celular da espécie *S. aureus* apresentou deformações em suas células gerando lise celular. Rathore e colaboradores 2021 utilizou o sistema de plasma *dielectric barrier discharge* (DBD) e os gases oxigênio e nitrogênio para estudar os efeitos físico-químico e antibacteriano da PAW. Foi observado, que a razão da deformação da parede celular das células de *S. aureus* foi o extravasamento de proteínas e ácidos nucleicos. Além disso, o tratamento com a PAW danificou o sistema de transporte da membrana, fazendo com que ocorresse um extravasamento de potássio da célula (ZHAO *et al.*, 2021a).

Mesmo obtendo uma redução entre 3 - 4 Log em todas as bactérias estudadas não foi possível realizar uma inativação completa das células bacterianas para se considerar a esterilização da MA, já que para ocorrer a esterilização é necessário que tenha uma redução de no mínimo 6 Log ou prevenir completamente o crescimento de colônias bacterianas (MATSUMOTO *et al.*, 2021).

Estudos futuros são necessários para aumentar a eficácia antimicrobiana da PAW, e verificar se a PAW exerce efeitos sobre a morfologia das células da MA por causa do seu pH baixo e espécies reativas. Por enquanto não se tem informações sobre estes fatores, uma vez que não foi encontrado outro trabalho que envolva plasma e PAW com a MA.

6 CONCLUSÃO

Com base nos experimentos realizados, e a partir dos resultados obtidos pode-se concluir que:

Todas as bactérias estudadas apresentaram redução das UFC/mL entre 3 - 4 Log, sendo a *K. pneumoniae* a bactéria que apresentou a maior resistência a ação da PAW. Já a *E. coli* e o *S. aureus* apresentaram susceptibilidades similares para a PAW.

A PAW também reduziu a viabilidade celular de todas as bactérias, sendo a *K. pneumoniae* a bactéria que apresentou a maior resistência a ação da PAW. A PAW refrigerada apresentou um maior efeito antimicrobiano para todas as bactérias estudadas.

A associação da PAW a MA apresentou uma sinergia na ação antimicrobiana, observada no teste de viabilidade celular. Foi possível concluir que a PAW teve uma boa ação antimicrobiana sobre os microrganismos estudados, sendo que a PAW refrigerada apresentou um melhor resultado, embora não tenha proporcionado a esterilização das MA contaminadas. A PAW + MA apresentou um melhor efeito antimicrobiano quando comparado apenas com a PAW em todos os microrganismos estudados, porém não foi uma grande diferença.

Um ponto importante observado foi que a PAW fez com que as células bacterianas sofressem lise, mostrando o papel que as espécies reativas possuem na inativação dos microrganismos. Foi observado a redução do pH da água após a sua ativação, decaindo de 6 para 3.6 para a PAW ambiente e 3.3 para a PAW refrigerada.

REFERÊNCIAS

- ADDS, P. J.; HUNT, C.; HARTLEY, S. Bacterial contamination of amniotic membrane. **British Journal of Ophthalmology**, v. 85, n. 2, p. 228–230, 2001.
- AGHAYAN, H. R. *et al.* Bacterial contamination of amniotic membrane in a tissue bank from Iran. **Cell and tissue banking**, v. 14, p. 401-406, 2013. Doi: <http://link.springer.com/10.1007/s10561-012-9345-x>.
- AL-SHARIFY, Z. T. *et al.* Investigative study on the interaction and applications of plasma activated water (PAW). **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 870, n. 1, p. 012042 2020.
- ALMEIDA, M. *et al.* *Staphylococcus aureus*. **Mostra Científica em Biomedicina**, Quixadá, v. 1, n. 01, jun. 2016. Disponível em: <http://publicacoesacademicas.unicatolicaquixada.edu.br/index.php/mostrabiomedicina/article/view/842/757..>
- ANDRADE, A. B. S. *et al.* Bacterial growth on the hands of health care workers: implications for preventing nosocomial infections. **RevRene**, v. 22, p. e70938, 2021.
- ARRIZABALAGA, J. H.; NOLLERT, M. U. Human Amniotic Membrane: A Versatile Scaffold for Tissue Engineering. **ACS Biomaterials Science and Engineering**, v. 4, n. 7, p. 2226–2236, 2018.
- BALDRY, M. G. C. The bactericidal, fungicidal and sporicidal properties of hydrogen peroxide and peracetic acid. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 54, n. 3, p. 417–423, Jun. 1983.
- BARBERATO-FILHO, S. *et al.* *Staphylococcus aureus* resistente à metilina nas Américas: revisão sistemática e metanálise da prevalência na pecuária. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 44, p. 1, set. 2020.
- BRANÝ, D. *et al.* Cold atmospheric plasma: A powerful tool for modern medicine. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 8, p. 2932, 2020.
- BRUGGEMAN, P. J. *et al.* Plasma–liquid interactions: a review and roadmap. **Plasma Sources Science and Technology**, v. 25, n. 5, p. 053002, 30 Sep. 2016.
- CALFEE, D. P. *et al.* Strategies to Prevent Transmission of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Acute Care Hospitals. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 29, n. S1, p. S62–S80, Oct. 2008.
- CARNEIRO, L. C. *et al.* Identificação de Bactérias Causadoras de Infecção Hospitalar e Avaliação da Tolerância a Antibióticos. **NewsLab**, v. 86, n. 1, p. 106-14, 2008.
- CASTRO, C. G. S. O. (coord.). **Estudos de Utilização de Medicamentos: noções básicas**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2000.
DOI: <https://doi.org/10.7476/9788575412657>

DAUBERT, T. E. Evaluated equation forms for correlating thermodynamic and transport properties with temperature. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 37, n. 8, p. 3260–3267, 1998.

