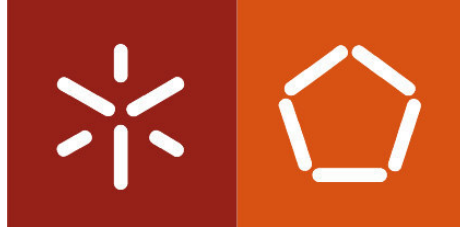




Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Zita Sofia Barbosa Avelar

**Determinação das atividades antibacteriana
e antifúngica de substratos funcionalizados**



Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Zita Sofia Barbosa Avelar

**Determinação das atividades
antibacteriana e antifúngica de substratos
funcionalizados**

Dissertação de Mestrado
Mestrado Integrado em Engenharia Biológica
Ramo Tecnologia Química e Alimentar

Trabalho realizado sob a orientação do
**Professor Doutor Engenheiro António Augusto
Martins de Oliveira Soares Vicente**
do
Engenheiro César André de Sá Martins
e da
Doutora Joana Teresa Rodrigues Martins

Outubro de 2016

Autor

Zita Sofia Barbosa Avelar

Título

Determinação das atividades antibacteriana e antifúngica de substratos funcionalizados

Orientadores

Professor Doutor António Augusto Martins de Oliveira Soares Vicente

Engenheiro César André de Sá Martins

Doutora Joana Teresa Rodrigues Martins

Ano de conclusão

2016

Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA DISSERTAÇÃO.

Universidade do Minho, 30/10/2016

Assinatura:

Agradecimentos

A realização deste projeto não teria sido possível sem o apoio e orientação de algumas pessoas a quem deixo aqui os meus sinceros agradecimentos.

Ao meu orientador, Professor António Vicente, pela sua disponibilidade e interesse em ouvir a evolução do meu trabalho e pelos conselhos que me transmitiu no decurso do mesmo. Agradeço também pela oportunidade em trabalhar no LIP, por todos os ensinamentos e pelas ótimas condições para a realização do trabalho.

À minha coorientadora Doutora Joana Martins pela ajuda preciosa no decurso do meu trabalho experimental e por toda a disponibilidade no esclarecimento das dúvidas que foram surgindo ao longo do projeto.

Ao Engenheiro César Martins pela oportunidade em estagiar na Smart Inovation, pelos ensinamentos e pela disponibilização dos meios necessários para a realização do trabalho.

À Alice pela sua dedicação, pelo esclarecimento de todas as minhas dúvidas e receios e pelo apoio constante no decurso do meu trabalho.

A todos os investigadores do LIP pelo companheirismo, ajuda e pelo excelente ambiente de trabalho.

Aos meus amigos que sempre me incentivaram e ajudaram a superar todas as dificuldades ao longo do meu trabalho, e por todo o carinho que demonstraram.

Ao Cláudio, pelo seu afeto, transmissão de confiança e cumplicidade. Pelo apoio nos momentos mais complicados e, acima de tudo, por me ajudar na realização dos meus sonhos.

A toda a minha família o meu muito obrigado por estarem sempre do meu lado e acompanharem de perto todo o meu percurso académico, e acima de tudo, por sempre acreditarem em mim.

Sem vocês nada disto seria possível.

A todos, muito obrigada!

Resumo

Com o presente trabalho pretendeu-se otimizar a concentração de quatro formulações Si (contendo princípios bactericidas e fungicidas), quando aplicadas em substratos. Atualmente estas soluções já são produzidas e comercializadas pela Smart Innovation.

Assim, o trabalho foi dividido em duas partes. Na primeira parte foram preparadas e aplicadas as formulações contendo os princípios ativos bactericidas e fungicidas nos dois tipos de materiais em estudo: têxteis e tintas (aplicadas em placas de madeira). Na segunda parte do presente trabalho foram determinadas as atividades antibacteriana e antifúngica dos substratos a testar. Nesta parte do trabalho foram realizados quatro testes distintos.

O teste Fungicida Têxtil foi realizado para a determinação da atividade antifúngica de têxteis de algodão contendo a formulação Si Pé de Atleta. Neste teste constatou-se a possibilidade de diminuição da concentração de formulação Si atualmente aplicada nos têxteis em 7,9%, mantendo a mesma eficácia antifúngica. O teste Bactericida Industrial Têxtil foi realizado para determinação da atividade antibacteriana de têxteis de algodão contendo a formulação Si Bactericida Industrial Têxtil. Após a realização deste teste concluiu-se que poderia ser aumentada a concentração de formulação Si em 14,3% para obtenção de melhores resultados relativamente à eficácia antibacteriana. O teste Bactericida Aditivo Máquina de Lavar, tal como o teste anterior, foi realizado para a determinação da atividade antibacteriana de têxteis de algodão contendo uma formulação diferente - Si Bactericida Aditivo Máquina de Lavar. Os resultados deste teste implicam um aumento da concentração de formulação Si em 40%, face à atualmente aplicada, mas com a possibilidade de uma melhoria na eficácia antibacteriana dos têxteis. Por último, o Teste Bactericida Aditivo Tintas foi executado de modo a determinar a atividade antibacteriana de tintas (aplicadas em placas de madeira) contendo a formulação Si Bactericida Aditivo Tintas e Vernizes. Neste teste, concluiu-se que seria interessante reduzir a concentração atualmente aplicada em 1% ou 2%, com a possibilidade de se verificarem os mesmos resultados em termos de eficácia antibacteriana.

De um modo geral, todas as amostras que poderão ser validadas pela empresa apresentaram resultados em termos de redução antimicrobiana acima dos 95%. Estes resultados poderão ser utilizados pela empresa com vista a uma melhoria da eficácia antimicrobiana das soluções produzidas quando aplicadas em substratos funcionalizados.

Palavras-chave: otimização, funcionalização, antibacteriano, antifúngico, têxteis, tintas

Abstract

This work aims to optimize the concentration of four Si formulations (containing bactericidal and fungicidal compounds), when applied to substrates. Currently, these formulations are already produced and commercialized by Smart Inovation.

The project was divided in two parts. In the first part, the formulations containing bactericidal and fungicidal compounds were prepared and applied in two different materials: textiles and paints (applied on wooden boards). In the second part of this work the antibacterial and antifungal activities of the substrates were determined by the performance of four different tests.

The Athlete's foot test was performed to determine the antifungal activity on textiles (cotton) containing Si Athlete's Foot formulation. The test results showed the possibility of decreasing the concentration of Si formulation that is currently applied in textiles in 7.9%, maintaining the same antifungal effectiveness. The Bactericidal Industrial Textile test was performed to determine the antibacterial activity on textiles (cotton) containing Si Bactericidal Industrial Textile formulation. This test allowed to conclude that concentration of Si formulation could be increased in 14.3% in order to obtain enhanced results regarding antibacterial effectiveness. The Bactericidal Washing Machine test, as the previous test, was carried out to determine the antibacterial activity on textiles (cotton) containing a different Si formulation- Si Bactericidal Washing Machine. The test results imply an increase of Si concentration formulation in 40%, compared to the currently applied, but with the possibility of an improved antibacterial effectiveness of textiles. Finally, the Bactericidal Paint and Varnish test was performed to determine the antibacterial activity of paints (applied on wooden boards) containing Si Bactericidal Paint and Varnish formulation. The results showed that it would be interesting to decrease the concentration of Si formulation currently applied in 1% or 2%, with the possibility of maintaining the same results in terms of antibacterial effectiveness.

In general, all samples that may be validated by the company presented results in terms of antimicrobial reduction above 95%. These results could be used by Smart Inovation to improve the antimicrobial effectiveness of solutions when applied to functionalized substrates.

Keywords: optimization, functionalization, antibacterial, antifungal, textiles, paints

Índice

Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract	ix
Lista de Abreviaturas e Siglas	xv
Índice de Figuras.....	xvii
Índice de Tabelas	xix
Esquematização da Dissertação	xxiii
I- Introdução.....	1
1. Enquadramento geral.....	2
1.1. A empresa Smart Inovation, Lda.....	2
1.1.1. A Tecnologia Si	2
1.1.2. Atividade I&D	3
1.2. Objetivos do trabalho.....	4
2. Fibras têxteis - O algodão	5
2.1. A estrutura da fibra de algodão.....	5
2.2. A biodegradação da fibra de algodão	6
2.2.1. Microrganismos responsáveis pela biodegradação do algodão	7
2.2.2. Mecanismo de biodegradação do algodão	7
3. Tintas	8
3.1. Composição das tintas	8
3.1.1. Ligante (Resinas)	8
3.1.2. Matérias pulverulentas	8
3.1.3. Solventes e diluentes	9
3.1.4. Aditivos.....	9
3.2. A biodegradação das tintas.....	9
3.2.1. Degradação bacteriana das tintas plásticas	10

4. Importância da funcionalização antimicrobiana de substratos	12
4.1. Infecções nosocomiais	13
4.1.1. Microrganismos responsáveis pelas infecções nosocomiais	14
4.1.2. Modo de transmissão das infecções nosocomiais	14
4.1.3. Prevenção das infecções nosocomiais	15
4.2. Pé de atleta.....	16
4.2.1. Tratamento do pé de atleta	18
5. Agentes antimicrobianos	19
5.1. Píritionato de zinco.....	20
5.2. Prata e derivados	20
5.3. Compostos Quaternários de Amónio (CQA).....	21
5.3.1. Cloreto de benzalcónio.....	22
5.4. Digluconato de clorexidina.....	24
6. Determinação da atividade antimicrobiana em substratos antimicrobianos.....	26
6.1. <i>NP EN 14119:2005 - Ensaio em Têxteis- Avaliação da Ação dos Microfungos....</i>	<i>27</i>
6.1.1. Método B2: Atividade antimicótica.....	27
6.2. <i>ASTM E2149 - Método de Teste Padrão para a Determinação da Atividade Antimicrobiana de Agentes Antimicrobianos Imobilizados sob Condições de Contacto Dinâmicas.....</i>	<i>28</i>
6.3. <i>ISO 22196:2007 - Plásticos - Medição da Atividade Antibacteriana em Superfícies Plásticas</i>	<i>28</i>
II- Materiais e Métodos	29
1. Teste Fungicida Têxtil.....	30
1.1. Preparação das amostras têxteis	30
1.2. Limpeza das amostras têxteis.....	31
1.3. Preparação da suspensão de esporos.....	31
1.3.1. Fungo testado	31
1.3.2. Colheita de esporos	31

1.3.3. Lavagem dos esporos por centrifugação e preparação das suspensões de trabalho	32
1.3.4. Controlo da viabilidade dos esporos.....	32
1.4. Procedimento para determinação da atividade antimicótica	32
2. Teste Bactericida Industrial Têxtil.....	34
2.1. Preparação das amostras têxteis com a formulação Bactericida Industrial Têxtil ...	34
2.2. Limpeza das amostras têxteis.....	35
2.2.1. Método 1: Descontaminação das amostras com etanol 70% (v/v)	35
2.2.2. Método 2: Esterilização das amostras têxteis por exposição à radiação UV	35
2.3. Preparação do inóculo.....	36
2.4. Procedimento para determinação da atividade antimicrobiana	36
3. Teste Bactericida Aditivo Máquina de Lavar	39
3.1. Preparação das amostras têxteis com a formulação Bactericida Aditivo Máquina de Lavar	39
4. Teste Bactericida Aditivo Tintas	41
4.1. Preparação das placas de madeira com a formulação Bactericida Aditivo Tintas ..	41
4.2. Limpeza das amostras	41
4.3. Preparação do inóculo.....	42
4.4. Inoculação das amostras a testar	42
4.5. Recuperação das bactérias das amostras a testar.....	44
4.6. Determinação do número de bactérias viáveis	44
III- Resultados e Discussão	47
1. Teste Fungicida Têxtil.....	48
1.1. Controlo da viabilidade dos esporos.....	48
1.2. Avaliação do crescimento dos fungos por análise visual	48
2. Teste Bactericida Industrial Têxtil.....	52
3. Teste Bactericida Aditivo Máquina de Lavar	62
4. Teste Bactericida Aditivo Tintas	67

IV- Conclusões e Perspetivas de Trabalho Futuro	71
1. Conclusões	72
2. Perspetivas de Trabalho Futuro	73
Bibliografia.....	75
Anexos.....	83
A. Avaliação do crescimento de <i>Aspergillus niger</i> por análise visual	84
A.1. Em amostras têxteis.....	84
A.2. Em meio agar (na zona de contacto com a amostra).....	85
B. Determinação do número de bactérias viáveis, N	86
B.1. Controlo negativo: placa de madeira com tinta não tratada (sem a formulação Si Bactericida Aditivo Tintas e Vernizes)	86
B.2. Controlo negativo: placa de vidro sem tinta (sem formulação Si)	87
C. Validação do teste Bactericida Aditivo Tintas.....	88
C.1. Controlo negativo: placa de madeira com tinta não tratada (sem a formulação Si Bactericida Aditivo Tintas e Vernizes)	88
C.2. Controlo negativo: placa de vidro sem tinta (sem formulação Si)	90
D. Cálculo da atividade antibacteriana, R	92
D.1. Placa de madeira com tinta de base aquosa mate contendo 3% e 4% em massa de Si Bactericida Aditivo Tintas e Vernizes	92
D.1.1. Controlo negativo: placa de madeira com tinta não tratada (sem a formulação Si Bactericida Aditivo Tintas e Vernizes)	92
D.1.2. Controlo negativo: placa de vidro sem tinta (sem formulação Si)	93

Lista de Abreviaturas e Siglas

AATCC	American Association of Textile Chemists and Colorists
AgNPs	Nanopartículas de Prata
APT	Associação Portuguesa de Tintas
ASTM	American Society for Testing and Materials
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CIN	Corporação Industrial do Norte, S.A.
CQA	Compostos Quaternários de Amónio
IACS	Infeções Associadas aos Cuidados de Saúde
I&D	Investigação e Desenvolvimento
ISO	International Organization for Standardization
JIS	Japanese Industrial Standards
MRSA	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
NP	Norma Portuguesa
SCDLP	Caldo de Digestão de Soja e Caseína com Lecitina e Tween 80
Si	Smart Inovation
UFC	Unidades Formadoras de Colónias
UV	Ultravioleta
WHO	World Health Organization

Índice de Figuras

Figura 1- Produtos desenvolvidos e atualmente comercializados pela Smart Inovation (reproduzido de Smart Inovation Lda., 2016).	3
Figura 2- Estrutura do algodão (adaptado de Kozlowski, 2012).	6
Figura 3- Mortalidade associada a IACS <i>versus</i> associada a acidentes de viação.	13
Figura 4- Consequências da contaminação microbiana de superfícies (adaptado de Sedlarik, 2013).	15
Figura 5- Tipos de pé de atleta: 1) Interdigital; 2) "Mocassin"; 3) Vesicular (reproduzido de Hasan et al., 2004).	17
Figura 6- Estrutura química geral dos CQA (adaptado de Al-Adham et al., 2013).	22
Figura 7- Estrutura do Cloreto de Benzalcônio (reproduzido de Al-Adham et al., 2013).	23
Figura 8- Estrutura molecular do digluconato de clorexidina (reproduzido de Das et al., 2015). 24	
Figura 9- Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana (adaptado de Gutarowska & Michalski, 2012; Microchem Laboratory, 2015; Pinho et al., 2011).	26
Figura 10- Amostra têxtil de 30 mm de diâmetro usada no teste Fungicida Têxtil.	31
Figura 11- Esquema global do teste Fungicida Têxtil:	33
Figura 12- Amostra têxtil (100% algodão) de dimensão 2,5 × 5 cm.	35
Figura 13- Esquematização do teste Bactericida Industrial Têxtil:	36
Figura 14- Erlenmeyers de teste em incubadora (Binder) a 37 °C sob agitação a 150 rpm.	37
Figura 15- Amostra têxtil (100% algodão) de dimensão 2,5 × 5 cm.	40
Figura 16- A) Placa de madeira 5 cm × 5 cm. B) Placa de madeira 5 cm × 5 cm, após aplicação da tinta de base aquosa mate contendo a solução Si Bactericida Aditivo Tintas e Vernizes.	41
Figura 17- Esquema do teste Bactericida Aditivo Tintas:	43
Figura 18- Inoculação da amostra a testar e colocação da película de cobertura (retirado de ISO, 2007):	43

Figura 19- Controlo da viabilidade dos esporos de <i>Aspergillus niger</i> . 1) e 2) no dia 0 (vista de topo e de base, respetivamente); 3) e 4) no dia 7 (vista de topo e de base, respetivamente). ...	48
Figura 20- Controlo positivo, controlo negativo e branco de amostras têxteis em contacto com <i>A. niger</i> , após 3 dias de incubação a 25 °C (vista de topo- imagem à esquerda; vista de base- imagem à direita).	49
Figura 21- 1) e 2) amostra com 17,5 g solução Si /kg têxtil- 20 lavagens; 3) e 4) amostra com 17,5 g solução Si /kg têxtil- 50 lavagens; 5) e 6) amostra com 20 g solução Si /kg têxtil- 20 lavagens; 7) e 8) amostra com 20 g solução Si /kg têxtil- 50 lavagens. As amostras 1), 3), 5) e 7) representam a vista de topo e as amostras 2), 4), 6) e 8) representam a vista de base.	49
Figura 22- Amostra têxtil não tratada mas limpa com etanol (imagem da esquerda) e amostra têxtil não tratada e não limpa com etanol (imagem da direita) após incubação com <i>A. niger</i> (vista de topo).....	50
Figura 23- Percentagem de redução da população microbiana das amostras têxteis testadas (descontaminação das amostras com etanol 70% (v/v)).	55
Figura 24- Percentagem de redução da população microbiana das amostras têxteis testadas (esterilização das amostras por exposição à radiação UV).....	60
Figura 25- Percentagem de redução da população microbiana das amostras têxteis testadas (esterilização das amostras por exposição à radiação UV).....	65

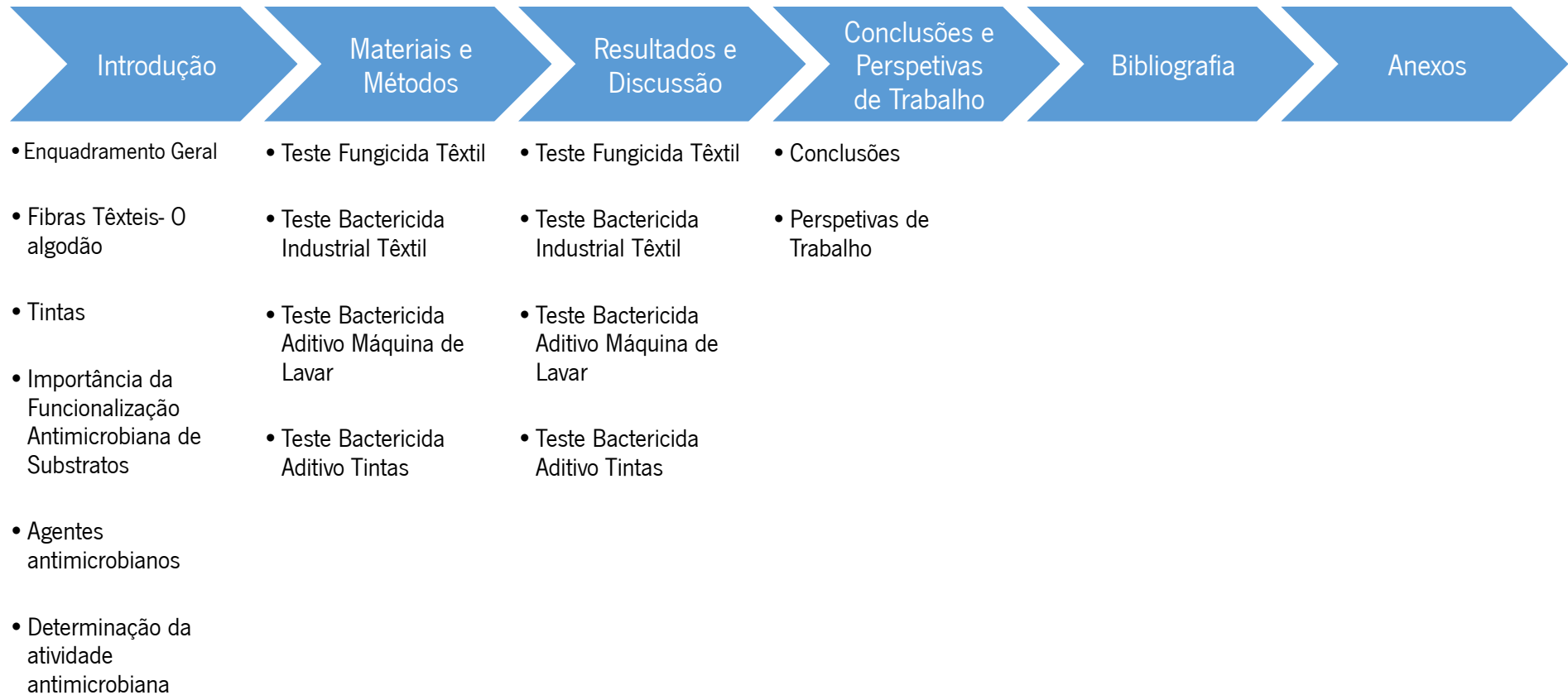
Índice de Tabelas

Tabela 1- Composição média da fibra de algodão (adaptado de Mangat, 2009)	5
Tabela 2- Principais microrganismos responsáveis pela biodegradação do algodão (adaptado de Muthu, 2014)	7
Tabela 3- Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras têxteis, em UFC/mL (valor médio), no tempo 0 h e 24 h, nas amostras tratadas (17,5 g solução Si /kg têxtil - 20 lavagens), não tratada e apenas inóculo.....	52
Tabela 4- Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras têxteis, em UFC/mL (valor médio), no tempo 0 h e 24 h, nas amostras tratadas (17,5 g solução Si /kg têxtil - 50 lavagens), não tratada e apenas inóculo.....	53
Tabela 5- Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras têxteis, em UFC/mL (valor médio), no tempo 0 h e 24 h, nas amostras tratadas (24,5 g solução Si /kg têxtil - 20 lavagens), não tratada e apenas inóculo.....	54
Tabela 6- Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras têxteis, em UFC/mL (valor médio), no tempo 0 h e 24 h, nas amostras tratadas (24,5 g solução Si /kg têxtil - 50 lavagens), não tratada e apenas inóculo.....	55
Tabela 7- Classificação da eficácia da atividade antibacteriana (adaptado de ISO, 2013).....	56
Tabela 8- Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras têxteis, em UFC/mL (valor médio), no tempo 0 h e 24 h, nas amostras tratadas (17,5 g solução Si /kg têxtil - 20 lavagens), não tratada e apenas inóculo.....	57
Tabela 9- Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras têxteis, em UFC/mL (valor médio), no tempo 0 h e 24 h, nas amostras tratadas (17,5 g solução Si /kg têxtil - 50 lavagens), não tratada e apenas inóculo.....	58
Tabela 10- Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras têxteis, em UFC/mL (valor médio), no tempo 0 h e 24 h, nas amostras tratadas (24,5 g solução Si /kg têxtil - 20 lavagens), não tratada e apenas inóculo	59
Tabela 11- Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras têxteis, em UFC/mL (valor médio), no tempo 0 h e 24 h, nas amostras tratadas (24,5 g solução Si /kg têxtil - 50 lavagens), não tratada e apenas inóculo	60
Tabela 12- Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras têxteis, em UFC/mL (valor médio), no tempo 0 h e 24 h, nas amostras tratadas (3 g solução Si /kg têxtil), não tratada e apenas inóculo	62