ANDRADE, Jacy Alves B. de; HAAPALAINEN, Edna Freymüller; FAGUNDES-NETO, Ulysses. Escherichia coli enteroagregativa como agente provocador de diarreia persistente: modelo experimental utilizando microscopia óptica de luz. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 29, p. 60-66, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0103-05822011000100010>

BĂLAN, G. G. *et al.* Plasma-activated water: a new and effective alternative for duodenoscope reprocessing. **Infection and Drug Resistance**, v. 11, p. 727–733, maio 2018.

CHEN, T. P.; LIANG, J.; SU, T. L. Plasma-activated water: antibacterial activity and artifacts? **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 27, p. 26699–26706, 2018.

CHIAPPIM, W. *et al.* Antimicrobial effect of plasma-activated tap water on staphylococcus aureus, escherichia coli, and Candida albicans. **Water** (Switzerland), v. 13, n. 11, p. 1–16, 2021.

DE AVILLEZ, M. A.; ANELA, G. J.; BREITSCHWERDT, D. Variability of the adiabatic parameter in monoatomic thermal and non-thermal plasmas. **Astronomy and Astrophysics**, v. 616, p. A58, 2018.

DE GEYTER, N.; MORENT, R. Nonthermal plasma sterilization of living and nonliving surfaces. **Annual review of biomedical engineering**, v. 14, p. 255-274, 2012.

SOUZA, C. O. *et al.* Escherichia coli enteropatogênica: uma categoria diarreioagênica versátil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 7, n. 2, p. 79-91, 2016.

DIENSTMANN, R. *et al.* Avaliação fenotípica da enzima Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC) em Enterobacteriaceae de ambiente hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 1, p. 23–27, fev. 2010.

DORIA, Anelise Cristina Osório César. **Interação plasma-biofilme fúngico: caracterização do plasma elétrico e do processo de inativação de cepas do gênero candida**. 2019. 183 f. Tese (Doutorado em Engenharia Biomédica) - Universidade do Vale do Paraíba, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, São José dos Campos, 2019.

DUA, H. S. *et al.* The amniotic membrane in ophthalmology. **Survey of Ophthalmology**, v. 49, n. 1, p. 51–77, 2004.

DUA, H. S.; AZUARA-BLANCO, A. Amniotic membrane transplantation. **British Journal of Ophthalmology**, v. 83, n. 6, p. 748-752, 1999.

EFFAH, C. Y. *et al.* Klebsiella pneumoniae: An increasing threat to public health. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 19, n. 1, p. 1–9, 2020.

ERCAN, U. K. et al. Escherichia coli cellular responses to exposure to atmospheric-pressure dielectric barrier discharge plasma-treated N-acetylcysteine solution. **Journal of applied microbiology**, v. 125, n. 2, p. 383-397, 2018.

FAIRBANKS, D. et al. Membrana amniótica no tratamento dos afinamentos corneais e esclerais. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 66, n. 1, p. 71–76, 2003.

FAITA, T. et al. Amniotic membrane: Alternative source of mesenchymal stromal cells in several animals species. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 36, n. 6, p. 520–525, 2016.

FARRINGTON, M. et al. Processing of cardiac valve allografts: 2. Effects of antimicrobial treatment on sterility, structure and mechanical properties. **Cell and Tissue Banking**, v. 3, n. 2, p. 91–103, 2002.

FÉNELON, M. et al. Applications of human amniotic membrane for tissue engineering. **Membranes**, v. 11, n. 6, p. 1–27, 2021.

FERENCZY, A.; SOUZA, L. Comparação dos meios de preparação e preservação de membrana amniótica humana para uso no tratamento de doenças da superfície ocular. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 79, p. 71-80, 2020..

FERRASSO, M. M. et al. Comportamento de Escherichia coli entero-hemorrágica, enteropatogênica e enteroinvasiva em ambrosia. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 3, n. 3, p. 293-297, 2014. <https://doi.org/10.18241/0073-98552014731618>.

FIGUEIRA, Fernanda Ramos. **Monitoramento de parâmetros físico-químicos e microbiológicos de diferentes tipos de água tratadas por plasma atmosférico**. São José dos Campos, SP, 2019. 104 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Universidade do Vale do Paraíba, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, São José dos Campos, 2019.

FRIDMAN, A.; FRIEDMAN, G. **Plasma Medicine**. Connecticut: Begell House, 2013. Disponível em:
<https://www.dl.begellhouse.com/download/issue/6239f734065d8e3d/sample.pdf>

GANATRA, M. A.; DURRANI, K. Method of obtaining and preparation of fresh human amniotic membrane for clinical use. **Journal of the Pakistan Medical Association**, v. 46, n. 6, p. 126–128, 1996.

GARCIA, T.; BITTENCOURT, E. Plasma: tecnologia limpa. In: AMAZON GREEN MATERIALS MEETING, 3., 2010, Manaus, AM. **Anais [...]**. [Manaus: s. n.], 2010.

GELATTI, L. C. et al. Staphylococcus aureus resistentes à meticilina: disseminação emergente na comunidade. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 5, p. 501–506, out. 2009.

GHOLIPOURMALEKABADI, M. et al. How preparation and preservation procedures affect the properties of amniotic membrane? How safe are the procedures? **Burns**, v. 46, n. 6, p. 1254–1271, 2020.

- GONÇALVES, N. C.; SANT'ANNA, L. B. Potencial da membrana amniótica humana na medicina regenerativa. **Revista Multidisciplinar em Saúde**, v. 2, n. 4, p. 99-99, 2021. Disponível em: <https://editoraime.com.br/revistas/index.php/remss/article/view/2856>. Acesso em: 1 jun. 2023.
- GUPTA, T. T.; AYAN, H. Application of non-thermal plasma on biofilm: A review. **Applied Sciences (Switzerland)**, v. 9, n. 17, p. 3548, 2019.
- HE, Q. *et al.* The meconium microbiota shares more features with the amniotic fluid microbiota than the maternal fecal and vaginal microbiota. **Gut Microbes**, v. 12, n. 1, 2020.
- HEIDARZADEH, S. *et al.* Antimicrobial effects of amniotic membrane on some bacterial strains. **Immunopathologia Persa**, v. 4, n. 2, p. e25–e25, 15 maio 2018.
- HODDE, J.; HILES, M. Virus safety of a porcine-derived medical device: Evaluation of a viral inactivation method. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 79, n. 2, p. 211–216, 20 jul. 2002.
- HUSSEIN, N. H. *et al.* The predominance of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC-type) gene among high-level carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Baghdad, Iraq. **Molecular Biology Reports**, v. 49, n. 6, p. 4653–4658, 26 jun. 2022.
- JAFARI, A. *et al.* Human amniotic mesenchymal stem cells to promote/suppress cancer: two sides of the same coin. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 12, n. 1, p. 1–11, 2021.
- JUNG, E. *et al.* Bacteria in the amniotic fluid without inflammation: Early colonization vs. contamination. **Journal of Perinatal Medicine**, v. 49, n. 9, p. 1103–1121, 2021.
- KAMGANG-YOUBI, G. *et al.* Microbial inactivation using plasma-activated water obtained by gliding electric discharges. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 13–18, jan. 2009.
- KAUSHIK, N. K. *et al.* Biological and medical applications of plasma-activated media, water and solutions. **Biological Chemistry**, v. 400, n. 1, p. 39–62, 19 dez. 2018.
- KHOKHAR, S. *et al.* Infection After Use of Nonpreserved Human Amniotic Membrane for the Reconstruction of the Ocular Surface. **Cornea**, v. 20, n. 7, p. 773, out. 2001.
- KOCH, N. *et al.* Environmental antibiotics and resistance genes as emerging contaminants: Methods of detection and bioremediation. **Current Research in Microbial Sciences**, v. 2, p. 100027, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100027>
- KONDETI, V. S. S. K. *et al.* Long-lived and short-lived reactive species produced by a cold atmospheric pressure plasma jet for the inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 124, p. 275–287, ago. 2018.

- KONG, M. G. *et al.* Plasma medicine: An introductory review New. **Journal of Physics**, v. 11, p. 115012, 2009. Disponível em: <http://iopscience.iop.org/1367-2630/11/11/115012>. Acesso em: 4 maio. 2017
- KURATOMI, T. **Translocação por via intestinal de amostras de *Klebsiella pneumoniae***: Papel da adesina CF29K. 2008. 75f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 2008.
- KUTASI, K. *et al.* Controlling: The composition of plasma-activated water by Cu ions. **Plasma Sources Science and Technology**, v. 30, n. 4, p. 045015, 2021.
- LAURITA, R. *et al.* Chemical analysis of reactive species and antimicrobial activity of water treated by nanosecond pulsed DBD air plasma. **Clinical Plasma Medicine**, v. 3, n. 2, p. 53–61, dez. 2015.
- LEAL-MARIN, S. *et al.* Human Amniotic Membrane: A review on tissue engineering, application, and storage. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 109, n. 8, p. 1198–1215, 2021.
- LIN, C.-M. *et al.* The Optimization of Plasma-Activated Water Treatments to Inactivate Salmonella Enteritidis (ATCC 13076) on Shell Eggs. **Foods**, v. 8, n. 10, p. 520, Oct. 2019.
- LI, Y. *et al.* In vitro studies of the antimicrobial effect of non-thermal plasma-activated water as a novel mouthwash. **European Journal of Oral Sciences**, v. 125, n. 6, p. 463–470, Dec. 2017.
- MALHOTRA, C.; JAIN, A. K. Human amniotic membrane transplantation: Different modalities of its use in ophthalmology. **World Journal of Transplantation**, v. 4, n. 2, p. 111, 2014.
- MAO, Y. *et al.* Antimicrobial Peptides Secreted from Human Cryopreserved Viable Amniotic Membrane Contribute to its Antibacterial Activity. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 2–9, 2017.
- MARSIT, N. M. *et al.* Validation and assessment of an antibiotic-based, aseptic decontamination manufacturing protocol for therapeutic, vacuum-dried human amniotic membrane. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2019.
- MATSUMOTO, A. J. *et al.* **Efeito de diferentes tipos de plasma no potencial de esterilização da membrana amniótica humana fresca**. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2021..
- MILDAZIENE, V. *et al.* Biochemical and Physiological Plant Processes Affected by Seed Treatment with Non-Thermal Plasma. **Plants**, v. 11, n. 7, 2022.
- MIZOI, K. *et al.* Interactions between pH, reactive species, and cells in plasma-activated water can remove algae. **RSC Advances**, v. 12, n. 13, p. 7626–7634, 2022.
- MOREAU, M. *et al.* Lethal effect of the gliding arc discharges on *Erwinia* spp. **Journal**

of **Applied Microbiology**, v. 98, n. 5, p. 1039–1046, 2005.