Tabela 13- Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras têxteis, em UFC/mL (valor médio), no tempo 0 h e 24 h, nas amostras tratadas (4 g solução Si /kg têxtil), não tratada e apenas inóculo	63
Tabela 14- Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras têxteis, em UFC/mL (valor médio), no tempo 0 h e 24 h, nas amostras tratadas (5 g solução Si /kg têxtil), não tratada e apenas inóculo	64
Tabela 15- Cálculo do número médio de bactérias viáveis ($N_{médio}$) em placas de madeira com tinta de base aquosa mate contendo 3 % e 4% em massa de Si Bactericida Aditivo Tintas e Vernizes após 24 h e nos dois controlos negativos às 0 h e 24 h	67
Tabela 16- Valores da atividade antibacteriana, R , para as duas concentrações de formulação Si Bactericida Aditivo Tintas e Vernizes testadas.....	69
Tabela 17- Esquema de avaliação do crescimento de fungos nas amostras (adaptado de CT 4 (CITEVE), 2005)	84
Tabela 18- Esquema de avaliação do crescimento de fungos no meio agar, na zona de contacto com a amostra (adaptado de CT4 (CITEVE), 2005)	85
Tabela 19- Cálculo do número de bactérias viáveis (M) em placas de madeira com tinta de base aquosa mate contendo 3 % e 4% em massa de Si Bactericida Aditivo Tintas e Vernizes após 24 h e em placas de madeira com tinta não tratada (sem a formulação Si Bactericida Aditivo Tintas e Vernizes)	86
Tabela 20- Cálculo do número de bactérias viáveis (M) em placas de madeira com tinta de base aquosa mate contendo 3% e 4% em massa de Si Bactericida Aditivo Tintas e Vernizes após 24 h e em placas de vidro sem tinta (sem formulação Si) às 0 h e 24 h	87
Tabela 21- Validação da condição 1, para o controlo negativo: placa de madeira com tinta não tratada (sem a formulação Si Bactericida Aditivo Tintas e Vernizes)	88
Tabela 22- Validação da condição 2, para o controlo negativo: placa de madeira com tinta não tratada (sem a formulação Si Bactericida Aditivo Tintas e Vernizes)	88
Tabela 23- Validação da condição 3, para o controlo negativo: placa de madeira com tinta não tratada (sem a formulação Si Bactericida Aditivo Tintas e Vernizes)	89
Tabela 24- Validação da condição 1, para o controlo negativo: placa de vidro sem tinta (sem formulação Si)	90
Tabela 25- Validação da condição 2, para o controlo negativo: placa de vidro sem tinta (sem formulação Si)	90

Tabela 26- Validação da condição 3, para o controlo negativo: placa de vidro sem tinta (sem formulação Si)	91
Tabela 27- Determinação da atividade antibacteriana, R, com o controlo negativo: placa de madeira com tinta não tratada (sem a formulação Si Bactericida Aditivo Tintas e Vernizes)	92
Tabela 28- Determinação da atividade antibacteriana, R, com o controlo negativo: placa de vidro sem tinta (sem formulação Si)	93

Esquemática da Dissertação



I- Introdução

No presente capítulo é feito, em primeiro lugar, um enquadramento do trabalho, sendo apresentada a empresa Smart Innovation e abordados os objetivos do projeto.

Nos dois subcapítulos seguintes é feito um estudo dos dois tipos de materiais utilizados nos testes antimicrobianos: fibras têxteis (algodão) e tintas. Outro subcapítulo aborda a importância dos tratamentos antimicrobianos, focando-se nas infeções nosocomiais e pé de atleta.

Inclui-se também um subcapítulo dedicado aos agentes antimicrobianos mais comuns em têxteis e tintas: piritionato de zinco, prata e seus derivados e compostos quaternários de amónio (CQA), sendo também estudados os dois compostos utilizados pela Smart Innovation: cloreto de benzalcónio e digluconato de clorexidina.

Por último, dedica-se um subcapítulo ao conhecimento das três normas em que se basearam os testes antimicrobianos: *NP EN 14119:2005 - Ensaio em Têxteis - Avaliação da Ação dos Microfungos*, *ASTM E2149 - Método de Teste Padrão para a Determinação da Atividade Antimicrobiana de Agentes Antimicrobianos Imobilizados sob Condições de Contacto Dinâmicas* e *ISO 22196:2007 - Plásticos - Medição da Atividade Antibacteriana em Superfícies Plásticas*.

1. Enquadramento geral

1.1. A empresa Smart Inovation, Lda.

A Smart Inovation, Lda. surgiu no ano 2010 como uma empresa integrada num grupo empresarial multidisciplinar sendo detentora de um vasto conhecimento na indústria das novas tecnologias que empregam princípios ativos inovadores. A empresa dispõe de uma área de 800 m² onde se inclui o laboratório de experimentação. Possui também dois reatores com uma capacidade média de produção de 100 Toneladas/mês.

Esta empresa possui uma equipa diversificada, composta por profissionais competentes como investigadores, médicos e gestores que se dedicam diariamente à identificação e desenvolvimento de soluções inovadoras. Tais soluções apresentam um grande potencial de aplicação em diversas indústrias, como a indústria têxtil, saúde, imobiliária e construção, papel, cerâmica, agricultura, veterinária e ambiente.

1.1.1. A Tecnologia Si

Esta tecnologia foi especificamente desenvolvida pela Smart Inovation sendo, portanto, inovadora e única. Trata-se de uma matriz de partículas capaz de transportar substâncias ativas. A Smart Inovation tem por base uma patente da qual é detentora N^o WO 2016/016867.

Após incorporação dessas substâncias ativas, a matriz pode ligar-se aos mais diversos materiais, tais como, têxteis, tintas, vernizes, papéis ou cerâmica, atribuindo-lhes novas propriedades e características diferenciadoras (Smart Inovation Lda., 2016).

Recorrendo a esta inovadora tecnologia, a Smart Inovation pretende combater e prevenir determinadas doenças que se revelam verdadeiros flagelos mundiais (Smart Inovation Lda., 2016).

Doenças como a Malária, o Dengue e a Febre-amarela, responsáveis por uma elevada taxa de mortalidade em todo o mundo, tendo como principais grupos de risco os idosos e as crianças e sendo responsáveis, em alguns casos, por cerca de 40% das despesas de saúde pública, poderão ser evitadas utilizando o produto Si Repel Mosquito, que pode ser aplicado nos mais diversos substratos como tintas, vernizes, mosquiteiras, entre outros (Smart Inovation Lda., 2016).

As infeções nosocomiais poderão ser evitadas utilizando o produto Si Bactericida, que não apresenta qualquer risco para a saúde humana podendo reduzir drasticamente o número de

infecções. A sua aplicação poderá ser feita, por exemplo, em roupas hospitalares, nomeadamente em uniformes de médicos e enfermeiros (Smart Inovation Lda., 2016).

A doença do pé diabético, uma consequência grave da diabetes, conduzindo, em casos extremos, à amputação do pé, poderá ser combatida com a utilização do produto Si Pé Diabético, aplicado em meias, o que permite melhorar a circulação sanguínea e prevenir as infeções típicas nos pés de diabéticos (Smart Inovation Lda., 2016).

A micose do pé, mais conhecida como pé de atleta, é uma doença frequente em todo o mundo. Estima-se que só em Portugal existam cerca de 2 milhões de portugueses com este problema. A aplicação do produto Si Pé de Atleta previne eficazmente este problema promovendo e acelerando o processo de cura (Smart Inovation Lda., 2016).

As frieiras são também causadoras de um grande desconforto, tendo-se tornado uma causa de absentismo laboral. Este problema poderá ser resolvido com a aplicação do produto Si Frieiras em luvas ou meias, de forma a aliviar o prurido e vermelhão nas zonas que estão afetadas.

Para além dos acima referidos, outros produtos vão sendo desenvolvidos e comercializados. Na **Figura 1** encontram-se alguns produtos desenvolvidos e atualmente comercializados pela Smart Inovation (Smart Inovation Lda., 2016).



Figura 1- Produtos desenvolvidos e atualmente comercializados pela Smart Inovation (reproduzido de Smart Inovation Lda., 2016).

1.1.2. Atividade I&D

A criação de soluções para os mais variados ramos da indústria torna fundamental o acompanhamento das tendências de mercado e a constante evolução dos produtos. A vontade de superar barreiras e ir ao encontro das necessidades diárias dos consumidores é o que distingue esta empresa, que apresenta como pilar fundamental a atividade de I&D. Desta forma, torna-se possível a transformação de ideias e conhecimentos em produtos comercialmente viáveis.

1.2. Objetivos do trabalho

Com a realização deste projeto pretendeu-se otimizar a concentração dos princípios ativos (formulações Si) atualmente produzidos e aplicados pela Smart Inovation em dois tipos de substratos distintos - têxteis e tintas (aplicadas em placas de madeira). Para tal, foi necessário proceder à determinação das atividades antibacteriana e antifúngica desses dois tipos de substratos funcionalizados com os princípios ativos bactericidas e fungicidas.

Assim o projeto foi dividido, fundamentalmente, em duas partes:

- A. Preparação e aplicação das formulações contendo os princípios ativos bactericidas e fungicidas em dois tipos de materiais em estudo: têxteis e tintas (aplicadas em placas de madeira);

- B. Determinação das atividades antibacteriana e antifúngica dos substratos funcionalizados: têxteis e tintas (aplicadas em placas de madeira). Foram realizados na totalidade quatro testes diferentes:
 - B.1. Teste Fungicida Têxtil: determinação da atividade antifúngica de têxteis (algodão) contendo a formulação Si Pé de Atleta;
 - B.2. Teste Bactericida Industrial Têxtil: determinação da atividade antibacteriana de têxteis (algodão) contendo a formulação Si Bactericida Industrial Têxtil;
 - B.3. Teste Bactericida Aditivo Máquina de Lavar: determinação da atividade antibacteriana de têxteis (algodão) contendo a formulação Si Bactericida Aditivo Máquina de Lavar;
 - B.4. Teste Bactericida Aditivo Tintas: determinação da atividade antibacteriana de tintas (aplicadas em placas de madeira) contendo a formulação Si Bactericida Aditivo Tintas e Vernizes.

2. Fibras têxteis - O algodão

A fibra de algodão é considerada uma das mais antigas fibras naturais e, devido às suas características diferenciadoras como, por exemplo, suavidade, força, brilho e capacidade absorvente, tem vindo a ser utilizada pelo Homem para os mais variados propósitos (Mangat, 2009).

Esta fibra é, na sua maior parte, composta por celulose, acima de 90%, assim como outros materiais não celulósicos em menor quantidade como apresentado na **Tabela 1** (Kozłowski, 2012).

Tabela 1- Composição média da fibra de algodão (adaptado de Mangat, 2009)

Componente	Quantidade (%)
Celulose	88-96
Pectinas	0,9-1,2
Proteínas	1,1-1,9
Ceras	0,3-1,0
Ácidos orgânicos	0,5-1,0
Sais minerais	0,7-1,6
Açúcares	0,3
Toxinas	0,9
Vitaminas e pigmentos	¹

2.1. A estrutura da fibra de algodão

A fibra de algodão possui uma estrutura fibrilar, sendo constituída por várias camadas. Estas camadas são designadas por parede primária, parede secundária e lúmen, como pode ser observado na **Figura 2**. A estrutura da parede primária e da camada exterior (cutícula) influenciam as propriedades da fibra, o seu processamento e a sua utilização (Kozłowski, 2012).

É nas camadas exteriores que a maior parte dos materiais não celulósicos se encontram. A camada mais externa, designada de cutícula, é constituída por ceras e gorduras, responsáveis pela lubrificação da fibra. Esta camada envolve a parede primária que, por sua vez, é constituída maioritariamente por celulose amorfa e materiais não celulósicos (hemicelulose, pectinas, proteínas e iões metálicos). A presença destes materiais e a orientação não estruturada

¹ Quantidade vestigial.

da celulose amorfa tornam esta camada aberta e desorganizada. A camada secundária é constituída apenas por celulose cristalina, conferindo-lhe uma estrutura compacta e altamente organizada (Kozlowski, 2012; Pekhtasheva et al., 2012).

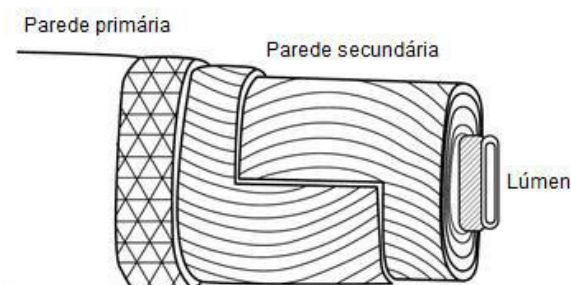


Figura 2- Estrutura do algodão (adaptado de Kozlowski, 2012).

2.2. A biodegradação da fibra de algodão

As fibras têxteis, pelas suas propriedades inerentes, são facilmente atacadas por microrganismos, sendo danificadas e perdendo todo o seu valor económico. Os microrganismos constituem uma ameaça aos materiais têxteis em todas as fases da sua produção, desde a receção da matéria-prima, transporte, armazenamento até ao produto final (Gutarowska & Michalski, 2012).

A degradação microbiana dos materiais têxteis depende, em primeiro lugar, da composição química e da estrutura da fibra (Pekhtasheva et al., 2012). As fibras naturais, como o algodão, possuem uma estrutura porosa, retendo água, oxigénio e nutrientes, originando um ambiente ideal para o crescimento dos microrganismos. A sua densidade e espessura também afetam o desenvolvimento dos microrganismos (tecidos mais finos e pouco densos são mais rapidamente biodegradados). No algodão, o teor em celulose é, como referido anteriormente, superior a 90%, sendo esta degradada em glucose por hidrólise enzimática e utilizada pelos microrganismos como substrato. Para além disto, alguns compostos como o amido, derivados de proteínas, gorduras e óleos usados nos acabamentos do têxtil podem também conduzir aos crescimentos dos microrganismos.

Assim, as fibras de origem natural, como o algodão são, sem dúvida, as mais suscetíveis de sofrer biodeterioração relativamente às de origem sintética (Boryo, 2013; Deshmukh et al., 2013; Gutarowska & Michalski, 2012).

2.2.1. Microrganismos responsáveis pela biodegradação do algodão

Os principais microrganismos responsáveis pela biodegradação do algodão são as bactérias e os fungos (Boryo, 2013).

Os fungos degradam mais facilmente as fibras de algodão em relação às bactérias, uma vez que estas necessitam de um elevado teor de humidade e saturação das fibras em todas as fases do processo de degradação (Muthu, 2014).

Os principais microrganismos capazes de degradar a fibra do algodão encontram-se representados na **Tabela 2** (Muthu, 2014).

Tabela 2- Principais microrganismos responsáveis pela biodegradação do algodão (adaptado de Muthu, 2014)

Fungos	<i>Chaetomium sp.</i> , <i>Fusarium sp.</i> , <i>Myrothecium sp.</i> , <i>Memnoniella sp.</i> , <i>Stachybotrys sp.</i> , <i>Verticillium sp.</i> , <i>Alternaria sp.</i> , <i>Trichoderma sp.</i> , <i>Penicillium sp.</i> , e <i>Aspergillus sp.</i>
Bactérias	<i>Cytohaga sp.</i> , <i>Cellulomonas sp.</i> , <i>Cellvibrio sp.</i> , <i>Bacillus sp.</i> , <i>Clostridium sp.</i> , e <i>Sporocytophaga sp.</i>

Sendo a celulose o constituinte maioritário da fibra de algodão, é natural que esta seja alvo de ataques microbianos. As bactérias e os fungos constituem, maioritariamente, o grupo de microrganismos responsáveis pela hidrólise enzimática da celulose (Arshad & Mujahid, 2011; Muthu, 2014).

2.2.2. Mecanismo de biodegradação do algodão

O ataque microbiano à fibra de algodão é feito de forma distinta para as bactérias e fungos. No caso das bactérias, o ataque é feito da superfície do material até às camadas internas da fibra. Contrariamente, os fungos iniciam o ataque nas fissuras à superfície ou nas extremidades da fibra e a degradação ocorre das camadas mais internas para as camadas mais externas do material (Arshad & Mujahid, 2011; Muthu, 2014).

O crescimento microbiano e consequente produção de metabolitos secundários nas fibras têxteis como o algodão é manifestado por aparecimento de coloração, defeitos, quebra das fibras, deterioração das propriedades mecânicas (força e alongação), redução do peso molecular, libertação de substâncias voláteis e mudança na cristalinidade da fibra (Deshmukh et al., 2013; Pekhtasheva et al., 2012).

3. Tintas

As tintas são misturas uniformemente dispersas, com uma viscosidade que pode variar entre um líquido fino e uma pasta semi-sólida, consistindo, basicamente, num pigmento suspenso num líquido de transporte, como um óleo ou água. A tinta pode ser aplicada com um rolo ou outro utensílio próprio numa camada fina em vários materiais como madeira, metal ou até mesmo pedra. Embora tenha como objetivo principal a proteção da superfície contra a corrosão, oxidação ou condições ambientais, a tinta constitui também um elemento decorativo no nosso dia-a-dia (Obidi et al., 2009).

As tintas podem ser classificadas de várias formas, nomeadamente quanto ao tipo de solvente utilizado, dependendo do critério considerado (Yamanaka et al., 2006).

No contexto do projeto apenas serão abordadas as tintas de base aquosa ou tintas plásticas, como são usualmente designadas (CIN, 2016b). As tintas de base aquosa diferem das tintas de base solvente por libertarem um cheiro menos intenso e menos agressivo, o que conduz a uma aplicação do produto menos incomodativa. Para além disso, são necessários menores cuidados na aplicação da tinta (CIN, 2016a).

3.1. Composição das tintas

De acordo com a Associação Portuguesa de Tintas (APT), (2016) as tintas são constituídas por quatro grandes grupos de constituintes: o ligante (resinas), os solventes e diluentes, os aditivos e as matérias pulverulentas (pigmentos e cargas) (Ravikumar et al., 2012; Yamanaka et al., 2006):

3.1.1. Ligante (Resinas)

O ligante, que consiste em uma ou mais resinas que constituem o veículo fixo, é o constituinte mais importante das tintas, sendo responsável pelas principais propriedades do revestimento, como o brilho, a resistência química e física, a secagem e a aderência. As tintas são classificadas de acordo com a natureza química do ligante.

3.1.2. Matérias pulverulentas

- **Pigmentos**

Os pigmentos são responsáveis pela atribuição da cor e opacidade e brilho à tinta, influenciando muitas das suas propriedades, como a durabilidade, resistência à corrosão ou resistência ao fogo. Para que o pigmento seja eficaz necessita de se encontrar uniformemente disperso por todo o solvente.

- **Cargas**

As cargas correspondem a minerais industriais, como o carbonato de cálcio, cuja função principal é o controlo e melhoria de certas propriedades da tinta como o brilho, reologia da tinta, dureza, resistência à riscagem, permeabilidade ou aderência.

3.1.3. Solventes e diluentes

Os solventes são compostos orgânicos ou água responsáveis pela dissolução da resina e pelo aspeto líquido da tinta com uma determinada viscosidade. As tintas de base aquosa utilizam como fase volátil a água adicionada a uma pequena quantidade de líquidos orgânicos compatíveis. No final da aplicação da tinta o solvente evapora, restando uma camada de filme seco sobre o material. Na escolha de um solvente deve ser tida em consideração a solubilidade das resinas, viscosidade e a forma de aplicação. Os diluentes reduzem a viscosidade da tinta a um nível adequado para a sua aplicação.

3.1.4. Aditivos

Neste grupo encontram-se alguns componentes que são adicionados em quantidades muito baixas (geralmente <5%) com o propósito de controlar certas propriedades da tinta. Alguns exemplos de aditivos são: agentes dispersantes/molhantes, secantes, biocidas, inseticidas ou inibidores de corrosão.

3.2. A biodegradação das tintas

A tinta é, como referido anteriormente, constituída por um conjunto de componentes como resinas, solventes, pigmentos e aditivos. Alguns destes componentes, nomeadamente compostos orgânicos presentes na formulação, são utilizados pelos microrganismos como fonte de substrato, causando a degradação da tinta tanto na sua forma líquida como no filme seco (Ishfaq et al., 2015; Obidi et al., 2009).

Um exemplo disso são as tintas acrílicas de base aquosa, que representam um alvo para os microrganismos, uma vez que contêm derivados de celulose como agentes espessantes, constituindo uma fonte de carbono para alguns grupos de microrganismos (Bellotti et al., 2015).

Existem inúmeros fatores que influenciam a degradação das tintas pelos microrganismos, tais como: o ambiente de anaerobiose no interior do recipiente da tinta, a natureza orgânica dos constituintes da tinta, a qualidade microbiana do recipiente e o nível de higiene durante o processo de fabrico da tinta (Obidi et al., 2009).

Embora as tintas estejam sujeitas a biodegradação por parte de bactérias, fungos ou algas (Ishfaq et al., 2015; Ravikumar et al., 2012), no contexto do projeto, será apenas abordado o ataque bacteriano a tintas, com ênfase nas tintas de base aquosa.

3.2.1. Degradação bacteriana das tintas plásticas

As tintas são suscetíveis a crescimento bacteriano quando se encontram no estado líquido, com possibilidade de ocorrer posterior colonização dando origem, eventualmente, a determinados problemas no interior do recipiente que irá conter a tinta no final do processo. A tinta poderá perder a sua espessura caso o agente espessante, normalmente éter de celulose, seja atacado por enzimas (celulases) produzidas pelas bactérias, introduzidas na formulação devido à contaminação de certos componentes (Ravikumar et al., 2012).

As bactérias são os principais microrganismos responsáveis pela degradação das tintas plásticas quando estas se encontram no interior do recipiente (Florio & Miller, 2004; Melzer Chemicals Pvt. Ltd., n.d.).

Considerando que as tintas de base aquosa são majoritariamente constituídas por água e compostos orgânicos, certos microrganismos, como bactérias, conseguem multiplicar-se rapidamente, deteriorando a tinta. Assim, e considerando que o ataque bacteriano é praticamente inevitável, torna-se altamente aconselhável a adição de conservantes na tinta que é armazenada num recipiente, especialmente se esta não for usada brevemente. A contaminação pode ter origem nas matérias-primas ou na própria água, caso esta não seja submetida a um procedimento de esterilização (Florio & Miller, 2004).

O ataque bacteriano às tintas apenas ocorre sob determinadas condições, nomeadamente de temperatura, humidade e radiação (Ravikumar et al., 2012).

Nas tintas, os géneros de bactérias mais comumente isoladas são *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Escherichia*, *Micrococcus*, *Serratia* e *Aeromonas*, incluindo

bactérias anaeróbicas como *Bacteroides*, *Clostridium*, *Desulphovibrio* e *Bifidobacterium* (Obidi et al., 2009).