MOREJÓN-ALONSO, L. *et al.* Effect of sterilization on the properties of CDHA-OCP- β -TCP biomaterial. **Materials Research**, v. 10, n. 1, p. 15–20, 2007.

MOURA, M. *et al.* Inovações no Atendimento a Pele Queimada: uma abordagem literária. CONGRESSO INTERNACIONAL DE ENFERMAGEM, 2017, Aracaju. **Anais [...]**. Aracaju: Unit, 2017.

MUHAMMAD, A. I. *et al.* Effects of Plasma-Activated Water and Blanching on Microbial and Physicochemical Properties of Tiger Nuts. **Food and Bioprocess Technology**, v. 12, n. 10, p. 1721–1732, Oct. 2019.

MUNADZIROH, E. *et al.* The effect of secretory leukocyte protease inhibitor amnion membrane on incisional wound healing. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v. 12, n. 3, p. 358–362, maio 2022.

MURRI, M. S. *et al.* Amniotic membrane extract and eye drops: A review of literature and clinical application. **Clinical Ophthalmology**, v. 12, p. 1105–1112, 2018.

NASEER, N. *et al.* Human amniotic membrane as differentiating matrix for in vitro chondrogenesis. **Regenerative Medicine**, v. 13, n. 7, p. 821–832, 2018.

NEJAD, A. R. *et al.* Update review on five top clinical applications of human amniotic membrane in regenerative medicine. **Placenta**, v. 103, p. 104–119, 2021.

NEUMANN, C. F. **Membrana Amniótica Na Oftalmologia Veterinária**. 2014. Trabalho de conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) Universidade Federal do Rio Grande do sul, Porto Alegre, 2014.

NGUYEN, Y.; SPERANDIO, Vanessa. Enterohemorrhagic E. coli (EHEC) pathogenesis. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, p. 90, 2012. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00090>.

NIKNEJAD, H. *et al.* Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. **European Cells and Materials**, v. 15, p. 88–99, 2008.

NOGUEIRA, P. S. F. *et al.* Perfil da Infecção Hospitalar em um Hospital Universitário. **Revista Enfermagem UERJ**, v. 17, n. 1, p. 96–101, 2009.

OH, J. S. *et al.* UV-vis spectroscopy study of plasma-activated water: Dependence of the chemical composition on plasma exposure time and treatment distance. **Japanese Journal of Applied Physics**, v. 57, n. 1, p. 0102B9, 2018.

OLIVEIRA, E. C. *et al.* Estudo retrospectivo da utilização do transplante de membrana amniótica em um serviço terciário de Oftalmologia. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 67, n. 4, p. 165–171, 2008.

OLIVEIRA, N. A. *et al.* Use of antibiotics in animal production and its impact on human health. **Journal of Food Chemistry and Nanotechnology**, v. 6, n. 1, p. 40–47, 2020.

PAGGIARO, A. *et al.* Estabelecimento de protocolo de glicerolização de membranas

amnióticas para uso como curativo biológico. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 9, n. 4, p. 2–6, 2010.

PANG, B. *et al.* Discharge mode transition in a He/Ar atmospheric pressure plasma jet and its inactivation effect against tumor cells in vitro. **Journal of Applied Physics**, v. 130, n. 15, p. 153301, Oct. 2021.

PANG, B. *et al.* Investigation of the chemical characteristics and anticancer effect of plasma-activated water: The effect of liquid temperature. **Plasma Processes and Polymers**, v. 19, n. 1, p. 2100079, 18 jan. 2022.

PENA, J. D. O. *et al.* Análise ultraestrutural e de fatores de crescimento de diferentes métodos de preservação da membrana amniótica utilizada em cirurgia ocular. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 70, n. 5, p. 756–762, 2007.

PEREIRA, A. L. A. *et al.* The role of matrix extracellular proteins and metalloproteinases in head and neck carcinomas: an updated review. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 71, n. 1, p. 81–86, jan. 2005.

PESSOA, Rodrigo Sávio. **Estudos de plasmas fluorados aplicados em corrosão de silício usando simulação de modelo global e diagnósticos experimentais.**

Realização de Instituto Tecnológico de Aeronáutica. 2009. 229 p. (CTA/ITA/TD-017/2009). Disponível em:

http://www.bdita.bibl.ita.br/tesesdigitais/lista_resumo.php?num_tese=000552725.

Acesso em: 3 jul. 2023.

PLAZAK, M. E.; TAMMA, P. D.; HEIL, E. L. The antibiotic arms race: current and emerging therapy for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) - producing bacteria. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 19, n. 18, p. 2019–2031, 2018.

POLLITT, E. J. G. *et al.* Staphylococcus aureus infection dynamics. **PLoS Pathogens**, v. 14, n. 6, p. 1–27, 2018.