Relativamente ao mecanismo de biodegradação das tintas este inicia-se com a aderência das bactérias e formação de um biofilme, um complexo ecossistema microbiano, com posterior degradação dos derivados de celulose pelas celulases, sendo o produto final da degradação utilizado pelas bactérias como fonte de carbono. Ao contrário do crescimento de fungos e algas, que é bem visível a olho nu, o crescimento de bactérias pode estar a ocorrer numa superfície que, aparentemente, se encontra limpa, a uma taxa suficiente para causar certos efeitos adversos. Tais efeitos podem incluir a destruição da superfície seguida de rutura da tinta e deterioração/corrosão do substrato revestido ou formação de bolhas de tinta derivado a certas atividades metabólicas.

Assim que uma tinta de base aquosa é contaminada as suas propriedades físicas e químicas são alteradas, apresentando um odor fétido, redução do pH e da viscosidade, presença de gás, mudança de cor, corrosão do recipiente e gelificação da tinta. (Florio & Miller, 2004).

4. Importância da funcionalização antimicrobiana de substratos

No dia-a-dia, os microrganismos (bactérias, vírus e fungos) podem ser encontrados em qualquer parte, multiplicando-se rapidamente com a presença de nutrientes e temperatura/humidade adequadas (Liu et al., 2015).

Na natureza, o controle do crescimento deste tipo de microrganismos tem sido determinante para o desenvolvimento de espécies superiores, nomeadamente a espécie humana. Tais espécies superiores têm desenvolvido mecanismos de defesa contra microrganismos, contudo verifica-se cada vez mais que estes tipos de mecanismos nem sempre são eficientes. Desta forma, o controle das infeções microbianas tem vindo a tornar-se um problema relevante na sociedade moderna.

Geralmente, existem duas formas de impedir a infeção microbiana em seres humanos e a biodeterioração dos materiais - desinfeção e funcionalização das superfícies com agentes antimicrobianos. O uso de desinfetantes para a manutenção de um ambiente estéril tem levantado questões relativamente ao desenvolvimento de estirpes microbianas resistentes. Face a isto, a funcionalização antimicrobiana dos materiais, tem-se revelado uma alternativa aos desinfetantes atualmente utilizados e até mesmo a certos antibióticos, embora em muitos dos materiais o mecanismo de ação antimicrobiana não esteja ainda totalmente esclarecido (Siedenbiedel & Tiller, 2012).

O tratamento das superfícies de materiais e objetos comuns com agentes antimicrobianos com o intuito de prolongar a sua esterilidade é do máximo interesse em inúmeras aplicações, nomeadamente em aplicações médicas, tendo-se demonstrado em alguns estudos o não desenvolvimento de resistência microbiana a este tipo de tratamento (Milovic et al., 2005) .

Dos vários problemas originados pela presença de certos microrganismos patogénicos nos mais variados substratos destacam-se, no âmbito do projeto, as infeções nosocomiais e a micose do pé, comumente designada como pé de atleta, que serão abordados abaixo.

4.1. Infeções nosocomiais

As infeções nosocomiais correspondem às infeções adquiridas, numa unidade de cuidados de saúde, por um paciente que foi admitido por um motivo diferente da infeção.(Borkow & Gabbay, 2008).

Este tipo de infeções resultam em hospitalizações prolongadas, incapacidade a longo prazo, aumento da resistência aos antibióticos pelos microrganismos, custos elevados para os sistemas de saúde, para os pacientes e famílias e mortes (World Health Organization, 2011).

De acordo com World Health Organization (WHO), (2011) na Europa, as Infeções Associadas aos Cuidados de Saúde (IACS), nas quais se incluem as infeções nosocomiais, são responsáveis por um acréscimo de 16 milhões de dias em internamento hospitalar, por cerca de 37 000 mortes atribuídas a este tipo de infeções, contribuindo também para cerca de 110 000 mortes adicionais. Os custos associados são de aproximadamente € 7 mil milhões. Nos Estados Unidos, no ano de 2002, cerca de 99 000 mortes foram atribuídas a este tipo de infeções. Os custos associados no ano de 2004 seriam de, aproximadamente, US\$ 6,5 mil milhões.

Em Portugal, estima-se que, no ano de 2013, tenham ocorrido cerca de 4500 mortes associadas a infeções durante internamentos, o que equivale a 12 óbitos diários por esta causa, um número que se destaca quando comparado ao número de mortes associadas a acidentes de viação, como é possível constatar na **Figura 3** (Direção-Geral da Saúde, 2016).



Figura 3- Mortalidade associada a IACS *versus* associada a acidentes de viação.

O risco de contrair este tipo de infeções é universal e encontra-se presente em todas as instalações de cuidados de saúde, mas o seu verdadeiro impacto permanece ainda

desconhecido, especialmente nos designados países em desenvolvimento (World Health Organization, 2011).

4.1.1. Microrganismos responsáveis pelas infeções nosocomiais

A maior parte dos patogénicos causadores de infeções nosocomiais apresentam uma elevada resistência ao tratamento com antibióticos. Estes são, portanto, os microrganismos que mais preocupações geram, uma vez que são mais difíceis de tratar. O crescente aumento deste tipo de microrganismos um pouco por todo o mundo gera uma grande ameaça no que diz respeito à propagação e tratamento deste género de infeções (Borkow & Gabbay, 2008).

Dos microrganismos patogénicos responsáveis por este tipo de infeções destacam-se: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (Ducel & Fabry, 2002).

As infeções nosocomiais, em particular as originadas por bactérias resistentes a antibióticos, têm assim aumentado a uma taxa alarmante um pouco por todo o mundo (Borkow & Gabbay, 2010). De acordo com Borkow & Gabbay, (2010) verificou-se um aumento de 8% em 1997 para 37,2% em 2005 relativo a *S. aureus* com resistência à meticilina (MRSA) em Unidades de Cuidados Intensivos alemãs. Para além destes, são frequentemente encontrados em instalações hospitalares outros microrganismos que desenvolveram uma certa resistência como *Enterococcus* resistente à vancomicina, *Klebsiella* produtora de betalactamases de espectro alargado (enzimas responsáveis por conferir resistência a antibióticos como a penicilina e cefalosporinas) e *Enterobacter* resistente às cefalosporinas de terceira geração (Direção-Geral da Saúde (DGS), 2014).

4.1.2. Modo de transmissão das infeções nosocomiais

Num hospital, clínica ou até mesmo em centros de saúde, os profissionais de saúde utilizam uniformes específicos, como batas, que constituem uma barreira de proteção contra possíveis contaminações. Após alguns estudos, tornou-se claro que estes uniformes se encontram frequentemente contaminados com microrganismos ou agentes patogénicos, causadores de infeções e doenças (Mitchell et al., 2014). Adicionalmente, os pijamas dos pacientes, cortinas, roupas de cama e paredes constituem também uma fonte de proliferação de microrganismos ou agentes patogénicos (Borkow & Gabbay, 2008, 2010).

Acredita-se que o mais importante modo de transmissão de infecções nosocomiais ocorre por contacto direto entre um possível hospedeiro e alguém já infetado ou colonizado, por exemplo, pode ocorrer a transmissão entre dois pacientes, um já infetado pelo patogénico e um outro suscetível a infeção. Contudo, a transmissão direta está mais associada aos profissionais de saúde, cujo contacto com sangue e outros fluidos corporais é frequente, que não efetuam a higienização das mãos de forma eficiente, antes do atendimento ao paciente (Borkow & Gabbay, 2008; Mitchell et al., 2014). Uma outra forma de propagação da infeção ocorre através da transmissão endógena da própria flora do paciente a partir de uma parte do corpo do hospedeiro para outra (Borkow & Gabbay, 2008).

Embora muitas infeções nosocomiais estejam associadas ao contacto direto entre duas pessoas, alguns estudos apontam também para a transmissão de agentes patogénicos por via aérea, por exemplo ao tossir e espirrar, como possível causa deste tipo de infeções (Borkow & Gabbay, 2008).

Para além da transmissão por contacto direto entre hospedeiro e possível hospedeiro existe também a possibilidade de contaminação indireta por contacto com determinados objetos, como agulhas, compressas ou luvas contaminadas. Isto só ocorre devido à capacidade de certos microrganismos, causadores de infeções nosocomiais, de persistirem nas superfícies dos objetos durante meses, representando uma contínua fonte de contaminação. A origem das infeções nosocomiais a partir da contaminação de determinadas superfícies encontra-se esquematizada na **Figura 4** (Borkow & Gabbay, 2008; Sedlarik, 2013).



Figura 4- Consequências da contaminação microbiana de superfícies (adaptado de Sedlarik, 2013).

4.1.3. Prevenção das infeções nosocomiais

Dado que os uniformes utilizados pelos profissionais de saúde, assim como a restante roupa hospitalar, são ainda produzidos com têxteis tradicionalmente utilizados no fabrico do vestuário comum, têm surgido têxteis inovadores, como os têxteis funcionalizados com agentes antimicrobianos, que minimizam a retenção e transmissão de patogénicos por redução da carga microbiológica e sustentabilidade microbiana (Mitchell et al., 2014).

Desta forma, funcionalizando este tipo de tecidos com agentes biocidas, será reduzida uma importante fonte de contaminação por microrganismos causadores de infecções nosocomiais (Borkow & Gabbay, 2008, 2010).

Para além da funcionalização dos têxteis com agentes antimicrobianos, seria interessante, em tecidos não funcionalizados, proceder-se à sua lavagem nas lavandarias dos hospitais com determinados produtos bactericidas adicionados nas máquinas de lavar, capazes de remover as bactérias, o que conseqüentemente permite a redução de uma importante fonte de contaminação.

Para além da evolução dos têxteis, no que diz respeito à atribuição de determinadas características biocidas, também na indústria das tintas se tem tentado acompanhar esta evolução através da criação de alternativas às tintas comuns, surgindo assim as tintas detentoras de propriedades antimicrobianas, capazes de reduzir ou eliminar as causas de infecções em ambiente hospitalar e não só. Existem já inúmeros estudos relativos a princípios antimicrobianos, que poderão ser incorporados como aditivos em tintas, nomeadamente, em tintas de base aquosa com potencial para serem aplicadas em ambientes hospitalares, como por exemplo, em salas de cirurgia, cujas paredes constituem por si só uma elevada fonte agentes patogénicos, como bactérias resistentes a antibióticos (Holtz et al., 2012; Yezli et al., 2014).

Para além dos dois substratos abordados acima, muitos outros materiais poderão ser funcionalizados com agentes bactericidas, nomeadamente material hospitalar como compressas, cateteres e até implantes (Sedlarik, 2013).

4.2. Pé de atleta

Tinea Pedis, vulgarmente conhecida como pé de atleta, é uma infeção fúngica superficial da pele (dermatofitose), sendo uma das mais comuns infeções fúngicas da pele, afetando milhões de pessoas um pouco por todo o mundo (Gargiulo et al., 2012). De acordo com Gargiulo et al., (2012), a qualquer momento, cerca de 15% da população tem uma infeção fúngica nos pés e estima-se que cerca de 70% da população tenha sofrido de tinea pedis num qualquer período da sua vida.

Geralmente, é apenas detetada em 40% das ocasiões por dermatologistas, sendo nos restantes 60%, identificada por outros profissionais de saúde (Porres, 2004).

Este tipo de infeção é vulgarmente causada por três tipos de microrganismos, designados por dermatófitos: *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* e

Epidermophyton floccosum e de forma menos vulgar por *Microsporum canis* e *Trichophyton tonsurans* (Kumar et al., 2011; Porres, 2004; Sánchez et al., 2002).

O pé de atleta surge nos pés, especialmente nas plantas dos pés e entre os dedos, sendo comum em homens e menos comum em mulheres e crianças. Existem 3 tipos diferentes de pé-de-atleta: interdigital, “mocassin” e vesicular, como é possível observar na **Figura 5** (Hasan et al., 2004; Kumar et al., 2011; Shimamura et al., 2012).



Figura 5- Tipos de pé de atleta: 1) Interdigital; 2) "Mocassin"; 3) Vesicular (reproduzido de Hasan et al., 2004).

→ **Interdigital:** É o tipo mais comum da doença e manifesta-se comumente entre os dedos dos pés, mais concretamente no quarto e quinto dedo, podendo entender-se à parte inferior e superior dos dedos. É causador de uma sensação de comichão e ardor, assim como de mau odor.

→ **“Mocassin”:** Este é um tipo de pé de atleta mais severo e prolongado. A infeção envolve a planta e laterais do pé, adquirindo o formato de um chinelo ou mocassin, daí o nome. Verifica-se a ocorrência de descamação e pele espessa com inflamação. Este tipo de infeção é, geralmente, atribuído ao fungo *Trichophyton rubrum*.

→ **Vesicular:** Esta é a forma menos comum de Tinea Pedis. Pacientes com este tipo de pé de atleta apresentam pequenas bolhas no peito e planta do pé. As bolhas contendo pus em vez de líquido claro são indicativas de uma infeção secundária, geralmente provocada pela bactéria *S. aureus*.

Trata-se de uma doença altamente contagiosa, sendo mais comum em comunidades próximas, como quartéis, internatos e piscinas, quando os pés se encontram descalços. A

probabilidade de infecção aumenta em climas quentes e húmidos (locais que promovem o crescimento de fungos). A infecção ocorre por contacto direto com artroconídios (formados a partir da fragmentação das hifas), embora o uso de sapatos muito apertados também promova a propagação da infecção. O pé de atleta pode ser acompanhado por dermatofitoses em outras partes do corpo, incluindo virilhas, mãos e unhas (Kumar et al., 2011).

Existem certos fatores de risco que agravam a possibilidade de contágio como diabetes, obesidade, idade, imunossupressão, uso de calçado fechado, participação em atividades desportivas (Hasan et al., 2004; Kumar et al., 2011).

4.2.1. Tratamento do pé de atleta

Considerando que o pé de atleta é uma doença frequente em todo o mundo e altamente contagiosa torna-se importante encontrar alternativas de tratamento em relação às tradicionalmente utilizadas, como cremes antifúngicos, loções e outros medicamentos, uma vez que se tem evidenciado o desenvolvimento de uma certa resistência aos medicamentos utilizados e a possibilidade de efeitos adversos provocados pelo uso desses medicamentos.

Uma alternativa para o tratamento deste tipo de infecção consiste na utilização de meias funcionalizadas com princípios ativos fungicidas seguros para a saúde humana e eficazes contra os fungos acima mencionados, responsáveis pela doença (Gargiulo et al., 2012; Smart Inovation Lda., 2016).

5. Agentes antimicrobianos

Os agentes antimicrobianos são aplicados em têxteis e em diversas outras superfícies com o intuito de controlar o crescimento e proliferação de bactérias, fungos, mildio e algas. Este controlo permite a redução ou eliminação de certos problemas como a deterioração dos materiais e o aparecimento de determinadas complicações de saúde (White et al., 2007).

Atualmente, os agentes microbianos necessitam de cumprir certos requisitos, para que o seu uso seja aprovado. Desses requisitos destacam-se: elevada eficácia a baixas concentrações (na ordem de ppm) contra um amplo espectro de microrganismos, ausência do aumento da imunidade dos microrganismos, manutenção das propriedades e qualidade do material, ausência de efeito tóxico ou alergénico sobre a pele e mucosas humanas e animais, ausência de toxicidade para o ambiente, altamente biodegradável após aplicação, elevada estabilidade (durabilidade), ausência de ação corrosiva sobre os materiais e preço favorável (Borkow & Gabbay, 2008; Gutarowska & Michalski, 2012; Ristic et al., 2011).

A atividade dos agentes antimicrobianos está dependente de muitos fatores, sendo os mais relevantes o tempo de contacto do agente antimicrobiano com os microrganismos, a concentração de princípio ativo, o tipo de microrganismo, a presença de impurezas orgânicas e inorgânicas, a temperatura, humidade e pH (Gutarowska & Michalski, 2012).

O mecanismo de ação sobre os microrganismos está altamente dependente do tipo de agente antimicrobiano selecionado. Este mecanismo, geralmente, pode ocorrer de várias formas: o agente antimicrobiano pode causar problemas no correto funcionamento da membrana citoplasmática e parede celular, pode ocorrer inativação (desnaturação) de proteínas, inibição da atividade enzimática ou da síntese de lípidos, redução da síntese de ADN e muitos outros tipos de danos nas células dos microrganismos e agentes patogénicos (Gao & Cranston, 2008; Gutarowska & Michalski, 2012).

Existem inúmeros agentes antimicrobianos que poderão ser aplicados nos mais diversos materiais, como têxteis e tintas. De acordo com alguns autores, existem três compostos antimicrobianos que são principalmente aplicados a têxteis e tintas e que serão abordados ao longo deste capítulo: piritionato de zinco, prata e seus derivados e compostos quaternários de amónio (CQA), sendo abordado o CQA mais comumente utilizado: cloreto de benzalcónio (Roden, 2010; Windler et al., 2013). Para além destes compostos antimicrobianos será também apresentado um importante agente fungicida: digluconato de clorexidina, com ação reconhecida contra os principais fungos causadores do pé de atleta.

5.1. Piritionato de zinco

O piritionato de zinco é um agente antimicrobiano de amplo espectro, sendo eficaz contra o crescimento de bactérias, fungos, algas e mildio.

Durante décadas este composto era utilizado majoritariamente como fungicida em produtos para a caspa, como os champôs anticaspa, contudo, hoje em dia, as propriedades antimicrobianas deste composto são utilizadas nos mais diversos materiais, como têxteis, tintas, adesivos e revestimentos para pavimentos. Devido à sua baixa solubilidade em água, é também conhecido como um poderoso pigmento anti-incrustante (Ranke & Jastorff, 2000; Windler et al., 2013).

O principal volume de consumo de piritionato de zinco está associado principalmente a aspectos de saúde, como o tratamento da caspa, da dermatite seborreica e da psoríase (Windler et al., 2013).

Foram feitos alguns estudos e propostos alguns mecanismos de ação do piritionato de zinco sobre os microrganismos. Um desses estudos, efetuado por Ermolayeva & Sanders, (1995) acerca do modo de ação do piritionato de zinco em fungos consistiu na seleção de células de *Neurospora crassa* e utilização de métodos eletrofisiológicos, tendo sido demonstrado, através da técnica patch-clamp², que o piritionato de zinco inibe a ATPase na membrana plasmática deste fungo. A ATPase é responsável pelo transporte de prótons do citoplasma da célula para o meio externo, gerando assim um gradiente eletroquímico que é usado para bombear nutrientes essenciais para o interior da célula. A inibição da ATPase leva ao colapso do gradiente eletroquímico através da membrana, cessando a absorção de nutrientes e ocorrendo, eventualmente, morte celular (Kappock et al., 2005).

5.2. Prata e derivados

A prata é um dos metais mais utilizados pela indústria têxtil, embora outros metais como o zinco, cobre e cobalto demonstrem também ação contra microrganismos (Dhende et al., 2012; Ristic et al., 2011).

Este metal pode ser comercializado sob várias formas, que constituem uma fonte de íons de prata (Ag^+) e que demonstram atividade antimicrobiana. Existem três grupos principais

² A técnica de patch-clamp permite medir as correntes iônicas através da membrana, enquanto a tensão é mantida sob controle experimental (White et al., 1999).

de antimicrobianos de prata ou derivados: permutadores de iões de prata, como zeólitos de prata; sais de prata, como cloreto de prata (AgCl) e a própria prata (Windler et al., 2013).

A descoberta de Ag^+ como responsável pela atividade antimicrobiana é relativamente recente e o mecanismo exato de ação antimicrobiana da prata é ainda incerto, contudo, têm vindo a ser propostas algumas hipóteses acerca do mesmo. De acordo com Windler et al., (2013), a eficácia da prata como agente antimicrobiano é causada por múltiplos mecanismos incluindo a forte ligação de iões Ag^+ com os grupos dissulfureto (S-S) e sulfidrilo (-SH) encontrados nas proteínas das paredes celulares microbianas tornando-as inativas, e a disrupção dos processos metabólicos normais por substituição de iões metálicos essenciais como Ca^{2+} e Zn^{2+} pelos iões Ag^+ , conduzindo à morte da célula (Knetsch & Koole, 2011).

As nanopartículas de prata (AgNPs) têm vindo a ser investigadas nas últimas décadas devido às suas propriedades singulares, nomeadamente boa ação antimicrobiana e potenciais aplicações. O uso de partículas de prata à escala nano começou a ser investigado devido aos fracos resultados da prata em contacto com o sangue e tecidos humanos. Existem várias evidências que demonstram a importância dos iões Ag^+ para a atividade antimicrobiana destas nanopartículas (Durán et al., 2015; Knetsch & Koole, 2011; Ren & Liang, 2015).

O mecanismo de ação das AgNPs é ainda especulativo, embora já tenham sido propostas algumas hipóteses. Apesar de a eficácia das mesmas ser comprovada, existem algumas dúvidas relativamente à sua biocompatibilidade, sendo que os estudos que têm vindo a ser desenvolvidos neste campo são ainda inconclusivos (Knetsch & Koole, 2011).

A exposição humana à prata e AgNPs gera alguns efeitos adversos, nomeadamente a coloração permanente e irreversível da pele e olhos em tons de cinza azulado, devido aos depósitos de aglomerados de prata, sendo esta condição designada de argiria ou argirose. Para além desta condição, a exposição prolongada do ser humano a este metal ou compostos gera outros efeitos tóxicos, como danos nos rins e fígado, irritação dos olhos, da pele, das vias respiratórias e mudança nas células sanguíneas (Knetsch & Koole, 2011; SCENIHR, n.d.).

5.3. Compostos Quaternários de Amónio (CQA)

Os CQA são tensoativos catiónicos. Estes compostos apresentam a estrutura química geral observada na **Figura 6**, em que R pode representar um átomo de hidrogénio, um grupo alquilo simples ou um grupo alquilo substituído por outros grupos funcionais, e X representa um anião (Buffet-Bataillon et al., 2012).

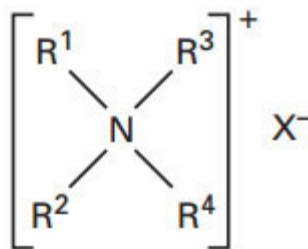


Figura 6- Estrutura química geral dos CQA (adaptado de Al-Adham et al., 2013).

Os CQA, especialmente aqueles que contêm uma cadeia de 8 a 18 átomos de carbono (apresentam atividade antimicrobiana), têm vindo a ser largamente utilizados como agentes antissépticos e desinfetantes ao longo dos anos, nomeadamente na indústria dos têxteis, alimentar, médica e farmacêutica.

O comprimento da cadeia alquílica e o número de grupos alquilo na molécula que contém um átomo de azoto (N) com carga positiva influenciam a atividade antimicrobiana destes compostos (Al-Adham et al., 2013; Buffet-Bataillon et al., 2012; Ristic et al., 2011). Compostos com um comprimento da cadeia alquílica inferior a 4 e superior a 18 átomos de carbono são considerados inativos (Buffet-Bataillon et al., 2012).

O mecanismo exato de ação dos CQA sobre os microrganismos ainda não se encontra totalmente elucidado contudo alguns estudos defendem que estes compostos danificam a membrana celular dos microrganismos. De acordo com Ristic et al., 2011 e Windler et al., 2013 a ação antimicrobiana destes compostos resulta de interações atrativas entre o composto quaternário de amónio, positivamente carregado e a membrana negativamente carregada da parede celular microbiana. Os QCA ligam-se assim de forma irreversível aos fosfolípidos e proteínas da membrana, resultando na interrupção das funções essenciais da parede celular e, conseqüentemente, na interrupção da atividade proteica. Os CQA também afetam a habilidade de multiplicação do ADN bacteriano.

Os CQA demonstram ser eficazes contra uma ampla variedade de microrganismos, como bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos alguns vírus, leveduras e protozoários (Dhende et al., 2012; Fazlara & Ekhtelat, 2012).

5.3.1. Cloreto de benzalcónio

De entre os QCA atualmente existentes, o mais comum é o cloreto de benzalcónio (Buffet-Bataillon et al., 2012).

Este é um agente antimicrobiano sintético de amplo espectro de ação antimicrobiano, utilizado desde 1935 e cuja estrutura se encontra representada **Figura 7** (Fazlara & Ekhtelat, 2012; Marple et al., 2004).

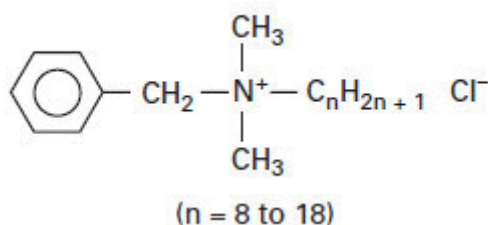


Figura 7- Estrutura do Cloreto de Benzalcônio (reproduzido de Al-Adham et al., 2013).

Os CQA têm inúmeras aplicações, entre as quais se destacam as aplicações na área médica e farmacêutica. Alguns produtos como os produtos de higiene infantil, cosméticos, *sprays* nasais e soluções oftalmológicas que contêm cloreto de benzalcônio na sua formulação foram já introduzidos para serem utilizados por profissionais de saúde (Buffet-Bataillon et al., 2012; Marple et al., 2004).

Na medicina humana o cloreto de benzalcônio tem sido utilizado como desinfetante da pele em concentrações na gama de 0,1 a 0,2% e como agente conservante em gotas oftálmicas numa concentração de 0,01 a 0,02% (European Medicines Agency, 1997, 2014). Os CQA apresentam uma maior ação antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, com concentrações letais numa gama tão baixa como 0,0005%. Por outro lado, para bactérias Gram-negativas, são necessárias concentrações mais elevadas (0,0033%) para que seja exercido um efeito letal sobre as mesmas, principalmente por causa da sua membrana exterior relativamente impermeável, embora algumas estirpes da bactéria *P. aeruginosa* tenham tendência para ser altamente resistentes. Contudo, células deste microrganismo, que é altamente resistente ao cloreto de benzalcônio, podem ainda assim sofrer alterações na sua estrutura quando em presença deste composto. Os vírus são também mais resistentes aos CQA, nomeadamente ao cloreto de benzalcônio, em relação às bactérias e fungos (Al-Adham et al., 2013; Cay et al., 2010; Osman et al., 2012). Os esporos bacterianos são considerados resistentes a este composto (Khajavi et al., 2007).

Um inquérito sobre conservantes aplicados em preparações oftálmicas, realizado em 2009 e envolvendo 17 Estados membros da União Europeia (UE), revelou que o cloreto de benzalcônio estava presente em 74% dessas preparações. Em relação ao uso clínico de *sprays* nasais que contêm este composto, este parece ser seguro e bem tolerado, tanto a curto como longo prazo (European Medicines Agency, 2014; Marple et al., 2004).

O cloreto de benzalcônio apresenta também atividade antifúngica, sendo que os esporos de dermatófitos, causadores de doenças como o Pé de Atleta, são suscetíveis a este composto (Spickler, 2013). Adicionalmente, misturas de CQA, nas quais se incluem este composto demonstraram ser eficazes contra vários dermatófitos, nomeadamente, *Trichophyton rubrum*, *Epidermophyton floccosum* e *Trichophyton mentagrophytes*, principais responsáveis pelo pé de atleta (Biresaw & Mittal, 2011).

5.4. Digluconato de clorexidina

O digluconato de clorexidina é um composto catiónico, cuja estrutura molecular se encontra representada na **Figura 8**, com uma atividade superficial similar à do cloreto de benzalcônio, embora a sua atividade seja muito menos acentuada. Trata-se de um composto solúvel em água, podendo ser utilizado como conservante em soluções aquosas (Marquardt, 1992). A sua elevada taxa de utilização deve-se ao largo espectro de ação e eficácia e baixa irritabilidade (McDonnell & Russel, 1999).

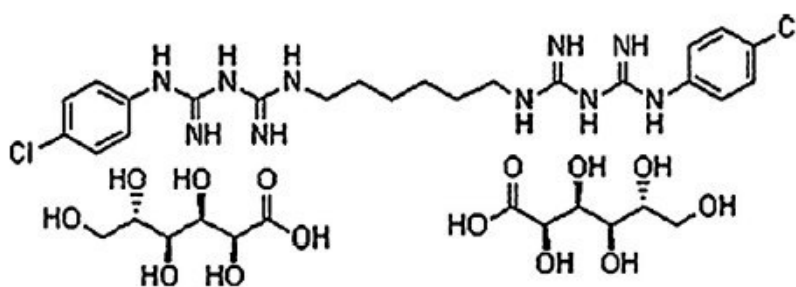


Figura 8- Estrutura molecular do digluconato de clorexidina (reproduzido de Das et al., 2015).

Este composto pode ser utilizado como antisséptico, desinfetante e conservante, sendo aplicado em produtos farmacêuticos, médicos e cosméticos, nomeadamente em desinfetantes de mãos, antissépticos bucais e dentífricos (Balagopal & Arjunkumar, 2013; Segrè et al., 2012).

Tem também vindo a ser utilizado na prevenção de infeções do cordão umbilical em recém-nascidos e inflamações das gengivas (Lang & Brex, 1986; Segrè et al., 2012).

O digluconato de clorexidina é pouco absorvido no trato gastrointestinal, sendo excretado nas fezes e exibindo uma toxicidade muito baixa. Adicionalmente, não existem evidências da ocorrência de formação de substâncias cancerígenas (Balagopal & Arjunker, 2013).

Relativamente ao mecanismo de ação do digluconato de clorexidina, considera-se que este seja muito semelhante ao dos QCA. Geralmente, baixas concentrações deste composto afetam a integridade da membrana citoplasmática, ao nível da camada fosfolipídica (Mathur et al., 2011; McDonnell & Russel, 1999).

O digluconato de clorexidina é um agente bactericida, tendo sido estudada a sua interação e absorção por bactérias. Tal estudo permitiu concluir que a absorção deste composto pelas bactérias *E. coli* e *S. aureus* é muito rápida e dependente da concentração do composto e do pH (McDonnell & Russel, 1999).

Este composto, tratando-se de um agente antimicrobiano, apresenta também uma boa ação inibitória sobre o crescimento de fungos, nomeadamente dermatófitos, responsáveis pelo pé de atleta (Balagopal & Arjunker, 2013; Mathur et al., 2011).

6. Determinação da atividade antimicrobiana em substratos antimicrobianos

A crescente procura de materiais detentores de propriedades antimicrobianas conduziu ao desenvolvimento de métodos para determinação e avaliação da sua atividade antimicrobiana.

O desenvolvimento de métodos específicos e rigorosos para a determinação e avaliação da atividade antimicrobiana permitiu às empresas e outras entidades a adoção de protocolos universalmente aceites, permitindo uma melhor interação de negócios, o cumprimento de determinadas leis e regulamentos pertinentes e a rapidez de entrada de produtos inovadores no mercado em conformidade com os seus requisitos (Instituto Português da Qualidade, 2009).

Os métodos de avaliação da atividade antimicrobiana de substratos funcionalizados, nomeadamente têxteis, plásticos, tintas com agentes antimicrobianos são, geralmente, divididos em dois grupos, que se encontram apresentados na **Figura 9**.

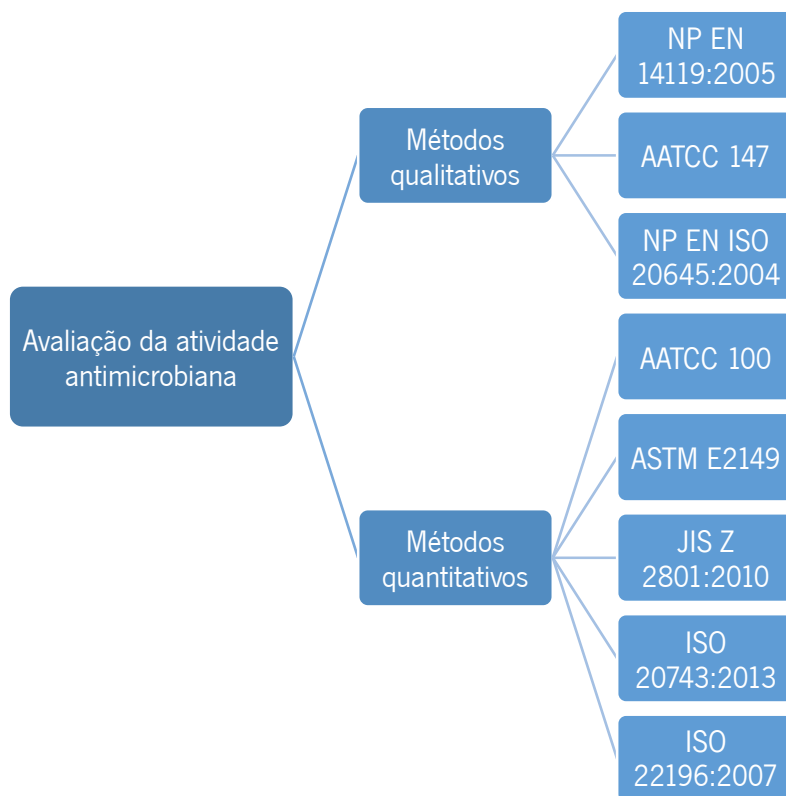


Figura 9- Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana (adaptado de Gutarowska & Michalski, 2012; Microchem Laboratory, 2015; Pinho et al., 2011).

Os métodos qualitativos, também conhecidos como testes de difusão em agar, que permitem classificar qualitativamente o desempenho do substrato de teste e os métodos

quantitativos que permitem avaliar a eficácia antimicrobiana quantificando a redução da carga microbiana no substrato de teste (Gutarowska & Michalski, 2012).

Os testes de difusão em agar são testes de desempenho fácil, rápido e úteis quando existe um elevado número de amostras para testar. São considerados testes muito similares uns aos outros, consistindo em colocar a amostra a testar em contacto com agar inoculado com bactérias ou fungos, sendo o efeito da atividade antimicrobiana avaliado de acordo com a área onde não é observado qualquer crescimento de microrganismos (Gutarowska & Michalski, 2012; Pinho et al., 2011).

Por outro lado, os testes quantitativos embora sejam mais dispendiosos em termos de tempo e material permitem determinar o nível da atividade antimicrobiana do substrato a testar. Neste tipo de testes, o inóculo microbiano é colocado em contacto com o substrato a testar e incubado por um período de tempo definido. Após o tempo de incubação, a avaliação da atividade antimicrobiana é realizada através do cálculo da percentagem de redução da carga microbiana, relativamente a um controlo negativo (substrato não tratado com agente antimicrobiano) (Gutarowska & Michalski, 2012; Pinho et al., 2011; Ristic et al., 2011).

No âmbito do projeto, serão abordadas apenas três normas: *NP EN 14119:2005*, *ASTM E2149* e *ISO 22196:2007*, (normas utilizadas pela empresa) sendo os testes antibacterianos e antifúngicos baseados nas mesmas.

6.1. NP EN 14119:2005 - Ensaios em Têxteis- Avaliação da Ação dos Microfungos

A *NP EN 14119:2005* é uma norma europeia que descreve métodos para determinar a resistência dos têxteis à ação de microfungos. Os resultados dos ensaios experimentais são avaliados por exame visual. Os ensaios são aplicados a qualquer fibra têxtil.

Dos quatro métodos de ensaio descritos na norma foi selecionado para o trabalho o método B2: Atividade antimicótica, pois trata-se de um ensaio especialmente recomendado para a avaliação de tratamentos antimicóticos (CT 4 (CITEVE), 2005).

6.1.1. Método B2: Atividade antimicótica

O método B2, inserido na norma, utiliza um meio agar completo com esporos de fungos incorporados, nomeadamente de *Aspergillus niger* ou *Chaetomium globosum*. As amostras têxteis, tratadas com um agente antifúngico, são colocadas em contacto com esse meio

inoculado. O efeito antimicótico da amostra é avaliado pelo grau de crescimento do fungo e pela medida de uma possível zona sem crescimento de fungos em redor da amostra (CT 4 (CITEVE), 2005).

6.2. ASTM E2149 - Método de Teste Padrão para a Determinação da Atividade Antimicrobiana de Agentes Antimicrobianos Imobilizados sob Condições de Contacto Dinâmicas

Este método foi concebido para avaliar quantitativamente a eficácia de uma amostra com um agente antimicrobiano imobilizado não difusível por agitação quando este é colocado em contacto com um microrganismo em solução. Todas as amostras (tratada, não tratada e inóculo) sofrem agitação em recipientes próprios de modo a assegurar um bom contacto entre as bactérias e a fibra, tecido ou outro substrato durante o período de teste, que pode ser de uma hora ou de vinte e quatro horas, de acordo com o definido pelo investigador.

Os microrganismos comumente utilizados neste método são *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *S. aureus*, embora o método possa ser adaptado a outros microrganismos (ASTM, 2001; Microbe Investigations Switzerland (mis), 2014).

6.3. ISO 22196:2007 - Plásticos - Medição da Atividade Antibacteriana em Superfícies Plásticas

Esta norma internacional especifica um método de avaliação da atividade antibacteriana em materiais plásticos e similares, não devendo ser utilizada para avaliar os efeitos de propagação bacteriana em materiais plásticos e similares sem tratamento antibacteriano.

Neste método, o organismo de teste é inoculado na superfície do material a testar, e colocado a incubar durante vinte e quatro horas. Imediatamente após a inoculação e após o tempo de teste, procede-se à contagem dos microrganismos na superfície do material de modo a avaliar a atividade antimicrobiana do substrato de teste.

Para a realização dos testes deverão ser utilizados os microrganismos *E. coli* ou *S. aureus* (ISO, 2007).

II- Materiais e Métodos

Este capítulo encontra-se dividido em quatro partes distintas, relativas aos quatro testes realizados: teste Fungicida Têxtil, teste Bactericida Industrial Têxtil, teste Bactericida Aditivo Máquina de Lavar e teste Bactericida Aditivo Tintas.

Em cada uma das partes é feita referência aos procedimentos selecionados e respetivos materiais utilizados em cada um dos mesmos.

A composição de cada uma das formulações Si Bactericida e Si Pé de Atleta, utilizadas nos testes referidos acima, não se encontra incluída neste capítulo uma vez que a empresa prima pela confidencialidade em relação à formulação dos seus produtos.

1. Teste Fungicida Têxtil

O teste Fungicida Têxtil foi realizado com base na *NP EN 14119:2005- Ensaios em têxteis- Avaliação da Ação dos Microfungos*, mais concretamente, no método B2: Atividade antimicótica.

1.1. Preparação das amostras têxteis

Para a funcionalização das amostras têxteis utilizadas neste teste foi necessário preparar uma solução de Si Pé de Atleta (Fungicida). Partindo dessa formulação seria necessário aplicar 35 g dessa formulação em dois tecidos e 40 g em outros dois. Contudo, de modo a simular o que ocorreria num contexto industrial (*pick-up* de 50%) e como termo de comparação com os resultados obtidos pela Smart Inovation, introduziu-se apenas 50% do seu peso num banho de água (1 L). Assim, as amostras têxteis testadas continham, na realidade, 17,5 g solução Si /kg têxtil e 20 g solução Si /kg têxtil, sendo que ao longo do trabalho são referidas apenas as concentrações após o *pick-up*. Procedeu-se à submersão dos quatro tecidos (100% algodão), com a dimensão de uma folha A4, em cada um dos banhos, com posterior secagem em estufa a 60 °C.

Após a secagem das amostras, estas foram enviadas para uma lavandaria industrial de forma a serem submetidas a lavagens sucessivas. Na lavandaria cada ciclo de lavagem tinha uma duração de 45 minutos, temperatura de banho de 40 °C e 1 g/L de detergente SKIP. Duas amostras de tecido com 17,5 g solução Si /kg têxtil foram lavadas 20 vezes e duas amostras com a mesma concentração foram lavadas 50 vezes. O mesmo procedimento de lavagens foi efetuado para as quatro amostras com 20 g solução Si /kg têxtil.

Para o controlo positivo preparou-se uma amostra têxtil com 15 g solução Si /kg têxtil (considerado o *pick-up* de 50%), não tendo sido efetuadas quaisquer lavagens.

Por fim, foram obtidas amostras de 30 mm de diâmetro, como indicado na **Figura 10**, de acordo com a NP EN 14119: 2005.



Figura 10- Amostra têxtil de 30 mm de diâmetro usada no teste Fungicida Têxtil.

1.2. Limpeza das amostras têxteis

As amostras têxteis tratadas (17,5 g solução Si /kg têxtil - 20 e 50 lavagens e 20 g solução Si /kg têxtil - 20 e 50 lavagens), o controlo positivo (amostra têxtil tratada com eficácia fungicida garantida - 0 lavagens), o controlo negativo (pedaço de algodão não tratado), e um controlo adicional (amostra têxtil não tratada - 0 lavagens), foram previamente mergulhadas numa mistura etanol-água (70:30) durante 1 a 2 s e colocadas a secar numa estufa, previamente limpa com etanol 70% (v/v), a 45 °C durante 4 h.

Após a secagem, todas as amostras têxteis foram armazenadas em placas de Petri devidamente seladas, durante pelo menos 72 h à temperatura ambiente.

1.3. Preparação da suspensão de esporos

1.3.1. Fungo testado

O fungo utilizado no teste foi o *Aspergillus niger*, estirpe número 92.13, cedido pela Micoteca da Universidade do Minho e cultivado em tubo em meio Extrato de Malte Agar (VWR Chemicals).

O fungo foi recolhido do tubo de cultura com o auxílio de uma ansa estéril e colocado em placas de Petri estéreis (900 mm) contendo meio Agar Dextrose de Batata (VWR Chemicals) previamente esterilizado em autoclave, a 121 °C durante 15 min. As placas foram colocadas numa estufa de incubação com controlo de temperatura a 25 °C durante 5 dias.

1.3.2. Colheita de esporos

Colocou-se, em duas placas de Petri contendo o fungo esporulado, cerca de 5 mL de uma solução Tween 80 a 0,05% (v/v) esterilizada em autoclave, a 121 °C durante 15 min.

Raspou-se a superfície da cultura esporulada com uma ansa estéril, de forma a obter uma suspensão aquosa de esporos. Agitou-se suavemente cada uma das placas de Petri de forma a dispersar os esporos no líquido. Cada uma das suspensões de esporos foi filtrada e recolhida num tubo Falcon através de um *cheesecloth*, de forma a remover fragmentos de micélios.

1.3.3. Lavagem dos esporos por centrifugação e preparação das suspensões de trabalho

O tubo Falcon contendo a suspensão de esporos foi centrifugado a 3000 rpm durante 5 min, tendo-se desprezado o líquido sobrenadante e suspenso de novo o resíduo lavado em 5 mL de uma solução Tween 80 a 0,05% (v/v).

O número de esporos foi analisado recorrendo à câmara de Neubauer e a concentração de esporos foi ajustada a 10^6 esporos/mL (suspensão de trabalho).

1.3.4. Controlo da viabilidade dos esporos

Para o controlo da viabilidade dos esporos, colocou-se uma gota da suspensão de trabalho em duas placas de Petri contendo meio Agar Dextrose de Batata estéril, tendo-se colocado a incubar numa estufa a 25 °C durante 7 dias.

1.4. Procedimento para determinação da atividade antimicótica

Preparou-se meio Agar Dextrose de Batata estéril, deixou-se o meio arrefecer até uma temperatura de 45 °C, ao qual se adicionou a suspensão de esporos (1 mL de suspensão de trabalho de 10^6 esporos/mL em 100 mL de meio Agar Dextrose de Batata). Misturou-se bem o meio de forma a melhor distribuir os esporos e verteu-se para placas de Petri de modo a ficar com 5 mm de altura. Deixou-se arrefecer e solidificar.

Foram testadas quatro amostras têxteis (17,5 g solução Si /kg têxtil: 20 e 50 lavagens e 20 g solução Si /kg têxtil: 20 e 50 lavagens). Cada uma das amostras, com aproximadamente 30 mm de diâmetro, foi colocada em contacto com a superfície do meio solidificado com o auxílio de uma pinça estéril. O ensaio foi efetuado em triplicado para cada uma das amostras a testar, tendo-se adicionalmente feito um controlo positivo (amostra com eficácia garantida-fungicida/0 lavagens, de 30 mm de diâmetro), controlo negativo (pedaço de algodão não tratado, de 30 mm de diâmetro), dois controlos adicionais (amostra têxtil não tratada/ limpa com etanol e amostra têxtil não tratada/não limpa com etanol, ambas com 30 mm de diâmetro)

e um branco (placa de Petri contendo apenas meio Agar Dextrose de Batata sem fungos incorporados). As placas foram colocadas a incubar numa estufa a 25 °C durante 3 dias.

Relativamente ao teste da atividade antimicótica, encontra-se representado na **Figura 11** o esquema global do teste fungicida têxtil no dia da realização do teste (dia 0).

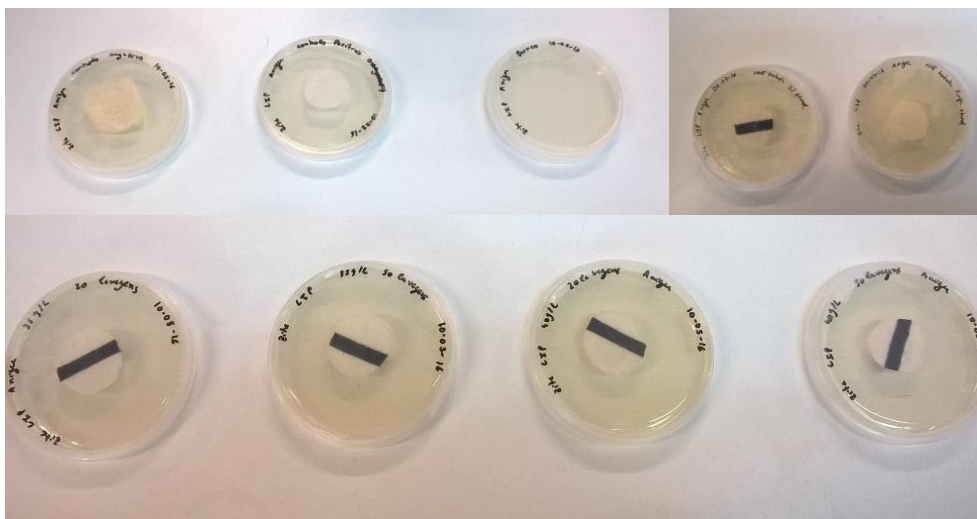


Figura 11- Esquema global do teste Fungicida Têxtil:

- primeira fila, da esquerda para a direita: controlo negativo (pedaço de algodão não tratado), controlo positivo (amostra com eficácia garantida- fungicida/0 lavagens), branco (placa de Petri contendo meio Agar Dextrose de Batata não inoculado) e dois controlos adicionais (amostra têxtil não tratada e não limpa com etanol e amostra têxtil não tratada e limpa com etanol);
- segunda fila, da esquerda para a direita: amostra 17,5 g solução Si /kg têxtil - 20 lavagens, amostra 17,5 g solução Si /kg têxtil - 50 lavagens, amostra 20 g solução Si /kg têxtil - 20 lavagens e amostra 20 g solução Si /kg têxtil - 50 lavagens.