RAMUTA, T. Ž.; KREFT, M. E. Human Amniotic Membrane and Amniotic Membrane-Derived Cells: How Far Are We from Their Use in Regenerative and Reconstructive Urology? **Cell Transplantation**, v. 27, n. 1, p. 77–92, 2018.

RAMUTA, T. Ž.; STARČIČ ERJAVEC, M.; KREFT, M. E. Amniotic Membrane Preparation Crucially Affects Its Broad-Spectrum Activity Against Uropathogenic Bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. March, 2020.

RATHORE, V.; NEMA, S. K. Optimization of process parameters to generate plasma activated water and study of physicochemical properties of plasma activated solutions at optimum condition. **Journal of Applied Physics**, v. 129, n. 8, 2021.

RIAU, A. K. *et al.* Preservation, sterilization and de-epithelialization of human amniotic membrane for use in ocular surface reconstruction. **Biomaterials**, v. 31, n. 2, p. 216–225, 2010.

ROSA, J.; BARROS, R.; SANTOS, M. Características Da *Escherichia Coli* Enterohemorrágica (Ehec). **Saúde & Ciência Em Ação**, v. 2, n. 1, p. 66–78, 2016.

- ROZIN, A.; CARDOSO, K. M.; GUIMARÃES, T. G. Clinical Aspects of Amniotic Membrane Implants in Corneal Repair in Dogs with Complicated Ulcers. **Acta Scientiae Veterinariae**, [S. l.], v. 48, 2020. DOI: 10.22456/1679-9216.101085. Disponível em: <https://seer.ufrgs.br/index.php/ActaScientiaeVeterinariae/article/view/101085>. Acesso em: 27 jun. 2023.
- SAMPAIO, M. B. N. **The use of amniotic membrane in Ophthalmology**. 2016. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina) Faculdade de Medicina, Universidade do Porto, Porto, 2016. https://sigarra.up.pt/fmup/en/pub_geral.show_file?pi_doc_id=98844
- SANGWAN, V. S. *et al.* Amniotic membrane transplantation: A review of current indications in the management of ophthalmic disorders. **Indian Journal of Ophthalmology**, p. 251–260, 2007.
- SANTOS, A. *et al.* Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar Staphylococcus aureus: visiting a strain of clinical importance. **Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n.6, p. 413-423, 2007. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442007000600005>
- SHEN, J. *et al.* Bactericidal Effects against S. aureus and Physicochemical Properties of Plasma Activated Water stored at different temperatures. **Scientific Reports**, v. 6, p. 28505, 2016.
- SHINTANI, H. *et al.* Gas plasma sterilization of microorganisms and mechanisms of action Experimental and Therapeutic Medicine. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 1, 5, p. 731-738, 2010. Doi: 10.3892/etm.2010.136.
- SHORTT, A. J. *et al.* The effect of amniotic membrane preparation method on its ability to serve as a substrate for the ex-vivo expansion of limbal epithelial cells. **Biomaterials**, v. 30, n. 6, p. 1056–1065, 2009.
- SINGH, R. *et al.* Microbiological safety and clinical efficacy of radiation sterilized amniotic membranes for treatment of second-degree burns. **Burns**, v. 33, n. 4, p. 505–510, jun. 2007.
- ŠKET, T. *et al.* Different effects of amniotic membrane homogenate on the growth of uropathogenic Escherichia coli, Staphylococcus aureus and Serratia marcescens. **Infection and Drug Resistance**, v. 12, p. 3365–3375, 2019.
- SMITH MOLAND, E. Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolysing beta-lactamase, KPC-2, in Klebsiella pneumoniae isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 3, p. 711–714, 1 mar. 2003.
- SOUSA, A. B. A.; RAMALHO, F. L.; CAMARGO, B. Prevalência de Infecções nosocomiais ocasionadas por Klebsiella pneumoniae produtora de carbapenemase (KPC) em indivíduos hospitalizados. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 2, p. 1915–1932, 2020.
- SOUSA, C. M. M. DE *et al.* Representações Sociais das implicações legais da infecção

hospitalar e de seu controle. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 60, n. 4, p. 428–433, ago. 2007.

SPAZIANTE, M. *et al.* What are the treatment options for resistant *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing bacteria? **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 21, n. 15, p. 1781–1787, 2020.

THIRUMDAS, R. *et al.* Plasma activated water (PAW): Chemistry, physico-chemical properties, applications in food and agriculture. **Trends in Food Science and Technology**, v. 77, p. 21–31, 2018.

TRAYLOR, M. J. *et al.* Long-term antibacterial efficacy of air plasma-activated water. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 44, n. 47, p. 472001, 30 Nov. 2011.

TSIOUTIS, C.; EICHEL, V. M.; MUTTERS, N. T. Transmission of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Klebsiella pneumoniae*: the role of infection control. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 76, p. i4–i11, 2021.

UHLIG, C. E. *et al.* Long-term efficacy of glycerine-processed amniotic membrane transplantation in patients with corneal ulcer. **Acta Ophthalmologica**, v. 93, n. 6, p. e481–e487, 1 set. 2015.

UMED, O. **Klebsiella Infections**. [S.l.]: Microbiology Gulbarga University. 2002. Disponível em: <http://medicineinstantaccess.totheminds of medicine>.