A avaliação da atividade fungicida das amostras testadas foi feita de acordo com três parâmetros (Anexo A):

- ➔ Determinação da zona de inibição (não crescimento de fungos) em torno da amostra;
- ➔ Avaliação do crescimento de fungos na amostra, tanto na face que esteve em contacto com o agar como na face superior;
- ➔ Avaliação do crescimento de fungos no agar, na zona de contacto com a amostra.

2. Teste Bactericida Industrial Têxtil

O teste Bactericida Industrial Têxtil foi realizado com base no método *ASTM E2149 – Método de Teste Padrão para a Determinação da Atividade Antimicrobiana de Agentes Antimicrobianos Imobilizados sob Condições de Contacto Dinâmicas*.

2.1. Preparação das amostras têxteis com a formulação Bactericida Industrial Têxtil

Para a funcionalização das amostras têxteis utilizadas neste teste foi necessário preparar uma solução de Si Bactericida Industrial Têxtil. Partindo dessa formulação seria necessário aplicar 25 g dessa formulação em dois tecidos e 35 g em outros dois. Contudo, introduziu-se apenas cerca de 70% do seu peso num banho de água (1 L), de forma a simular o que ocorre em contexto industrial (*pick-up* de 70%). Procedeu-se à submersão dos quatro tecidos (100% algodão), com a dimensão de uma folha A4, em cada um dos banhos, com posterior secagem em estufa a 60 °C. De modo a comparar os resultados com os obtidos pela Smart Inovation, foi necessário considerar o *pick-up* já referido anteriormente de 70%. Assim, as quatro amostras a testar continham, na realidade, 17,5 e 24,5 g solução Si /kg têxtil, sendo que ao longo do trabalho são referidas apenas as concentrações após o *pick-up*.

Após a secagem das amostras, estas foram enviadas para uma lavandaria industrial de forma a serem submetidas a lavagens sucessivas. Na lavandaria cada ciclo de lavagem tinha uma duração de 45 minutos, temperatura de banho de 40 °C e 1 g/L de detergente SKIP. Duas amostras de tecido com 17,5 g solução Si /kg têxtil foram lavadas 20 vezes e duas amostras com a mesma concentração foram lavadas 50 vezes. O mesmo procedimento de lavagens foi efetuado para as quatro amostras com 24,5 g solução Si /kg têxtil.

Foram obtidas amostras têxteis de peso $\pm 0,1$ g, representadas na **Figura 12**, que corresponde a uma dimensão de, aproximadamente, $2,5 \times 5$ cm, como indicado no método *ASTM E2149*.



Figura 12- Amostra têxtil (100% algodão) de dimensão 2,5 × 5 cm.

2.2. Limpeza das amostras têxteis

O método *ASTM E2149 – Método de Teste Padrão para a Determinação da Atividade Antimicrobiana de Agentes Antimicrobianos Imobilizados sob Condições de Contacto Dinâmicas* não inclui nenhuma etapa de limpeza das amostras têxteis, incluindo o controlo (amostra têxtil não tratada de dimensão 2,5 × 5 cm). Contudo, devido à necessidade de efetuar o teste partindo de amostras têxteis não contaminadas, foram testados dois métodos de limpeza distintos de modo a reduzir ou eliminar a carga microbiana: descontaminação das amostras com etanol 70% (v/v) e a esterilização das amostras por exposição à radiação Ultravioleta (UV).

2.2.1. Método 1: Descontaminação das amostras com etanol 70% (v/v)

A descontaminação das amostras têxteis foi feita à semelhança do teste Fungicida Têxtil (capítulo 1.2), de acordo com a *NP EN 14119:2005*. Assim, as amostras foram previamente mergulhadas numa mistura etanol-água (70:30) durante 1 a 2 s e colocadas a secar numa estufa, previamente limpa com etanol 70% (v/v), a 45 °C durante 4 h. Posteriormente, as amostras foram armazenadas em placas de Petri devidamente seladas, durante pelo menos 72 h à temperatura ambiente.

2.2.2. Método 2: Esterilização das amostras têxteis por exposição à radiação UV

A esterilização das amostras têxteis foi feita recorrendo a uma câmara de fluxo laminar com lâmpada UV. As amostras têxteis foram colocadas em placas de Petri, expostas à radiação ultravioleta, durante 30 min. Finalmente, as placas foram fechadas e seladas com parafilme, de forma a garantir as condições de esterilidade.

2.3. Preparação do inóculo

Foi utilizada uma estirpe de *E. coli* CECT 736, que se encontrava criopreservada em glicerol 20% (-80 °C), da coleção do Centro de Engenharia Biológica, sendo posteriormente mantida em placas de Nutriente Agar (VWR Chemicals).

Com o auxílio de uma ansa estéril foram colhidas colónias isoladas de *E. coli* e suspensas em 100 mL de Caldo Nutriente (VWR Chemicals), esterilizado em autoclave a 121 °C durante 15 min. O inóculo foi colocado numa incubadora (Binder) a 37 °C, com agitação (150 rpm) durante 18 h.

Após 18 h de cultivo, e efetuando um pré-teste que consistiu na leitura da absorvância e respetiva contagem em placa, verificou-se que, para um valor de absorvância de $0,15 \pm 0,01$ a 470 nm, a cultura se encontrava numa gama de concentração de 10^9 UFC/mL. Deste modo, e sendo necessário padronizar a solução de trabalho na gama de $1,5$ a $3,0 \times 10^5$ UFC/mL foi feita uma diluição do inóculo com solução de Ringer (VWR Chemicals) estéril, até se obter essa concentração³.

2.4. Procedimento para determinação da atividade antimicrobiana

Após a preparação da solução de trabalho, esterilizaram-se cinco erlenmeyers de 250 mL, três deles para colocar a amostra tratada, um para conter a amostra não tratada (controlo) e um para conter apenas o inóculo. Na **Figura 13** encontra-se representado o esquema do teste Bactericida Industrial Têxtil.



Figura 13- Esquematização do teste Bactericida Industrial Têxtil:

T1, T2 e T3- Amostra têxtil tratada; NT- Amostra têxtil não tratada; I- Inóculo.

³ De acordo com a nota 5, inserida no método ASTM E2149, é possível adequar o ajuste da concentração final de acordo com o microrganismo selecionado.

Adicionou-se a cada um dos erlenmeyers cerca de 50 mL da solução de trabalho, e após uma agitação durante 1 min, retirou-se 100 µL da solução de trabalho, efetuando-se diluições decimais em solução de Ringer. 100 µL foram colocados em meio Nutriente Agar, em duplicado, e espalhou-se a solução sobre a superfície do agar (método de espalhamento). As placas de Petri foram colocadas numa incubadora a 37 °C durante 24 a 48 h. Esta amostragem é considerada o tempo de contacto “0 h”.

Após a amostragem do tempo de contacto “0 h”, as três amostras têxteis tratadas e a amostra não tratada foram introduzidas nos respetivos erlenmeyers com o auxílio de uma pinça estéril e os erlenmeyers foram colocados sob agitação (150 rpm) numa incubadora (Binder) a 37 °C durante 24 h, como representado na **Figura 14**.



Figura 14- Erlenmeyers de teste em incubadora (Binder) a 37 °C sob agitação a 150 rpm.

Após 24 h de incubação, realizou-se a amostragem referente ao tempo de contacto “24 h”. Para tal, efetuaram-se diluições decimais em solução de Ringer e contagem em placa, em duplicado, pelo método de espalhamento. As placas de Petri, contendo meio Nutriente Agar, foram posteriormente colocadas numa incubadora a 37 °C durante 24 a 48 h. Após este período foi feito o cálculo das UFC/mL através da **Equação 1**:

$$\frac{\text{UFC}}{\text{mL}} = \frac{\text{número de colónias} \times \text{fator diluição}}{\text{volume plaqueado}}$$

Equação 1

A determinação da atividade antimicrobiana foi feita através do cálculo da percentagem (%) de redução, de acordo com a **Equação 2**:

$$\text{Redução, \%} \left(\frac{\text{UFC}}{\text{mL}} \right) = \frac{B - A}{B} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

em que,

A - UFC/mL no erlenmeyer que contém a amostra tratada após o período de teste;

B - UFC/mL no erlenmeyer que contém a amostra tratada imediatamente antes da adição da mesma, que corresponde à amostragem do tempo de contacto “0 h”.

3. Teste Bactericida Aditivo Máquina de Lavar

O teste Bactericida Aditivo Máquina de Lavar foi realizado com base no método *ASTM E2149- Standard Test Method for Determining the Antimicrobial Activity of Immobilized Antimicrobial Agents Under Dynamic Contact Conditions*.

O procedimento de limpeza das amostras têxteis foi igual ao reportado no capítulo 2.2.2. Método 2: Esterilização das amostras têxteis com radiação UV (Teste Bactericida Industrial Têxtil). Relativamente à preparação do inóculo e determinação da atividade antimicrobiana, o procedimento foi o mesmo do teste Bactericida Industrial Têxtil referido nos subcapítulos 2.3 e 2.4, respetivamente. Assim, será apenas referido o procedimento de preparação das amostras têxteis.

3.1. Preparação das amostras têxteis com a formulação Bactericida Aditivo Máquina de Lavar

Para o teste Bactericida Aditivo Máquina de Lavar foi formulada uma solução Si Bactericida Aditivo Máquina de Lavar. Foram preparadas na totalidade seis amostras de tecido (100% algodão) de tamanho A4: duas amostras com 3 g solução Si /kg têxtil, duas amostras com 4 g solução Si /kg têxtil e outras duas com 5 g solução Si /kg têxtil.

Para as amostras com 3 g solução Si /kg têxtil, foram introduzidas duas amostras têxteis numa máquina de lavar doméstica comum, juntamente com roupa, tendo sido colocado um peso de 15 g da formulação Si Bactericida Aditivo Máquina de Lavar no compartimento do amaciador, uma vez que a máquina continha 5 kg de têxtil, correspondente ao conjunto roupa e amostras têxteis a testar (ou seja, 5 kg têxtil \times 3 g/kg têxtil=15 g de aditivo). De igual modo, foi adicionado um peso de 20 g e 25 g, da mesma formulação, no compartimento do amaciador para as amostras com 4 g solução Si /kg têxtil e 5 g solução Si /kg têxtil, respetivamente. Posteriormente, as amostras foram secas à temperatura ambiente, juntamente com a restante roupa.

Foram obtidas amostras têxteis de aproximadamente 0,1 g, representadas na **Figura 15**, que corresponde a uma dimensão de, aproximadamente, 2,5 \times 5 cm, como indicado no método *ASTM E2149*.



Figura 15- Amostra têtil (100% algodão) de dimensão 2,5 × 5 cm.

4. Teste Bactericida Aditivo Tintas

O teste Bactericida Aditivo Tintas foi baseado na *ISO 22196:2007- Plásticos- Medição da Atividade Antibacteriana em Superfícies Plásticas*.

4.1. Preparação das placas de madeira com a formulação Bactericida Aditivo Tintas

Para a preparação das amostras a serem utilizadas no teste Bactericida Aditivo Tintas foi preparada a formulação Si Bactericida Aditivo Tintas e Vernizes. Numa primeira fase, introduziu-se uma determinada quantidade de tinta de base aquosa mate em dois gobelés, tendo sido registado o seu peso. Após a pesagem dos gobelés, adicionou-se a cada um deles cerca de 3% e 4% em massa da formulação Si Bactericida Aditivo Tintas e Vernizes, tendo sido feita uma boa homogeneização da mistura de modo a garantir a incorporação do aditivo na tinta. Após a mistura dos dois componentes, cada uma das formulações de tinta (3% e 4% em massa) contendo Si Bactericida Aditivo Tintas e Vernizes foi aplicada a placas de madeira (de dimensão 5 cm × 5 cm, como indicado na norma ISO 22196), como se pode observar na **Figura 16**, com posterior secagem em estufa a 60 °C.

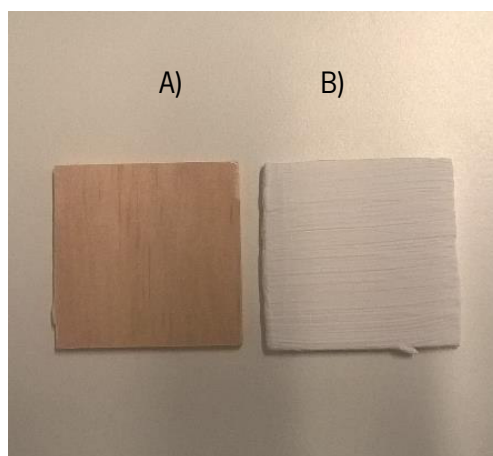


Figura 16- A) Placa de madeira 5 cm × 5 cm. B) Placa de madeira 5 cm × 5 cm, após aplicação da tinta de base aquosa mate contendo a solução Si Bactericida Aditivo Tintas e Vernizes.

4.2. Limpeza das amostras

De acordo com a *ISO 22196*, caso seja necessário fazer a limpeza das amostras a testar antes da realização do teste, a mesma deve ser feita com etanol 70% (v/v). Contudo, o uso deste solvente deve ser evitado uma vez que este pode provocar a dissolução do revestimento ou

eluição dos componentes da tinta. Assim, de forma a evitar que tal ocorresse e existindo ainda a necessidade de esterilizar todas as amostras de teste, incluindo os controlos, foi selecionado um outro método para esterilização das amostras: esterilização com radiação UV.

A esterilização das amostras a testar foi então feita recorrendo a uma câmara de fluxo laminar com lâmpada UV. As amostras a testar foram colocadas em placas de Petri, expostas à radiação ultravioleta, durante 30 min. Finalmente, as placas foram fechadas e seladas com parafilme, de forma a garantir as condições de esterilidade.

4.3. Preparação do inóculo

Para o teste Bactericida Aditivo Tintas foi utilizada uma estirpe de *E. coli* CECT 736.

Com o auxílio de uma ansa estéril foram colhidas colónias isoladas de *E. coli* e suspensas em 100 mL de Caldo Nutriente (VWR Chemicals). O inóculo foi colocado numa incubadora (Binder) a 37 °C, com agitação (150 rpm) durante 18 h.

À semelhança do teste Bactericida Industrial Têxtil (capítulo 2.3), verificou-se que, após 18 h de cultivo, a cultura se encontrava numa gama de concentração de 10^9 células/mL. Deste modo, e sendo necessário padronizar a solução de trabalho na gama de 2,5 a 10×10^5 células/mL com uma concentração alvo de 6×10^5 UFC/mL foi feita uma diluição do inóculo com Caldo Nutriente (VWR Chemicals) até se obter essa concentração.

4.4. Inoculação das amostras a testar

Após a preparação do inóculo foi necessário colocar cada amostra a testar em placas de Petri distintas, de acordo com o esquema da **Figura 17**. Na totalidade foram colocadas, em placas de Petri distintas, três placas de madeira tratadas com tinta de base aquosa mate contendo 3% em massa de Si Bactericida Aditivo Tintas e Vernizes, três placas de madeira tratadas com tinta de base aquosa mate contendo 4% em massa de Si Bactericida Aditivo Tintas e Vernizes, seis placas de vidro sem tinta com a mesma dimensão das placas de madeira (controlo negativo utilizado pela Smart Inovation) e três placas de madeira com tinta de base aquosa não tratada (controlo negativo adicional).

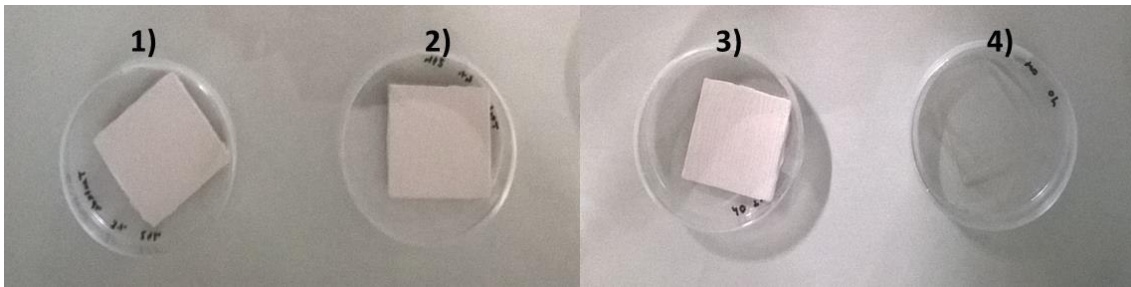


Figura 17- Esquema do teste Bactericida Aditivo Tintas:

1) Placa de madeira tratada com tinta de base aquosa mate contendo 3% em massa de Si Bactericida Aditivo Tintas e Vernizes; 2) Placa de madeira tratada com tinta de base aquosa mate contendo 4% em massa de Si Bactericida Aditivo Tintas e Vernizes; 3) Placa de madeira com tinta de base aquosa mate não tratada com formulação Si Bactericida Aditivo Tintas e Vernizes; 4) Placa de vidro sem tinta.

Finalizada a colocação das amostras nas respectivas placas de Petri foi necessário pipetar cerca de 0,4 mL do inóculo na superfície de todas as amostras e cobri-lo com um pedaço de um saco Stomacher de dimensão 4 cm × 4 cm, pressionando gentilmente de modo a evitar que este se espalhasse para além dos limites das placas. Por fim, fechou-se cada uma das placas de Petri, como esquematizado na **Figura 18**.

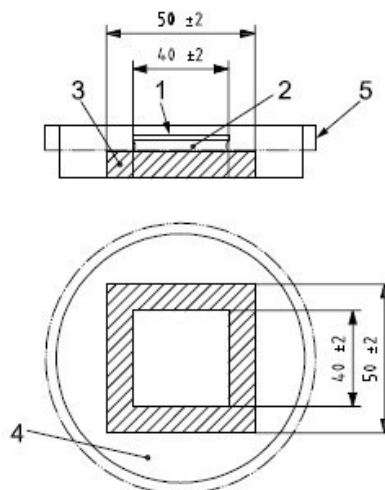


Figura 18- Inoculação da amostra a testar e colocação da película de cobertura (retirado de ISO, 2007):

1-película de cobertura; 2- inóculo (0,4 mL); 3- amostra de teste; 4- placa de Petri; 5- tampa da placa de Petri.

Após a inoculação das amostras, as placas de Petri foram colocadas numa incubadora a uma temperatura de 35 °C e humidade relativa de 84% durante 24 h. Algumas placas de vidro sem tinta e placas de madeira com tinta de base aquosa não tratada não foram colocadas na

incubadora de modo a recuperar as bactérias no tempo 0h, como descrito no subcapítulo seguinte.

4.5. Recuperação das bactérias das amostras a testar

De modo a efetuar a contagem do número de bactérias viáveis no tempo 0 h, imediatamente após a inoculação das amostras foi necessário recuperar as bactérias das placas de vidro sem tinta e das placas de madeira com tinta de base aquosa não tratada. A recuperação foi feita através da adição de 10 mL de um agente neutralizante estéril, Caldo de Digestão de Soja e Caseína com Lecitina e Tween 80 (SCDLP). De modo a garantir que o agente neutralizante lavou completamente a amostra, efetuou-se a recolha e libertação sucessivas do mesmo sobre a amostra. Por fim, foi feita a recolha do mesmo para um tubo de Falcon estéril.

Após 24 h de incubação, as bactérias foram recuperadas das restantes amostras de teste da mesma forma.

4.6. Determinação do número de bactérias viáveis

A determinação do número de bactérias viáveis nos tempos 0 h para as amostras não tratadas e 24 h para as amostras tratadas e as amostras não tratadas foi feita através de diluições decimais do agente neutralizante, recuperado em tampão fosfato salino (PBS) (Sigma-Aldrich) e respetiva contagem em placa, em duplicado. A contagem em placa foi feita pelo método de incorporação (“pour plate”), colocando-se cerca de 1 mL de cada diluição em 15 mL de meio Agar para Contagem em Placa (PCA) (VWR Chemicals). As placas foram colocadas numa incubadora a 35 °C, durante 40 a 48 h. Após este período determinou-se o número de bactérias viáveis.

A determinação da atividade antimicrobiana foi feita, em primeiro lugar, pela determinação do número de bactérias viáveis, através da **Equação 3**:

$$N = (100 \times C \times D \times V) / A \qquad \text{Equação 3}$$

em que,

N- número de bactérias viáveis recuperadas, por cm² de amostra;

C - média da contagem de placas;
D - fator de diluição para as placas contadas;
V - volume, em mL, de SCDLP adicionado à amostra;
A - área superficial, em mm², da película de cobertura.

Nota: Deve calcular-se a média geométrica para cada triplicado das amostras tratadas e não tratadas. Caso não sejam contadas quaisquer colónias em nenhuma das placas, deve registar-se o número de colónias contadas como $<V$ (em que *V* é o volume, em mL, de SCDLP adicionado à amostra). Neste caso, o cálculo da média é feito considerando que o número de bactérias viáveis (*M*) é igual a *V*.

Após o cálculo do número de bactérias viáveis procedeu-se à validação do teste, através de três condições:

Condição 1: O logaritmo do número de bactérias viáveis recuperadas imediatamente após a inoculação das amostras não tratadas devia respeitar a seguinte condição:

$$\frac{L_{max} - L_{min}}{L_{medio}} \leq 0,2$$

em que,

L_{max} - logaritmo decimal do número máximo de bactérias viáveis encontradas numa amostra não tratada;

L_{min} - logaritmo decimal do número mínimo de bactérias viáveis encontradas numa amostra não tratada;

L_{medio} - logaritmo decimal do número médio de bactérias viáveis encontradas nas amostras não tratadas.

Condição 2: O número médio de bactérias viáveis recuperadas imediatamente após a inoculação das amostras não tratadas devia estar dentro do intervalo de $6,2 \times 10^3$ a $2,5 \times 10^4$ células/cm².

Condição 3: O número de bactérias viáveis (M) recuperadas de cada amostra não tratada após 24 h de incubação não devia ser inferior a $6,2 \times 10^1$ células/cm².

Para que o teste fosse válido todas as condições teriam de ser respeitadas.

Após a validação do teste, calculou-se a atividade antibacteriana da amostra, através da

Equação 4:

$$R = (U_t - U_0) - (A_t - U_0) = U_t - A_t \quad \text{Equação 4}$$

em que,

R - atividade antibacteriana, expressa em células/cm²;

U_0 - média do logaritmo decimal do número de bactérias viáveis, em células/cm², recuperadas a partir das amostras não tratadas imediatamente após a inoculação;

U_t - média do logaritmo decimal do número de bactérias viáveis, em células/cm², recuperadas a partir das amostras não tratadas após 24 h;

A_t - média do logaritmo decimal do número de bactérias viáveis, em células/cm², recuperadas a partir das amostras tratadas após 24 h.

III- Resultados e Discussão

Este capítulo, à semelhança do capítulo anterior, está dividido em quatro partes distintas, relativas aos quatro testes realizados: teste Fungicida Têxtil, teste Bactericida Industrial Têxtil, teste Bactericida Aditivo Máquina de Lavar e teste Bactericida Aditivo Tintas.

Neste capítulo encontram-se apresentados os principais resultados relativos a cada teste e a discussão pormenorizada dos mesmos.

Considerando que o objetivo principal do projeto é a otimização da concentração de formulação Si aplicada em cada um dos testes, os resultados obtidos são confrontados com os apresentados pela empresa.

1. Teste Fungicida Têxtil

Tal como referido no capítulo anterior este teste foi baseado na *NP EN 14119:2005*, cujos resultados e respetiva discussão são apresentados abaixo.

1.1. Controlo da viabilidade dos esporos

Para o teste do controlo da viabilidade dos esporos de *Aspergillus niger* obtiveram-se os resultados, em duplicado, apresentados na **Figura 19**, após 7 dias de incubação a 25 °C.

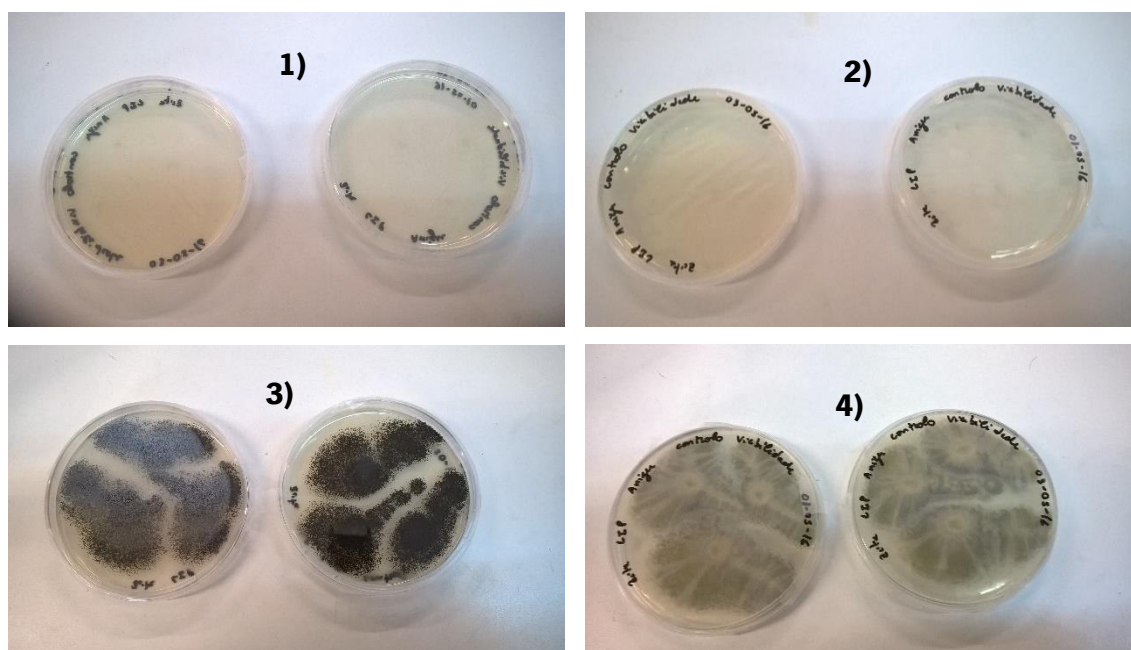


Figura 19- Controlo da viabilidade dos esporos de *Aspergillus niger*: 1) e 2) no dia 0 (vista de topo e de base, respetivamente); 3) e 4) no dia 7 (vista de topo e de base, respetivamente).

Considerando que ocorreu um bom crescimento e esporulação do fungo, foi possível confirmar que estes se encontravam viáveis para a realização do teste.

1.2. Avaliação do crescimento dos fungos por análise visual

Para o controlo positivo (amostra com eficácia garantida- fungicida/0 lavagens, de 30 mm de diâmetro), controlo negativo (pedaço de algodão não tratado e limpo com etanol, de 30 mm de diâmetro) e branco (placa de Petri contendo apenas meio PDA sem fungos incorporados), obtiveram-se os seguintes resultados, apresentados na **Figura 20**, após 3 dias de incubação a 25 °C.

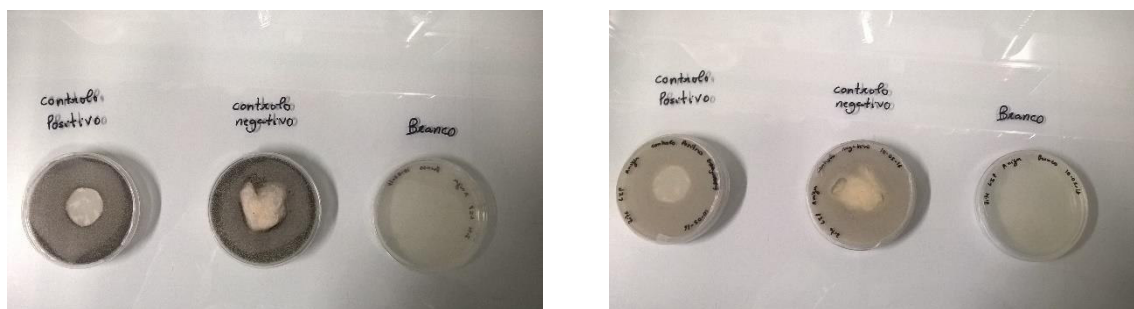


Figura 20- Controle positivo, controle negativo e branco de amostras têxteis em contacto com *A. niger*, após 3 dias de incubação a 25 °C (vista de topo- imagem à esquerda; vista de base- imagem à direita).

Relativamente ao branco, não se verificou qualquer crescimento de fungos no meio PDA. Para ambos os controlos, positivo e negativo, não se verificou qualquer zona de inibição em torno da amostra. Contudo, não se verificou qualquer crescimento de fungos no controlo positivo, no controlo negativo e no agar em contacto com as amostras, ou seja, o grau de crescimento em todos foi de 0- Anexo A.1. e A.2..

No caso das quatro amostras em estudo: 17,5 g solução Si /kg têxtil: 20 e 50 lavagens e 20 g solução Si /kg têxtil: 20 e 50 lavagens obtiveram-se os resultados, que se encontram representados na **Figura 21**.

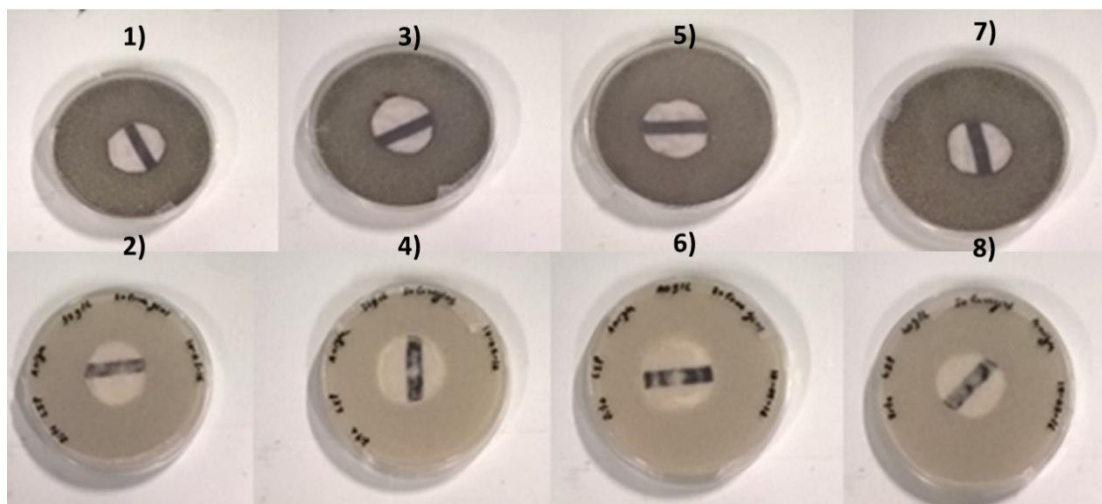


Figura 21- 1) e 2) amostra com 17,5 g solução Si /kg têxtil- 20 lavagens; 3) e 4) amostra com 17,5 g solução Si /kg têxtil- 50 lavagens; 5) e 6) amostra com 20 g solução Si /kg têxtil- 20 lavagens; 7) e 8) amostra com 20 g solução Si /kg têxtil- 50 lavagens. As amostras 1), 3), 5) e 7) representam a vista de topo e as amostras 2), 4), 6) e 8) representam a vista de base.

Relativamente à avaliação do crescimento de fungos nas amostras constatou-se que, em todas elas, o grau de crescimento é 0 (Anexo A.1.), pois não se verificou crescimento aparente na amostra, tanto na face que se encontrava em contacto com o agar como na face superior.

Adicionalmente, nenhuma amostra apresentou uma zona de inibição do crescimento de fungos em torno da mesma, o que pode indicar que o princípio ativo não se libertou da amostra têxtil e que não difundiu no meio de cultura inoculado com fungo.

Em relação ao crescimento de fungos no meio agar, não se verificou crescimento dos fungos no meio agar em contacto com o provete, mas sim na zona circundante à amostra, pelo que o grau de crescimento é também 0 (Anexo A.2.).

Uma vez que não ocorreu qualquer crescimento de fungos no controlo negativo, o que não se seria expectável, foi colocada a hipótese de que o etanol a 70% (v/v), utilizado na limpeza do algodão, tenha exercido um efeito fungicida. A Smart Inovation utilizou um controlo negativo diferente nos seus testes, ou seja, um material que permitiu os fungos proliferarem - pedaço de algodão não tratado. Assim, e de modo a estudar a influência do processo de limpeza com etanol na amostra têxtil não tratada nos resultados obtidos, repetiu-se o teste, nas mesmas condições, com dois novos controlos, uma amostra têxtil não tratada mas limpa com etanol e uma amostra têxtil não tratada e não limpa com etanol (**Figura 22**).

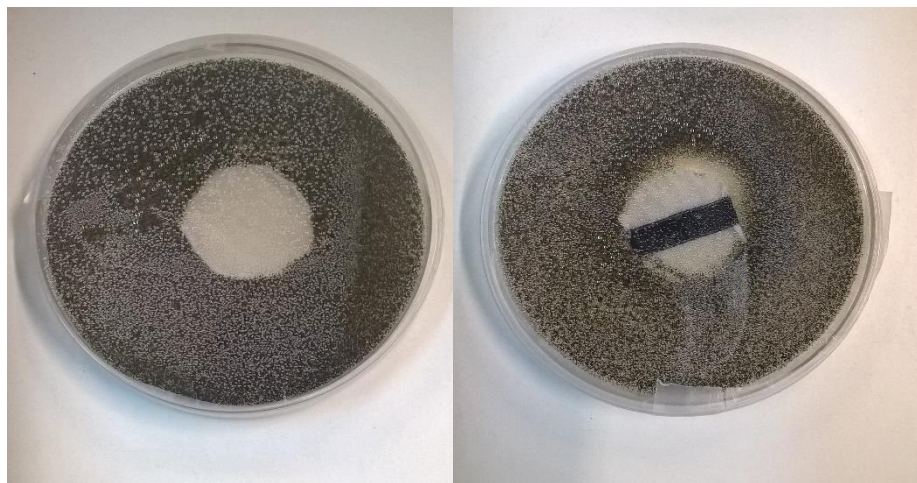


Figura 22- Amostra têxtil não tratada mas limpa com etanol (imagem da esquerda) e amostra têxtil não tratada e não limpa com etanol (imagem da direita) após incubação com *A. niger* (vista de topo).

Constatou-se que o etanol (70% v/v), utilizado na limpeza das amostras têxteis, poderá ter tido influência nos resultados obtidos, uma vez que na amostra têxtil não tratada mas limpa com etanol não se verificou crescimento de fungos e na amostra têxtil não tratada e não limpa com etanol se verificou crescimento, ainda que reduzido. Face a esta ocorrência, foram colocadas duas hipóteses para que tal tenha ocorrido: 1) o tempo de secagem das amostras ter sido insuficiente para evaporar totalmente o etanol impregnado na fibra têxtil ou 2) o composto quaternário de amônio, cetrimida, presente na composição do etanol 70% (v/v) numa concentração de 0,25% a 0,30% (m/v) ter ficado retido na fibra, prolongando a atividade fungicida do etanol. De acordo com Moriya & Módena (2008), o etanol não apresenta atividade antimicrobiana residual, evaporando rapidamente após aplicação nos materiais. Contudo, o mesmo pode ser associado a outros compostos presentes que permitirão prolongar a sua atividade antimicrobiana (Centers for Disease Control and Prevention, 2002). Assim, considera-se que a segunda hipótese seja a mais plausível para o resultado obtido.

Considerando que o teste Fungicida Têxtil foi baseado na *NP EN 14119:2005*, a mesma norma utilizada pela empresa, é possível comparar os resultados com os obtidos pela empresa, ainda que tenham ocorrido alguns desvios à norma e as condições tenham sido, certamente, diferentes.

Por questões de segurança, o teste efetuado no presente trabalho foi com o fungo *Aspergillus niger*, em vez do fungo testado pela empresa- *Trichophyton rubrum*, fungo causador do Pé de Atleta. O grau de crescimento de *A. niger* foi considerado 0 para todas as amostras testadas. Os resultados apresentados pela empresa indicam que, para uma amostra com 19 g solução Si/ kg têxtil e 0 lavagens, se verifica um grau de crescimento 0 para *Trichophyton rubrum*.

Deste modo, conclui-se que o teste Fungicida Têxtil pode ser validado para as amostras com 17,5 g solução Si/ kg têxtil - 20 lavagens e 50 lavagens, com o fungo *Trichophyton rubrum*. Caso se verifiquem os mesmos resultados, a formulação Si Pé de Atleta pode ser aplicada numa concentração mais baixa relativamente à que é atualmente produzida pela Smart Inovation, tornando o produto mais rentável para a empresa, uma vez que a eficácia é a mesma.

2. Teste Bactericida Industrial Têxtil

Tal como referido no capítulo anterior, o método *ASTM E2149* não especifica qualquer procedimento de limpeza das amostras têxteis, contudo, por não ser possível garantir condições ideais de esterilidade, foi necessário selecionar um método que garantisse a descontaminação das amostras a testar. Deste modo, escolheu-se descontaminar as amostras têxteis com etanol 70% (v/v) por ser um composto de baixo custo, prático de utilizar e com reconhecida atividade antimicrobiana, acrescentando o facto de já existir um protocolo de limpeza das amostras têxteis utilizado no teste Fungicida Têxtil.

Os resultados obtidos no teste de atividade antimicrobiana das amostras tratadas e não tratadas em contacto com a *E. coli* ao longo do tempo de teste (0h e 24 h) encontram-se reportados na **Tabela 3**, para a concentração 17,5 g solução Si /kg têxtil - 20 lavagens.

Tabela 3- Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras têxteis, em UFC/mL (valor médio), no tempo 0 h e 24 h, nas amostras tratadas (17,5 g solução Si /kg têxtil - 20 lavagens), não tratada e apenas inóculo

Tempo de contacto (h)	Teste	UFC/mL
0	Amostra tratada 1	2,05E+06
	Amostra tratada 2	2,05E+06
	Amostra tratada 3	2,01E+06
	Amostra não tratada	1,98E+06
	Inóculo	2,01E+06
Tempo de contacto (h)	Teste	UFC/mL
24	Amostra tratada 1	4,50E+03
	Amostra tratada 2	2,50E+03
	Amostra tratada 3	6,00E+03
	Amostra não tratada	1,60E+04
	Inóculo	1,49E+06

Analisando a **Tabela 3** verificou-se que, partindo de uma concentração bacteriana padronizada em todos os erlenmeyers de teste, após o tempo de teste houve uma diminuição da carga microbiana nas amostras tratadas, o que seria expectável. Contudo, verificou-se que, no erlenmeyer que continha a amostra não tratada, também ocorreu uma diminuição da carga microbiana, embora menor, enquanto no erlenmeyer que continha apenas o inóculo a carga microbiana se tenha mantido constante. Embora tal tenha ocorrido, o teste foi realizado para os restantes três pares concentração/lavagem, de forma a verificar se se tratava de um padrão comportamental ou se tinha ocorrido algum problema no primeiro teste.

Os resultados obtidos no teste de atividade antimicrobiana das amostras tratadas e não tratadas em contacto com a *E. coli* ao longo do tempo de teste (0h e 24 h) encontram-se reportados na **Tabela 4**, para a concentração 17,5 g solução Si /kg têxtil - 50 lavagens.

Tabela 4- Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras têxteis, em UFC/mL (valor médio), no tempo 0 h e 24 h, nas amostras tratadas (17,5 g solução Si /kg têxtil - 50 lavagens), não tratada e apenas inóculo

Tempo de contacto (h)	Teste	UFC/mL
0	Amostra tratada 1	3,60E+05
	Amostra tratada 2	3,55E+05
	Amostra tratada 3	2,30E+05
	Amostra não tratada	4,20E+05
	Inóculo	4,15E+05
Tempo de contacto (h)	Teste	UFC/mL
24	Amostra tratada 1	0,00E+00
	Amostra tratada 2	1,00E+03
	Amostra tratada 3	0,00E+00
	Amostra não tratada	1,50E+03
	Inóculo	1,85E+05

Os resultados obtidos no teste de atividade antimicrobiana das amostras tratadas e não tratadas em contacto com a *E. coli* ao longo do tempo de teste (0h e 24 h) encontram-se reportados na **Tabela 5**, para a concentração 24,5 g solução Si /kg têxtil - 20 lavagens.

Tabela 5- Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras têxteis, em UFC/mL (valor médio), no tempo 0 h e 24 h, nas amostras tratadas (24,5 g solução Si /kg têxtil - 20 lavagens), não tratada e apenas inóculo

Tempo de contacto (h)	Teste	UFC/mL
0	Amostra tratada 1	4,20E+05
	Amostra tratada 2	3,70E+05
	Amostra tratada 3	4,00E+05
	Amostra não tratada	4,15E+05
	Inóculo	4,30E+05
Tempo de contacto (h)	Teste	UFC/mL
24	Amostra tratada 1	1,50E+02
	Amostra tratada 2	5,00E+01
	Amostra tratada 3	5,00E+01
	Amostra não tratada	7,00E+02
	Inóculo	3,20E+05

Finalmente, os resultados obtidos no teste de atividade antimicrobiana das amostras tratadas e não tratadas em contacto com a *E. coli* ao longo do tempo de teste (0h e 24 h) encontram-se reportados na **Tabela 6**, para a concentração 24,5 g solução Si /kg têxtil- 50 lavagens.

Tabela 6- Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras têxteis, em UFC/mL (valor médio), no tempo 0 h e 24 h, nas amostras tratadas (24,5 g solução Si /kg têxtil - 50 lavagens), não tratada e apenas inóculo

Tempo de contacto (h)	Teste	UFC/mL
0	Amostra tratada 1	2,50E+05
	Amostra tratada 2	3,30E+05
	Amostra tratada 3	2,70E+05
	Amostra não tratada	3,05E+05
	Inóculo	3,10E+05
Tempo de contacto (h)	Teste	UFC/mL
24	Amostra tratada 1	5,00E+01
	Amostra tratada 2	1,00E+02
	Amostra tratada 3	1,50E+02
	Amostra não tratada	2,50E+02
	Inóculo	3,05E+05

Analisando as restantes tabelas, verificaram-se o mesmo tipo de resultados.

Considerando que o propósito do teste era o cálculo da percentagem de redução das quatro amostras testadas, apresentam-se, na **Figura 23**, os resultados em termos de % de redução bacteriana.

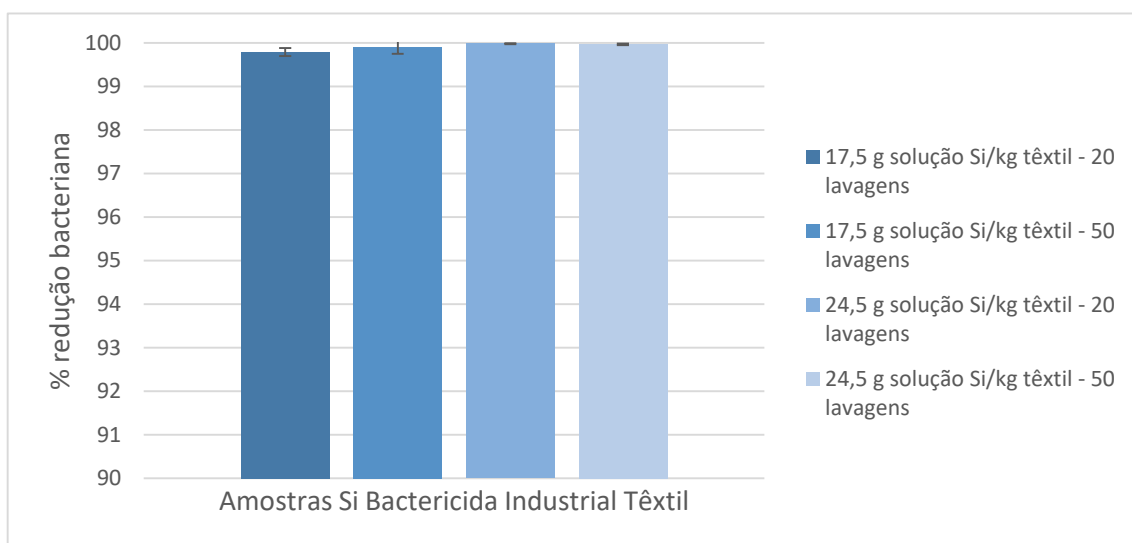


Figura 23- Percentagem de redução da população microbiana das amostras têxteis testadas (descontaminação das amostras com etanol 70% (v/v)).

Constatou-se que as amostras testadas, exceto a primeira que apresentou uma redução de 99,8%, apresentaram reduções acima dos 99,9%.

De modo a analisar os resultados obtidos recorreu-se à **Tabela 7**, presente na *ISO 20743:2013 - Têxteis - Determinação da atividade antibacteriana de produtos têxteis*, que classifica a eficácia da atividade antibacteriana de têxteis. A tabela apresenta a classificação em termos de redução logarítmica, deste modo converteu-se para percentagem de redução bacteriana considerando a seguinte informação: a redução de 1 log, 2 log e 3 log corresponde a uma redução de 90%, 99% e 99,9%, respetivamente, e assim sucessivamente (Microchem Laboratory, 2015b).

Tabela 7- Classificação da eficácia da atividade antibacteriana (adaptado de ISO, 2013)

Eficácia da atividade antibacteriana	Valor da atividade antibacteriana: A
Significativa	$2 \leq A < 3$
Forte	$A \geq 3$

Assim, constatou-se que a amostra com 17,5 g solução Si /kg têxtil - 20 lavagens apresentou uma atividade antibacteriana significativa e as restantes amostras apresentaram uma atividade antibacteriana forte.