VALENZUELA-VALDERRAMA, M.; GONZÁLEZ, I. A.; PALAVECINO, C. E. Photodynamic treatment for multidrug-resistant Gram-negative bacteria: Perspectives for the treatment of *Klebsiella pneumoniae* infections. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 28, p. 256–264, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.08.012>

VLAD, I. E. *et al.* Bacterial inhibition effect of plasma activated water. **Romanian Reports in Physics**, v. 71, n. 2, p. 1–12, 2019.

VON VERSEN-HÖYNCK, F. *et al.* The Influence of Different Preservation and Sterilisation Steps on the Histological Properties of Amnion Allografts – Light and Scanning Electron Microscopic Studies. **Cell and Tissue Banking**, v. 5, n. 1, p. 45–56, 2004.

WASSMER, C. H.; BERISHVILI, E. Immunomodulatory Properties of Amniotic Membrane Derivatives and Their Potential in Regenerative Medicine. **Current Diabetes Reports**, v. 20, n. 8, 2020.

XIANG, Q. *et al.* Influence of organic matters on the inactivation efficacy of plasma-activated water against *E. coli* O157:H7 and *S. aureus*. **Food Control**, v. 99, p. 28–33, May 2019.

XU, Z. *et al.* In vitro antimicrobial effects and mechanisms of direct current air-liquid discharge plasma on planktonic *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in liquids. **Bioelectrochemistry**, v. 121, p. 125–134, jun. 2018.

XU, Z. *et al.* In vitro antimicrobial effects and mechanism of air plasma-activated water on *Staphylococcus aureus* biofilm. **Plasma Processes and Polymers**, v. 17, n. 8, p. 1900270, 29 ago. 2020.

YONG, H. I. *et al.* An innovative curing process with plasma-treated water for production of loin ham and for its quality and safety. **Plasma Processes and Polymers**, v. 15, n. 2, p. 1700050, fev. 2018.

YOSHIDA, Y. *et al.* Intravenous Administration of Human Amniotic Mesenchymal Stem Cells in the Subacute Phase of Cerebral Infarction in a Mouse Model Ameliorates Neurological Disturbance by Suppressing Blood Brain Barrier Disruption and Apoptosis via Immunomodulation. **Cell Transplantation**, v. 30, p. 1–14, 2021.

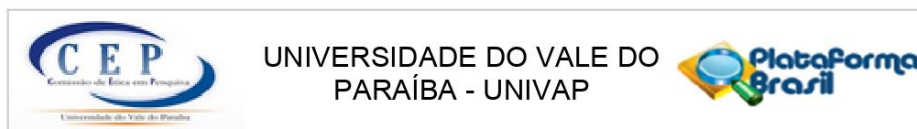
ZHAO, J. *et al.* Effect of plasma-activated solution treatment on cell biology of *staphylococcus aureus* and quality of fresh lettuces. **Foods**, v. 10, n. 12, p. 1–12, 2021a.

ZHAO, Y. *et al.* Inactivation efficacy of plasma-activated water: influence of plasma treatment time, exposure time and bacterial species. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 56, n. 2, p. 721–732, 19 fev. 2021b.

ZHOU, R. *et al.* Cold atmospheric plasma activated water as a prospective disinfectant: the crucial role of peroxynitrite. **Green Chemistry**, v. 20, n. 23, p. 5276–5284, 2018.

ZHOU, R. *et al.* Plasma-activated water: generation, origin of reactive species and biological applications. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 53, n. 30, p. 303001, 22 jul. 2020.

ANEXO A – Aprovação do Projeto no Comitê de Ética

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DA ÁGUA ATIVADA POR PLASMA SOBRE MEMBRANA AMNÍOTICA

Pesquisador: Felipe Almeida

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 55388322.9.0000.5503

Instituição Proponente: Fundação Valeparaibana de Ensino

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

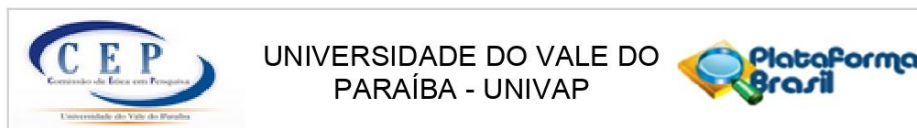
Número do Parecer: 5.277.784

Apresentação do Projeto:

O projeto é uma pesquisa de natureza básica, quantitativa, explicativa e experimental. A amostra consistirá de 5 placentas humanas, as quais serão utilizadas para obtenção da membrana amniótica humana (MA), a qual será processada em fragmentos com dimensões de 1,5cm. Para o processamento dos testes, serão preparados inóculos de *E. coli*, *S. aureus* e *K. pneumoniae* com concentração de 10⁶ UFC/mL para contaminar as Membranas Amnióticas. A ativação da água será realizada utilizando um plasma de modelo gliding arc com um fluxo de gás de 6 L/min de argônio + 4L/min de ar comprimido. A MA será contaminada pelo Inóculo e depois a PAW será colocada na MA para testar a ação antimicrobiana. Quatro grupos serão utilizados para cada microrganismo estudado, sendo os grupos: controle positivo, controle negativo, teste temperatura ambiente, teste refrigerado. Cada grupo será semeado com a finalidade de contar as Unidades Formadoras de Colônias e verificar a eficácia do tratamento, além disso, para verificar a viabilidade celular com azul de Tripán utilizando Câmara de Neubauer®, a morfologia das bactérias após o tratamento também irá ser analisado utilizando a técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Todos os resultados serão analisados com o método ANOVA, sendo considerado estatisticamente significativo $p < 0,05$.