A diminuição da carga microbiana no erlenmeyer contendo a amostra não tratada, nos quatro testes efetuados, tratou-se de uma situação não expectável, uma vez que as amostras não sofreram qualquer tratamento. Assim, colocaram-se duas hipóteses para os resultados obtidos. A primeira hipótese seria a retenção da cetrimida, proveniente do etanol 70% (v/v), que prolongaria a atividade antimicrobiana do etanol, à semelhança do ocorrido no teste Fungicida Têxtil. Adicionalmente, colocou-se também a hipótese de as bactérias ficarem retidas ou aderirem à amostra, uma vez que esta consiste numa fibra têxtil. A adesão ou retenção das bactérias na fibra têxtil foi também considerada para as amostras tratadas.

Assim, embora se tenham obtido os resultados ótimos em termos de eficácia antibacteriana (próximo do 100% de redução microbiana), optou-se por repetir o teste Bactericida Industrial Têxtil, recorrendo a um outro procedimento de limpeza das amostras têxteis: exposição à radiação UV. Este método de esterilização foi escolhido devido à sua eficácia antibacteriana, à não existência de atividade residual nas amostras, ao contrário do que ocorre com os desinfetantes químicos (Zyara et al., 2016), tendo sido selecionado um tempo de

exposição de 30 minutos, pois de acordo com alguns estudos é um período de tempo eficaz para a destruição da carga bacteriana (Katara et al., 2008; Sharma, 2012).

Repetindo o teste, nas mesmas condições do teste anterior, diferenciando apenas o procedimento de limpeza das amostras, obtiveram-se os resultados no teste de atividade antimicrobiana das amostras tratadas e não tratadas em contacto com a *E. coli* ao longo do tempo de teste (0h e 24 h) que se encontram reportados na **Tabela 8**, para a concentração 17,5 g solução Si /kg têxtil - 20 lavagens.

Tabela 8- Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras têxteis, em UFC/mL (valor médio), no tempo 0 h e 24 h, nas amostras tratadas (17,5 g solução Si /kg têxtil - 20 lavagens), não tratada e apenas inóculo

Tempo de contacto (h)	Teste	UFC/mL
0	Amostra 1 Tratada	2,90E+05
	Amostra 2 Tratada	3,10E+05
	Amostra 3 Tratada	3,35E+05
	Amostra não tratada	3,30E+05
	Inóculo	2,95E+05
Tempo de contacto (h)	Teste	UFC/mL
24	Amostra 1 Tratada	6,00E+03
	Amostra 2 Tratada	7,00E+03
	Amostra 3 Tratada	8,00E+03
	Amostra não tratada	2,35E+05
	Inóculo	1,95E+05

Analisando a **Tabela 8** verificou-se uma diminuição da carga bacteriana nos erlenmeyers contendo as amostras tratadas. Contudo, nos erlenmeyers que continham a amostra não tratada e apenas inóculo verificou-se que a carga bacteriana se manteve constante, o que seria expectável.

Os resultados obtidos no teste de atividade antimicrobiana das amostras tratadas e não tratadas em contacto com a *E. coli* ao longo do tempo de teste (0h e 24 h) encontram-se reportados na **Tabela 9**, para a concentração 17,5 g solução Si /kg têxtil - 50 lavagens.

Tabela 9- Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras têxteis, em UFC/mL (valor médio), no tempo 0 h e 24 h, nas amostras tratadas (17,5 g solução Si /kg têxtil - 50 lavagens), não tratada e apenas inóculo

Tempo de contacto (h)	Teste	UFC/mL
0	Amostra 1 Tratada	3,50E+05
	Amostra 2 Tratada	3,65E+05
	Amostra 3 Tratada	3,80E+05
	Amostra não tratada	3,55E+05
	Inóculo	4,50E+05
Tempo de contacto (h)	Teste	UFC/mL
24	Amostra 1 Tratada	1,59E+04
	Amostra 2 Tratada	1,69E+04
	Amostra 3 Tratada	1,60E+04
	Amostra não tratada	2,05E+05
	Inóculo	1,75E+05

Os resultados obtidos no teste de atividade antimicrobiana das amostras tratadas e não tratadas em contacto com a *E. coli* ao longo do tempo de teste (0h e 24 h) encontram-se reportados na **Tabela 10**, para a concentração 24,5 g solução Si /kg têxtil - 20 lavagens.

Tabela 10- Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras têxteis, em UFC/mL (valor médio), no tempo 0 h e 24 h, nas amostras tratadas (24,5 g solução Si /kg têxtil - 20 lavagens), não tratada e apenas inóculo

Tempo de contacto (h)	Teste	UFC/mL
0	Amostra 1 Tratada	3,35E+05
	Amostra 2 Tratada	3,30E+05
	Amostra 3 Tratada	3,95E+05
	Amostra não tratada	3,95E+05
	Inóculo	3,75E+05
Tempo de contacto (h)	Teste	UFC/mL
24	Amostra 1 Tratada	1,50E+03
	Amostra 2 Tratada	5,00E+02
	Amostra 3 Tratada	1,50E+03
	Amostra não tratada	2,35E+05
	Inóculo	3,15E+05

Por último, os resultados obtidos no teste de atividade antimicrobiana das amostras tratadas e não tratadas em contacto com a *E. coli* ao longo do tempo de teste (0h e 24 h) encontram-se reportados na **Tabela 11**, para a concentração 24,5 g solução Si /kg têxtil - 50 lavagens.

Tabela 11- Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras têxteis, em UFC/mL (valor médio), no tempo 0 h e 24 h, nas amostras tratadas (24,5 g solução Si /kg têxtil - 50 lavagens), não tratada e apenas inóculo

Tempo de contacto (h)	Teste	UFC/mL
0	Amostra 1 Tratada	4,00E+05
	Amostra 2 Tratada	3,95E+05
	Amostra 3 Tratada	3,90E+05
	Amostra não tratada	4,10E+05
	Inóculo	4,10E+05
Tempo de contacto (h)	Teste	UFC/mL
24	Amostra 1 Tratada	1,25E+04
	Amostra 2 Tratada	1,30E+04
	Amostra 3 Tratada	1,25E+04
	Amostra não tratada	1,70E+05
	Inóculo	1,30E+05

Verificou-se o mesmo comportamento para as restantes três amostras de teste.

Os resultados do teste em termos de % de redução bacteriana, encontram-se representados na **Figura 24**, para as quatro amostras de teste.

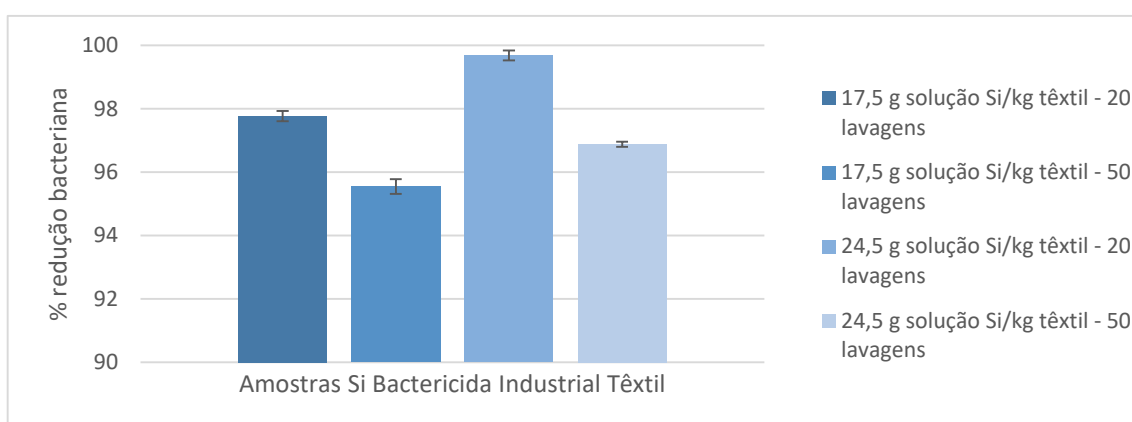


Figura 24- Percentagem de redução da população microbiana das amostras têxteis testadas (esterilização das amostras por exposição à radiação UV).

Em termos de % de redução bacteriana, foi possível constatar que a amostra com 17,5 g solução Si /kg têxtil - 20 lavagens apresentou uma redução de 97,8%, a amostra com 17,5 g solução Si /kg têxtil - 50 lavagens uma redução de 95,5%, a amostra com 24,5 g solução Si /kg têxtil - 20 lavagens uma redução de 99,7% e a amostra com 24,5 g solução Si /kg têxtil - 50 lavagens uma redução de 96,8%.

Analisando o gráfico da **Figura 24**, verificou-se que, nas amostras com a mesma concentração de princípio ativo e número de lavagens diferentes, ocorreu uma diminuição da eficácia antibacteriana com o aumento das lavagens, o que seria expectável pois a retenção da formulação Si na fibra vai diminuindo.

Comparando as amostras com concentrações diferentes de princípio ativo e o mesmo número de lavagens, verificou-se um aumento da eficácia antibacteriana com o aumento da concentração de Si Bactericida Industrial Têxtil na fibra, como seria expectável.

Finalmente, constatou-se que para as duas concentrações testadas, ocorre uma diminuição praticamente na mesma proporção quando o número de lavagens aumenta de 20 para 50.

Recorrendo à **Tabela 7**, verificou-se que apenas a amostra com 24,5 g solução Si /kg têxtil - 20 lavagens apresentou uma eficácia antibacteriana significativa. Nas restantes amostras ocorreu uma diminuição da carga bacteriana inferior a 2 log, portanto, estas não apresentaram uma eficácia antibacteriana significativa.

Os resultados obtidos pela Smart Inovation indicam que uma amostra contendo 21 g solução Si /kg têxtil e submetida a 20 lavagens apresenta uma redução de 78% e uma amostra com a mesma concentração e submetida a 50 lavagens apresenta uma redução de 72%. Este teste foi realizado de acordo com o método *ASTM E2149* e o microrganismo testado foi a *E. coli*. Estes valores são inferiores aos valores obtidos para uma concentração de 17,5 g solução Si /kg têxtil. Este facto pode ser explicado considerando que o teste foi realizado com adaptações à norma e a estirpe utilizada no trabalho foi uma estirpe diferente da utilizada pela empresa.

Ainda assim, seria interessante validar o teste para as amostras com 24,5 g solução Si - 20 e 50 lavagens, pois ainda que se possam obter resultados abaixo dos obtidos neste projeto, por tudo o referido acima, estes serão, certamente, superiores aos que a empresa atualmente apresenta. Consequentemente, uma maior eficácia antibacteriana implica uma melhor classificação do produto Si Bactericida Industrial Têxtil como agente antibacteriano.

3. Teste Bactericida Aditivo Máquina de Lavar

De acordo com os resultados obtidos no teste Bactericida Industrial Têxtil e uma vez que este teste é também baseado no método *ASTM E2149*, optou-se por proceder à esterilização das amostras têxteis a testar por exposição à radiação UV.

Os resultados obtidos no teste de atividade antimicrobiana das amostras tratadas e não tratadas em contacto com a *E. coli* ao longo do tempo de teste (0h e 24 h) encontram-se reportados na **Tabela 12**, para a concentração 3 g solução Si /kg têxtil.

Tabela 12- Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras têxteis, em UFC/mL (valor médio), no tempo 0 h e 24 h, nas amostras tratadas (3 g solução Si /kg têxtil), não tratada e apenas inóculo

Tempo de contacto (h)	Teste	UFC/mL
0	Amostra 1 Tratada	4,25E+05
	Amostra 2 Tratada	4,30E+05
	Amostra 3 Tratada	4,20E+05
	Amostra não tratada	4,90E+05
	Inóculo	4,60E+05
Tempo de contacto (h)	Teste	UFC/mL
24	Amostra 1 Tratada	9,00E+04
	Amostra 2 Tratada	9,05E+04
	Amostra 3 Tratada	8,85E+04
	Amostra não tratada	4,15E+06
	Inóculo	2,35E+05

Fazendo uma análise da carga bacteriana em cada um dos erlenmeyers de teste, lembrando que, em todos eles se partiu de uma concentração bacteriana padronizada, observou-se uma diminuição do número de bactérias, no tempo 24 h, nos erlenmeyers contendo as amostras tratadas com 3 g solução Si /kg têxtil. Esta diminuição não se verificou no

erlenmeyer que continha a amostra não tratada nem no erlenmeyer que continha apenas o inóculo, o que indicou a influência do agente bactericida retido nas amostras têxteis tratadas.

Os resultados obtidos no teste de atividade antimicrobiana das amostras tratadas e não tratadas em contacto com a *E. coli* ao longo do tempo de teste (0h e 24 h) encontram-se reportados na **Tabela 13**, para a concentração 4 g solução Si /kg têxtil.

Tabela 13- Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras têxteis, em UFC/mL (valor médio), no tempo 0 h e 24 h, nas amostras tratadas (4 g solução Si /kg têxtil), não tratada e apenas inóculo

Tempo de contacto (h)	Teste	UFC/mL
0	Amostra 1 Tratada	4,20E+05
	Amostra 2 Tratada	4,10E+05
	Amostra 3 Tratada	4,25E+05
	Amostra não tratada	4,50E+05
	Inóculo	4,40E+05
Tempo de contacto (h)	Teste	UFC/mL
24	Amostra 1 Tratada	7,20E+04
	Amostra 2 Tratada	7,05E+04
	Amostra 3 Tratada	7,35E+04
	Amostra não tratada	9,00E+05
	Inóculo	3,00E+06

Finalmente, os resultados obtidos no teste de atividade antimicrobiana das amostras tratadas e não tratadas em contacto com a *E. coli* ao longo do tempo de teste (0h e 24 h) encontram-se reportados na **Tabela 14**, para a concentração 5 g solução Si /kg têxtil.

Tabela 14- Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras têxteis, em UFC/mL (valor médio), no tempo 0 h e 24 h, nas amostras tratadas (5 g solução Si /kg têxtil), não tratada e apenas inóculo

Tempo de contacto (h)	Teste	UFC/mL
0	Amostra 1 Tratada	3,15E+05
	Amostra 2 Tratada	3,60E+05
	Amostra 3 Tratada	3,35E+05
	Amostra não tratada	3,10E+05
	Inóculo	3,15E+05
Tempo de contacto (h)	Teste	UFC/mL
24	Amostra 1 Tratada	8,50E+03
	Amostra 2 Tratada	8,00E+03
	Amostra 3 Tratada	1,00E+04
	Amostra não tratada	1,55E+05
	Inóculo	1,75E+05

Analisando as restantes tabelas, verificaram-se o mesmo tipo de resultados.

Os resultados para o teste Bactericida Aditivo Máquina de Lavar, encontram-se representados na **Figura 25**, em termos de % de redução bacteriana, para as três concentrações testadas: 3, 4 e 5 g solução Si /kg têxtil.

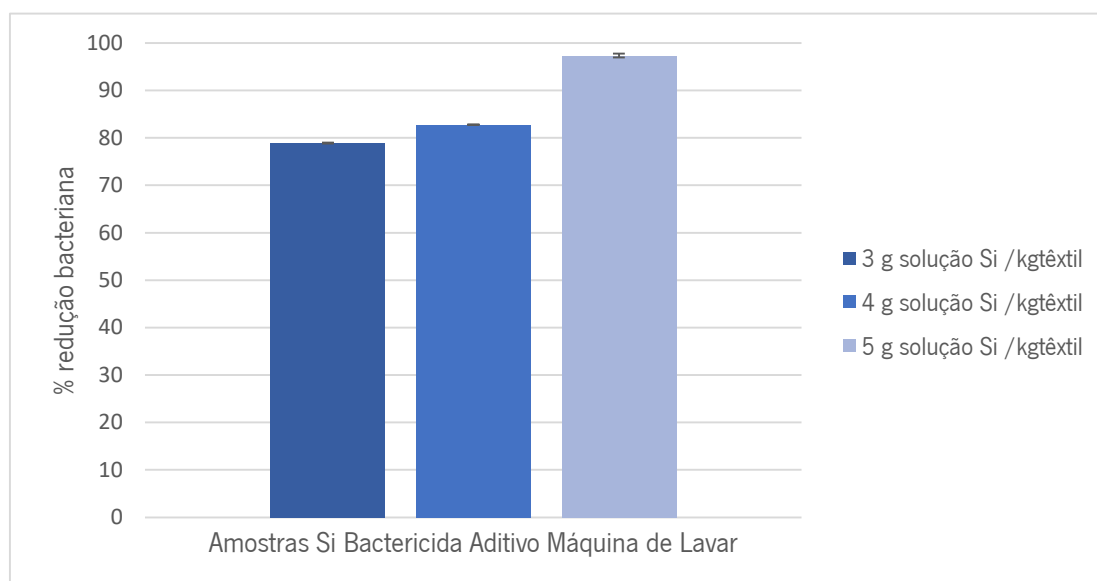


Figura 25- Percentagem de redução da população microbiana das amostras têxteis testadas (esterilização das amostras por exposição à radiação UV).

Em termos de percentagem de redução bacteriana, verificou-se uma redução de 78,9%, 82,8% e 97,4% para as amostras com 3, 4 e 5 g solução Si /kg têxtil, respetivamente.

Constatou-se que, com o aumento da concentração de formulação Si Bactericida Aditivo Máquina de Lavar, ocorreu também um aumento do valor da percentagem de redução bacteriana, isto é, aumentou a eficácia antibacteriana do têxtil. Tal comportamento seria expectável, uma vez que, em tecidos de dimensões idênticas, quanto maior for a concentração de agente antibacteriano maior a sua retenção na fibra do têxtil e, conseqüentemente, maior a sua ação bactericida.

Recorrendo à **Tabela 7**, verificou-se que em nenhuma das amostras ocorreu uma redução bacteriana superior ou igual a 2 log, portanto, nenhuma delas apresentou uma eficácia antibacteriana significativa.

A Smart Inovation apresenta atualmente resultados, em termos de percentagem de redução bacteriana, na ordem dos 94%, para uma amostra com 3 g solução Si/ kg têxtil. Este teste foi realizado de acordo com o método *ASTM E2149* e o microrganismo testado foi a *E. coli*. Confrontando estes resultados com os obtidos no presente projeto, verifica-se que para a mesma concentração de formulação Si Bactericida Aditivo Máquina de Lavar, se obteve uma percentagem de redução bastante inferior (cerca de 78,9%). Esta diferença nos resultados pode ter ocorrido devido à utilização de uma estirpe de *E. coli* diferente ou até às diferentes condições experimentais.

Apesar do considerado acima, verificou-se um padrão comportamental nos resultados obtidos no decurso do projeto, ou seja, um aumento da concentração do princípio ativo traduziu-se num aumento da eficácia antibacteriana. A Smart Inovation apresenta, para a concentração de 3 g solução Si /kg têxtil, uma % de redução bacteriana acima dos 90%. Desta forma, e considerando o padrão comportamental referido acima, o aumento da concentração de princípio ativo poderia resultar num aumento da % de redução bacteriana que se poderia enquadrar na classificação da **Tabela 7**.

Assim, conclui-se que seria interessante validar o teste para a concentração de 5 g solução Si/ kg têxtil.

4. Teste Bactericida Aditivo Tintas

O teste Bactericida Aditivo Tintas foi, como referido no capítulo anterior, baseado *na ISO 22196-2007* e realizado para testar a atividade antibacteriana de tintas contendo a formulação Si Bactericida Aditivo Tintas e Vernizes em duas concentrações diferentes: 3% 4% em massa.

Foram utilizados dois controlos negativos diferentes: placa de vidro sem tinta e sem formulação Si (controlo negativo utilizado pela Smart Inovation por ser um material inerte, possível de ser descontaminado com etanol 70% (v/v), se necessário) e placa de madeira com tinta de base aquosa mate não tratada (isto é, sem a formulação Si Bactericida Aditivo Tintas e Vernizes). Este último controlo negativo foi seleccionado de modo a comparar o crescimento bacteriano na madeira com tinta sem tratamento em relação ao do vidro.

Foi necessário, em primeiro lugar, efetuar o cálculo do número de bactérias viáveis (N) nas placas de madeira com tinta de base aquosa mate contendo 3% e 4% em massa de Si Bactericida Aditivo Tintas e Vernizes após 24 h e do número de bactérias viáveis (N) nos dois controlos negativos às 0 h e 24 h, cujos valores se encontram representados na **Tabela 15** e detalhados nas tabelas do Anexo B.

Tabela 15- Cálculo do número médio de bactérias viáveis ($N_{\text{médio}}$) em placas de madeira com tinta de base aquosa mate contendo 3 % e 4% em massa de Si Bactericida Aditivo Tintas e Vernizes após 24 h e nos dois controlos negativos às 0 h e 24 h

Amostra	Tempo (h)	$N_{\text{médio}}$	Desvio padrão
Placa de madeira com tinta não tratada	0	2,39E+04	9,55E+02
Placa de madeira com tinta não tratada	24	5,69E+06	1,43E+05
Placa de vidro sem tinta	0	2,53E+04	2,25E+03
Placa de vidro sem tinta	24	6,83E+06	2,66E+05
Placa de madeira com tinta tratada (3% em massa)	24	10	0
Placa de madeira com tinta tratada (4% em massa)	24	10	0

Analisando a **Tabela 15**, constatou-se que às 0 h, em ambos os controlos negativos, se verificou uma diminuição da população microbiana de 10^5 (concentração inicial) para 10^4

células/mL. Este facto pode ser explicado considerando que parte dessa população microbiana poderá ter ficado retida no material (madeira e vidro). Apesar dessa redução, após 24 h de incubação verificou-se um aumento da população bacteriana, o que indica que o material não teve influência no crescimento bacteriano. Em relação às placas com tinta contendo 3% e 4% em massa de Si Bactericida Aditivo Tintas e Vernizes constatou-se que, após 24 h não se formaram quaisquer colónias nas placas de Petri. Neste caso, a norma refere que se deve considerar o número de células viáveis como sendo igual ao volume de meio SCDLP adicionado a cada amostra, para o cálculo da atividade antibacteriana, R , assim considerou-se que o número de bactérias viáveis (M) nas amostras tratadas seria 10.

Após a determinação do número de bactérias viáveis nos controlos negativos e amostras tratadas, foi necessário validar o teste, verificando se eram respeitadas as três condições presentes na *ISO 22196-2007* (capítulo 4.6). Para o controlo negativo: placa de madeira com tinta não tratada (sem a formulação Si Bactericida Aditivo Tintas e Vernizes), obteve-se um valor, para a condição 1, de 0,008, sendo inferior a 0,2. Para a condição 2, obteve-se um N_{medio} igual a $2,39 \times 10^4$ células/cm², enquadrando-se no intervalo de $6,2 \times 10^3$ a $2,5 \times 10^4$ células/cm². Relativamente à condição 3 obtiveram-se os valores para $N1$, $N2$ e $N3$ de $5,66 \times 10^6$, $5,56 \times 10^6$ e $5,84 \times 10^6$ células/cm², respetivamente, sendo estes valores superiores a $6,2 \times 10^1$ células/cm². Por outro lado, para o controlo negativo: placa de vidro sem tinta (sem formulação Si), obteve-se um valor, para a condição 1, de 0,017 sendo este inferior a 0,2. Para a condição 2, obteve-se um N_{medio} igual a $2,53 \times 10^4$ células/cm² enquadrando-se no intervalo de $6,2 \times 10^3$ a $2,5 \times 10^4$ células/cm². Relativamente à condição 3 obtiveram-se os valores para $N1$, $N2$ e $N3$ de $6,94 \times 10^6$, $6,63 \times 10^6$ e $7,03 \times 10^6$ células/cm², respetivamente, sendo estes valores superiores a $6,2 \times 10^1$ células/cm². Os resultados obtidos indicaram a validação do teste para as três condições consideradas, para ambos os controlos negativos (Anexo C).