As informações elencadas nos campos apresentação do projeto, objetivo de pesquisa e avaliação dos riscos e benefícios foram retiradas do arquivo Informações Básicas do Projeto (formulário)

Endereço: Av. Shishima Hifumi, 2911 - Bloco 11 (IP&D), Sala 13
Bairro: Urbanova **CEP:** 12.244-000
UF: SP **Município:** SAO JOSE DOS CAMPOS
Telefone: (12)3947-1111 **Fax:** (12)3947-1149 **E-mail:** cep@univap.br



Continuação do Parecer: 5.277.784

online da Plataforma Brasil).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

O objetivo desse trabalho é analisar a ação antimicrobiana da água ativada por plasma (PAW) em Membrana Amniótica (MA) contaminada com *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*, a fim de possibilitar seu uso em diferentes aplicações.

Objetivo Secundário:

1) Analisar e comparar a ação antimicrobiana das diferentes águas ativadas por plasma; 2) Verificar diferença de pH e condutividade após a ativação das águas; 3) Avaliar qual microrganismo sofreu uma maior redução de UFC/mL e viabilidade celular após a exposição a PAW

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A colheita da placenta é um procedimento seguro, e a equipe de enfermagem que está conversando com você foi informada sobre a pesquisa em questão, e estará à disposição para esclarecer dúvidas. Pode haver risco de quebra de sigilo profissional, mas este será minimizado pela não divulgação do seu nome ou das iniciais do seu nome, e somente pelo uso de código numérico. Pode haver o risco de constrangimento, pelo fato da gestante ser abordada em um momento que antecede o parto, porém este será minimizado pela forma de abordagem realizada pela enfermeira em ambiente reservado, no que se refere ao aceite ou não da participação e da liberação dos dados da carteirinha do pré-natal referente aos exames sorológicos.

Benefícios:

O benefício do estudo será fornecer dados sobre a eficácia antimicrobiana da água ativada por plasma, seja ela em temperatura ambiente ou refrigerada sobre bactérias frequentemente encontradas nas contaminações de Membrana Amniótica, reduzindo o custo de esterilização dessas amostras, possibilitando assim seu uso em diferentes aplicações visto que os microrganismos têm demonstrado resistência aos tratamentos convencionais.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Ver 'Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações'.

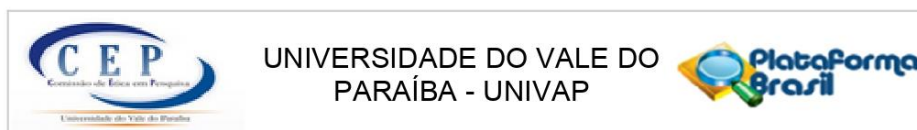
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Ver 'Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações'.

Recomendações:

O CEP-Univap mudou da sala 33 para a sala 13 (demais informações de endereço, e-mail e

Endereço: Av. Shishima Hifumi, 2911 - Bloco 11 (IP&D), Sala 13
Bairro: Urbanova **CEP:** 12.244-000
UF: SP **Município:** SAO JOSE DOS CAMPOS
Telefone: (12)3947-1111 **Fax:** (12)3947-1149 **E-mail:** cep@univap.br



Continuação do Parecer: 5.277.784

telefone permanecem inalterados). Solicitamos atualizar esta informação no TCLE (trocar 33 por 13).

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Em parecer de 17 de fevereiro de 2022, este CEP requereu ajustes em dois itens, correlacionados:

1. No TCLE, destacar autorização para acesso à carteirinha do pré-natal (informação estava presente, mas pouco evidenciada) e 2. Se, no caso da participante não autorizar acesso a carteirinha, isto constituiria critério de exclusão (ou a pesquisa poderia ter continuidade sem esta informação).

A pesquisadora fez os devidos ajustes nestes dois pontos: redigiu o TCLE dando maior destaque ao convite para acesso à carteirinha e estabeleceu a negativa a este acesso como critério de exclusão.

Considerações Finais a critério do CEP:

Segundo a Resolução 466/12 (item XI), cabe ao pesquisador "elaborar e apresentar os relatórios parciais e final", sendo esta uma responsabilidade "indelével e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais". A Resolução 510/16, no art. 28, V, reforça que cabe ao pesquisador "apresentar no relatório final que o projeto foi desenvolvido conforme delineado, justificando, quando ocorridas, a sua mudança ou interrupção." Segundo a carta circular n. 0226/CONEP/CNS, de 2010, o relatório final deve incluir (veja modelo no site do CEP-Univap):

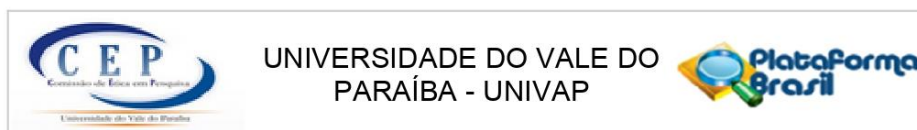
- Dados do projeto: Registro CONEP e
- Título do Projeto e Dados dos participantes: total de participantes recrutados, incluídos, selecionados, excluídos, retirados/descontinuados, concluintes (em cada centro, se for o caso, e no total). Ocorrendo participantes retirados/descontinuados, indicar principais razões disto. Ocorrendo "eventos sérios", indicar as condutas adotadas. Se houve pedido de indenização por danos causados por este estudo, indicar qual o dano e conduta tomada.

CEP-Univap - (12) 3947-1111

www.univap.br/cep

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Av. Shishima Hifumi, 2911 - Bloco 11 (IP&D), Sala 13
Bairro: Urbanova **CEP:** 12.244-000
UF: SP **Município:** SAO JOSE DOS CAMPOS
Telefone: (12)3947-1111 **Fax:** (12)3947-1149 **E-mail:** cep@univap.br



Continuação do Parecer: 5.277.784

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1890686.pdf	20/02/2022 20:28:45		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Membrana_Final_Revisado_20_02_2022.pdf	20/02/2022 20:20:18	Felipe Almeida	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_revisado_20_02_2022.pdf	20/02/2022 20:20:03	Felipe Almeida	Aceito
Outros	Carta_resposta_CEP_20_02_2022.pdf	20/02/2022 20:19:42	Felipe Almeida	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	28/01/2022 10:50:16	Felipe Almeida	Aceito
Outros	25922_Escherichia_coli.pdf	28/01/2022 10:48:47	Felipe Almeida	Aceito
Outros	13883_Klebsiella_pneumoniae.pdf	28/01/2022 10:48:33	Felipe Almeida	Aceito
Outros	6538_Staphylococcus_aureus.pdf	28/01/2022 10:47:48	Felipe Almeida	Aceito
Outros	termo_confidencialidade_final.pdf	28/01/2022 10:47:16	Felipe Almeida	Aceito
Outros	TermoAutorizacao_hospital.pdf	28/01/2022 10:46:50	Felipe Almeida	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	28/01/2022 10:45:57	Felipe Almeida	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Membrana_Final.pdf	28/01/2022 10:45:49	Felipe Almeida	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

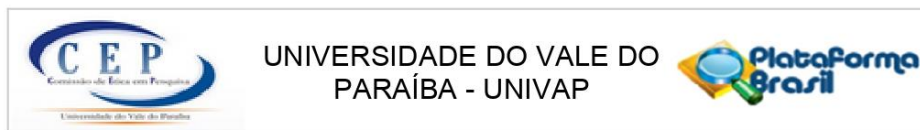
Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO JOSE DOS CAMPOS, 08 de Março de 2022

Assinado por:
Mauricio Martins Alves
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Shishima Hifumi, 2911 - Bloco 11 (IP&D), Sala 13
Bairro: Urbanova CEP: 12.244-000
UF: SP Município: SAO JOSE DOS CAMPOS
Telefone: (12)3947-1111 Fax: (12)3947-1149 E-mail: cep@univap.br



Continuação do Parecer: 5.277.784

Endereço: Av. Shishima Hifumi, 2911 - Bloco 11 (IP&D), Sala 13
Bairro: Urbanova **CEP:** 12.244-000
UF: SP **Município:** SAO JOSE DOS CAMPOS
Telefone: (12)3947-1111 **Fax:** (12)3947-1149 **E-mail:** cep@univap.br

ANEXO B: Resumo apresentado no Simpósio de Engenharia Biomédica do Vale do Paraíba



AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DA ÁGUA DE OSMOSE REVERSA ATIVADA POR PLASMA ATMOSFÉRICO SOBRE *Staphylococcus aureus*

Resumo

Introdução. A água ativada por plasma (PAW) é uma água na qual é aplicada plasma atmosférico com o objetivo de funcionalizá-la, conferindo várias aplicabilidades, sendo elas: tratamento de células cancerígenas, germinação de sementes e descontaminação de materiais e superfícies, por exemplo. **Objetivos.** Analisar a eficácia antimicrobiana da água de osmose reversa (OR) ativada por plasma, sobre cepa padrão de *Staphylococcus aureus*. **Metodologia.** Um inóculo de cepa padrão ATCC® de *S.aureus* (6538) a 10^8 UFC/ml foi preparado em caldo BHI, após esse período o inóculo foi centrifugado a 4000rpm por 15 min e o pellet, ressuscitado com 10 ml de PAW e incubado por 90 min. A metodologia foi repetida por 3 dias consecutivos, visando avaliar a continuidade da ação antimicrobiana. Para a ativação da água, 250 ml de água de OR foi tratada por 30 min com plasma *gliding arc*, utilizando 6L/min de Argônio e 4L/min de Ar comprimido, a uma distância de 2 mm da superfície da água. As amostras controle foram incubadas com água de OR sem tratamento. Imediatamente, após a incubação do microrganismo na PAW, foi preparada uma solução 1:1 da suspensão bacteriana e azul de Tripan 2% e incubada por 15 min, após esse período, um volume de 10 μ L foi analisado em Câmara de Neubauer® para quantificação da viabilidade celular. **Resultados.** A viabilidade celular após a exposição das amostras de *S.aureus* a ação da PAW, foi de 34% (Dia1), 48% (Dia2) e 67% (Dia3). **Conclusão.** Concluiu-se que ao longo do tempo ocorre uma diminuição da atividade antimicrobiana da água ativada por plasma, provavelmente devido ao consumo das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio responsáveis pela inativação de microrganismos.

Palavras-chave: Ação Antimicrobiana. *Staphylococcus aureus*. Água ativada por Plasma.

Áreas de Concentração: Plasmas Elétricos Aplicados à Engenharia Biomédica