Por fim, determinou-se a atividade antibacteriana (R) para as duas concentrações de formulação Si Bactericida Aditivo Tintas e Vernizes testadas e considerando os dois controlos negativos diferentes, cujos cálculos se encontram explícitos no Anexo D. Os valores de R para cada uma das concentrações testadas encontram-se expostos na **Tabela 16**.

Tabela 16- Valores da atividade antibacteriana, R , para as duas concentrações de formulação Si Bactericida Aditivo Tintas e Vernizes testadas

Formulação Si (% em massa)	Controlo negativo	R
3	Placa de madeira com tinta não tratada	5,75
	Placa de vidro sem tinta	5,83
4	Placa de madeira com tinta não tratada	5,75
	Placa de vidro sem tinta	5,83

Adicionalmente, constatou-se que os valores de R são muito similares nas amostras com a mesma concentração de princípio ativo mas diferente controlo negativo, o que indica que ambos podem ser utilizados, sendo, no futuro, mais prático selecionar apenas um.

De acordo a norma *JIS Z 2801:2010, Produtos antibacterianos - Teste para atividade e eficácia antibacteriana*, um material apresenta atividade antibacteriana eficaz se apresentar um valor de R igual ou superior a 2 (JIS, 2010). Assim, é possível afirmar que ambas as tintas (contendo 3% 4% em massa de formulação Si Bactericida Aditivo Tintas e Vernizes) apresentam eficácia antibacteriana eficaz.

Atualmente a Smart Inovation apresenta, para a concentração de 5% em massa de formulação Si Bactericida Aditivo Tintas e Vernizes, um valor de R igual a 7,19 sendo o teste baseado na mesma norma, *ISO 22196-2007*. Contudo, o microrganismo utilizado para o teste foi a *Klebsiella pneumoniae*.

Conclui-se que seria vantajoso realizar de novo o teste com o microrganismo de interesse para a empresa, *Klebsiella pneumoniae*, para as duas concentrações mais baixas testadas neste projeto (3% e 4% em massa), com a possibilidade de reduzir ainda mais a concentração de formulação Si utilizada, pois os valores obtidos foram, ainda assim, bastante elevados. Portanto, caso se verificasse uma atividade antimicrobiana eficaz para as duas concentrações mais baixas, a formulação Si Bactericida Aditivo Tintas e Vernizes tornar-se-ia um produto economicamente mais apelativo.

IV- Conclusões e Perspetivas de Trabalho Futuro

Neste último capítulo é feita uma síntese das principais conclusões retiradas durante a elaboração do projeto.

Adicionalmente, são também referidas algumas ideias/sugestões para um possível trabalho futuro.

1. Conclusões

A realização deste projeto teve como objetivo a otimização da concentração das formulações Si, atualmente produzidas e aplicadas pela Smart Inovation, em dois tipos de substratos distintos - têxteis e tintas (aplicadas em placas de madeira).

Os resultados obtidos nos quatro testes efetuados permitiram retirar as seguintes conclusões:

- ➔ O teste Fungicida Têxtil pode ser validado para as amostras com 17,5 g solução Si/ kg têxtil - 20 lavagens e 50 lavagens, com o fungo *Trichophyton rubrum*, uma vez que as amostras testadas no presente trabalho com esta concentração apresentaram eficácia antifúngica (ainda que o fungo testado tenha sido diferente). Consequentemente, a formulação Si Pé de Atleta poderá tornar-se um produto mais rentável para a empresa, uma vez que a eficácia é a mesma. Como não se verificou qualquer zona de inibição em torno da amostra, o método utilizado poderá não ter sido o mais adequado.
- ➔ O teste Bactericida Industrial Têxtil pode ser validado para as amostras têxteis com 24,5 g solução Si/ kg têxtil - 20 e 50 lavagens, com a estirpe de *E. coli* selecionada pela empresa. Embora isto implique um aumento da concentração de formulação Si atualmente comercializada pela empresa (21 g solução Si/ kg têxtil), poderá permitir a obtenção de uma maior eficácia antibacteriana dos têxteis funcionalizados (acima dos 95%). Assim, o produto Si Bactericida Industrial Têxtil poderá apresentar uma melhor classificação em termos de eficácia antibacteriana, tornando o produto economicamente mais apelativo.
- ➔ O teste Bactericida Aditivo Máquina de Lavar pode ser validado para uma amostra têxtil funcionalizada com 5 g solução Si /kg têxtil, com a estirpe de *E. coli* selecionada pela empresa. No presente trabalho foram obtidos valores de redução bacteriana inferiores aos obtidos pela empresa. Para uma concentração de 3 g solução Si/ kg têxtil a Smart Inovation apresenta uma % de redução bacteriana acima dos 90% enquanto para a mesma concentração de formulação Si se obteve, no presente trabalho, uma % de redução bacteriana de 78,9%. Contudo, verificou-se que ocorreu um aumento da eficácia

antibacteriana com o aumento da concentração de princípio ativo. Apesar de ser necessário aumentar a concentração de formulação Si (de 3 g solução Si /kg têxtil para 5 g solução Si /kg têxtil), esta poderá enquadrar-se na classificação de agente bactericida significativo ou até mesmo forte, o que garantiria a eficácia da amostra têxtil funcionalizada.

- O teste Bactericida Aditivo Tintas pode ser validado em amostras contendo 3% e 4% em massa de formulação Si Bactericida Aditivo Tintas e Vernizes, com a bactéria *Klebsiella pneumoniae*. Para estas concentrações obtiveram-se os resultados expectáveis, uma vez que as amostras apresentaram uma atividade antibacteriana eficaz ($P \geq 2$). Deste modo, seria possível baixar a concentração de princípio ativo atualmente aplicado pela empresa (5% em massa) sem alterar a eficácia antibacteriana das amostras, o que seria economicamente vantajoso para a empresa.

Findo o estudo, conclui-se que ao longo do projeto foi possível responder aos objetivos inicialmente traçados. De um modo geral, todos os testes permitiram a obtenção de melhores resultados em termos de redução da população microbiana. Estes resultados poderão ser utilizados pela empresa para que se possam comercializar e aplicar as formulações Si em diferentes concentrações, com o intuito de melhorar a eficácia antimicrobiana dos substratos funcionalizados.

2. Perspetivas de Trabalho Futuro

Considerando que os testes Bactericida Industrial Têxtil, Bactericida Aditivo Máquina de Lavar e Bactericida Aditivo Tintas foram apenas realizados com o microrganismo *E. coli*, tratando-se esta de uma bactéria gram-negativa, seria interessante num trabalho futuro testar a eficácia antibacteriana das amostras na presença de uma bactéria gram-positiva, como a *S. aureus*, de modo a estudar possíveis diferenças no comportamento das mesmas face a um agente bactericida.

Seria também interessante efetuar um teste para determinação da atividade antifúngica de tintas, uma vez que no presente trabalho apenas se avaliou a atividade antibacteriana das mesmas.

Por fim, considerando que existem vários tipos de normas para classificação de produtos funcionalizados com agentes bactericidas e fungicidas seria interessante efetuar de novo os testes utilizando diferentes normas, tanto quantitativas como qualitativas. Como exemplo, nos testes de avaliação da atividade antibacteriana em têxteis poderia ser utilizada a norma quantitativa *ASTM E2149 - Método de Teste Padrão para a Determinação da Atividade Antimicrobiana de Agentes Antimicrobianos Imobilizados sob Condições de Contacto Dinâmicas* e paralelamente uma norma qualitativa como a *AATCC 147 - Método das Estrias Paralelas*.

Bibliografia

- Al-Adham, I., Haddadin, R., & Collier, P. (2013). Types of Microbicidal and Microbistatic Agents. In A. P. Fraise, J.-Y. Maillard, & S. A. Sattar (Eds.), *Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization* (Fifth Edit, pp. 5–70). Blackwell Publishing Ltd. <http://doi.org/10.1002/9781118425831.ch2>
- Arshad, K., & Mujahid, M. (2011). *Biodegradation of Textile Materials*. University of Boras, Sweden.
- Associação Portuguesa de Tintas (APT). (2016). Composição. Retrieved March 8, 2016, from <http://www.ap tintas.pt/composicao.aspx>
- ASTM. (2001). E2149-01 -Standard Test Method for Determining the Antimicrobial Activity of Immobilized Antimicrobial Agents Under Dynamic Contact Conditions.
- Balogopal, S., & Arjunker, R. (2013). Chlorhexidine: The gold standard antiplaque agent. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 5(12), 270–274.
- Bellotti, N., Romagnoli, R., Quintero, C., Dominguez-Wong, C., Ruiz, F., & Deyá, C. (2015). Nanoparticles as antifungal additives for indoor water borne paints. *Progress in Organic Coatings*, 86, 33–40. <http://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2015.03.006>
- Biresaw, G., & Mittal, K. L. (Eds.). (2011). *Surfactants in Tribology-Volume 2*. CRC Press.
- Borkow, G., & Gabbay, J. (2008). Biocidal textiles can help fight nosocomial infections. *Medical Hypotheses*, 7(5), 990–994. <http://doi.org/10.1016/j.mehy.2007.08.025>
- Borkow, G., & Gabbay, J. (2010). Preventing Pathogens Proliferation and Reducing Potential Sources of Nosocomial Infections with Biocidal Textiles in Developing Countries. *The Open Biology Journal*, 3, 81–86.
- Boryo, D. E. A. (2013). The Effect of Microbes on Textile Material : A Review on the Way-Out So Far. *International Journal Of Engineering And Science*, 2(8), 9–13.
- Buffet-Bataillon, S., Tattevin, P., Bonnaure-Mallet, M., & Jolivet-Gougeon, A. (2012). Emergence of resistance to antibacterial agents: The role of quaternary ammonium compounds - A critical review. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 39, 381–389.

<http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.01.011>

Cay, P. H. M., Ocampo-Sosa, A. A., & Fleming, G. T. A. (2010). Effect of subinhibitory concentrations of benzalkonium chloride on the competitiveness of *Pseudomonas aeruginosa* grown in continuous culture. *Microbiology*, *156*, 30–38. <http://doi.org/10.1099/mic.0.029751-0>

Centers for Disease Control and Prevention. (2002). Guideline for Hand Hygiene in Health-Care Settings. Recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force. *MMWR*, *51*(RR-16), 1–45, quiz CE1–E4. <http://doi.org/10.1086/503164>

CIN. (2016a). Manual produtos aquosos e solventes. Retrieved March 8, 2016, from <http://www.cin.pt/portal/cin/casa/externo/aquosos?contentid=4F80809580CO&page=pintarpe.psml&nl=pt>

CIN. (2016b). Manual tintas plásticas e esmaltes. Retrieved March 8, 2016, from <http://www.cin.pt/portal/cin/casa/externo/plasticas-esmaltes?contentid=4F80809680CO&page=pintarpe.psml&nl=pt>

CT 4 (CITEVE). (2005). NP EN 14119:2005- Ensaio em têxteis- Avaliação da ação dos microfungos.

Das, R., Ghosh, S., & Bhattacharjee, C. (2015). A green practice for pharmaceutical drug chlorhexidine digluconate treatment and ecotoxicity assessment. *Journal of Water Process Engineering*, *7*, 266–272. <http://doi.org/10.1016/j.jwpe.2015.05.005>

Deshmukh, A., Deshmukh, S., Zade, V., & Thakare, V. (2013). The Microbial Degradation of Cotton and Silk dyed with Natural Dye : A Laboratory Investigation. *International Journal Of Theoretical And Applied Sciences*, *5*(2), 50–59.

Dhende, V. P., Hardin, I. R., & Locklin, J. (2012). Durable antimicrobial textiles: Types, finishes and applications. *Understanding and Improving the Durability of Textiles*, 145–173. <http://doi.org/10.1016/B978-0-85709-087-4.50008-1>

Direção-Geral da Saúde. (2016). Prevenção e Controlo de Infeções e de Resistência aos Antimicrobianos em números – 2015. *Programa de Prevenção E Controlo de Infeções E de Resistência Aos Antimicrobianos*, 1–43.

- Direção-Geral da Saúde (DGS). (2014). Prevenção e Controlo de Infeções e de Resistência aos Antimicrobianos em números – 2014, 56.
- Durán, N., Durán, M., de Jesus, M. B., Seabra, A. B., Fávoro, W. J., & Nakazato, G. (2015). Silver Nanoparticles: A New View on Mechanistic Aspects on Antimicrobial Activity. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. <http://doi.org/10.1016/j.nano.2015.11.016>
- Ermolayeva, E., & Sanders, D. (1995). Mechanism of Pyrithione-Induced Membrane Depolarization in *Neurospora crassa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(9), 3385–3390.
- European Medicines Agency. (1997). Committee for Veterinary Medicinal Products- Benzalkonium Chloride, 4–6.
- European Medicines Agency. (2014). Questions and Answers on Benzalkonium chloride in the context of the revision of the guideline on “ Excipients in the label and package leaflet of medicinal products for human use,” 4(May), 1–8.
- Fazlara, A., & Ekhtelat, M. (2012). The Disinfectant Effects of Benzalkonium Chloride on Some Important Foodborne Pathogens. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 12(1), 23–29. Retrieved from [http://idosi.org/aejaes/jaes12\(1\)12/4.pdf](http://idosi.org/aejaes/jaes12(1)12/4.pdf)
- Florio, J. J., & Miller, D. J. (2004). *Handbook of Coatings Additives*. CRC Press.
- G. Ducel, J. Fabry, L. N. (Ed.). (2002). *Prevention of hospital-acquired infections-A Practical Guide*. World Health Organization. <http://doi.org/WHO/CDS/CSR/EPH/2002.12>
- Gao, Y., & Cranston, R. (2008). Recent Advances in Antimicrobial Treatments of Textiles. *Textile Research Journal*, 78(1), 60–72. <http://doi.org/10.1177/0040517507082332>
- Gargiulo, M. E., Elías, A. del C., & Borkow, G. (2012). Analysis of the Effect of Wearing Copper Oxide Impregnated Socks on Tinea Pedis Based on “ Before and After ” Pictures – A Statistical Follow-up Tool. *The Open Biology Journal*, 5, 17–22. <http://doi.org/10.2174/1874196701205010017>
- Gutarowska, B., & Michalski, A. (2012). Microbial Degradation of Woven Fabrics and Protection against Biodegradation. *Woven Fabrics, Prof. Han-Yong Jeon (Ed.)*.

- Hasan, M. Al, Fitzgerald, S. M., Saoudian, M., & Krishnaswamy, G. (2004). Dermatology for the practicing allergist: Tinea pedis and its complications. *Clinical and Molecular Allergy: CMA*, 2, 5. <http://doi.org/10.1186/1476-7961-2-5>
- Holtz, R. D., Lima, B. A., Souza Filho, A. G., Brocchi, M., & Alves, O. L. (2012). Nanostructured silver vanadate as a promising antibacterial additive to water-based paints. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 8, 935–940. <http://doi.org/10.1016/j.nano.2011.11.012>
- Instituto Português da Qualidade. (2009). *Manual de Normalização*.
- Ishfaq, S., Ali, N., Zabta, K. S., Ali, M. ishtiaq, Tauseef, I., & Khattak, M. N. K. (2015). Analysis of Paint Degradation By Fungal and Bacterial Species. *Pakistan Journal of Botany*, 47(2), 753–760.
- ISO. (2007). ISO 22196 Plastics- Measurement of antibacterial activity on plastic surfaces.
- JIS. (2010). Japanese Industrial Standard (JIS) Z 2801 - Antibacterial products - Test for antibacterial activity and efficacy.
- Kappock, P., Glaser, J. K., & Cornish, A. (2005). Protecting paints. *European Coatings Journal*, (4), 144–149.
- Katara, G., Hemvani, N., Chitnis, S., Chitnis, V., & Chitnis, D. S. (2008). Surface disinfection by exposure to germicidal UV light. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 26(3), 241–242. <http://doi.org/10.4103/0255-0857.42034>
- Khajavi, R., Sattari, M., & Ashjari, A. (2007). The Antimicrobial Effect of Benzalkonium Chloride on Some Pathogenic Microbes Observed on Fibers of Acrylic Carpet. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(4), 598–601.
- Knetsch, M. L. W., & Koole, L. H. (2011). New Strategies in the Development of Antimicrobial Coatings: The Example of Increasing Usage of Silver and Silver Nanoparticles. *Polymers*, 3, 340–366. <http://doi.org/10.3390/polym3010340>
- Kozłowski, R. M. (Ed.). (2012). *Handbook of natural fibers: Types, Properties and Factors Affecting Breeding and Cultivation*. Woodhead Publishing.
- Kumar, V., Tilak, R., Prakash, P., Nigam, C., & Gupta, R. (2011). Tinea Pedis– an Update. *Asian*

Journal of Medical Sciences, 2, 134–138.

Lang, N., & Brex, M. (1986). Chlorhexidine digluconate - an agent for chemical plaque control and prevention of gingival inflammation. *Journal of Periodontal Research Supplement*, 74–89.

Liu, Y., Ren, X., & Liang, J. (2015). Antibacterial Modification Review. *BioResources*, 10(1), 1964–1985.

Mangat, M. M. A. (2009). *Structure and Properties of Cotton Fiber: A literature Review*.

Marple, B., Peter, R., & Michael, B. (2004). Safety review of benzalkonium chloride used as a preservative in intranasal solutions: An overview of conflicting data and opinions. *Otolaryngology – Head and Neck Surgery*, 130(1), 131–141.

Marquardt, R. (1992). Therapy of Dry Eye. In M. A. Lemp & R. Marquardt (Eds.), *The Dry Eye- A Comprehensive Guide*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. <http://doi.org/10.1007/978-3-642-58130-4>

Mathur, S., Mathur, T., Srivastava, R., & Khatri, R. (2011). Chlorhexidine : The Gold Standard in Chemical Plaque Control. *National Journal of Physiology, Pharmacy & Pharmacology*, 1(2), 45–50.

McDonnell, G., & Russel, D. (1999). Antiseptics and Disinfectants : Activity , Action , and Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(1), 147–179.

Melzer Chemicals Pvt. Ltd. (n.d.). Exterior Paint Protection-Saving the Paints from Constant Threat of Microbial Attack. Retrieved March 10, 2016, from <http://www.melzerspeciality.com/techexe.php>

Microbe Investigations Switzerland (mis). (2014). ASTM E2149. Retrieved March 23, 2016, from <http://www.microbe-investigations.com/testing-methods/astm-e2149/>

Microchem Laboratory. (2015a). ISO 22196 Test for Antimicrobial Activity of Plastics. Retrieved August 29, 2016, from <http://microchemlab.com/test/iso-22196-test-antimicrobial-activity-plastics>

Microchem Laboratory. (2015b). Log and Percent Reductions in Microbiology and Antimicrobial Testing. Retrieved August 3, 2016, from

http://microchemlab.com/log_reduction_and_percent_reduction_calculations

- Milovic, N. M., Wang, J., Lewis, K., & Klibanov, A. M. (2005). Immobilized N-alkylated polyethylenimine avidly kills bacteria by rupturing cell membranes with no resistance developed. *Biotechnology and Bioengineering*, *90*(6), 715–722. <http://doi.org/10.1002/bit.20454>
- Mitchell, A., Spencer, M., & Edmiston, C. (2014). Role of healthcare apparel and other healthcare textiles in the transmission of pathogens: A review of the literature. *Journal of Hospital Infection*. <http://doi.org/10.1016/j.jhin.2015.02.017>
- Moriya, T., & Módena, J. L. P. (2008). Assepsia E antissepsia: Técnicas de esterilização. *Medicina*, *41*(3), 261–273.
- Muthu, S. S. (Ed.). (2014). *Roadmap to Sustainable Textiles and Clothing: Environmental and Social Aspects of Textiles and Clothing Supply Chain*. Springer.
- Obidi, O. F., Aboaba, O. O., Makanjuola, M. S., & Nwachukwu, S. C. U. (2009). Microbial evaluation and deterioration of paints and paint-products. *Journal of Environmental Biology*, *30*, 835–840.
- Osman, M., Hamed EL Hendawy, H., Hassan, A., Abdel-All, S. M., & Ezzat Mahmoud, D. (2012). Efficacy Of Combination Of Glutaraldehyde And Benzalkonium Chloride Against Multidrug-Resistant Gram Negative Bacteria Isolated From Hospitals. *Journal of Applied Sciences Research*, *8*(6), 3019–3031.
- Pekhtasheva, E., Neverov, A., Kubica, S., & Zaikov, G. (2012). Biodegradation and Biodeterioration of some Natural Polymers, *6*(3).
- Pinho, E., Magalhães, L., Henriques, M., & Oliveira, R. (2011). Antimicrobial activity assessment of textiles: Standard methods comparison. *Annals of Microbiology*, *61*(3), 493–498. <http://doi.org/10.1007/s13213-010-0163-8>
- Porres, J. (2004). *Natural History of Tinea Pedis*. Retrieved from http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/04/briefing/4036b1_04_natural_history_of_tinea_pedis.htm
- Ranke, J., & Jastorff, B. (2000). Multidimensional risk analysis of antifouling biocides. *ESPR*,

7(2), 105–114. <http://doi.org/10.1065/espr199910.003>

Ravikumar, H. R., Rao, S. S., & Karigar, C. S. (2012). Biodegradation of paints: A current status. *Indian Journal of Science and Technology*, 5(1), 1977–1987.

Ren, X., & Liang, J. (2015). Smart anti-microbial composite coatings for textiles and plastics. In M. F. Montemor (Ed.), *Smart Composite Coatings and Membranes* (pp. 235–259). Elsevier Ltd. <http://doi.org/10.1016/B978-1-78242-283-9.00009-9>

Ristic, T., Fras, L., Novak, M., Kralj, M., Sonjak, S., Cimerman, N., & Strnad, S. (2011). Antimicrobial efficiency of functionalized cellulose fibres as potential medical textiles. *Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*, 36–51.

Roden, K. (2010). Biocides in antimicrobial paints. *Microbiology Australia*, 31(4), 198–200. <http://doi.org/10.1071/MA10198>

Sánchez, B. M., Ferreirós, M. P., Fernández-Redondo, V., & Pérez, J. T. (2002). *Tinea pedis causada por Trichophyton violaceum*. *Actas Dermo-Sifiliográficas* (Vol. 93). Elsevier. Retrieved from <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001731002791679>

SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks). (n.d.). *Nanosilver: safety, health and environmental effects and role in antimicrobial resistance*. <http://doi.org/10.2772/76851>

Sedlarik, V. (2013). Antimicrobial Modifications of Polymers. *Biodegradation - Life of Science*. <http://doi.org/10.5772/52777>

Segrè, J., Coffey, P., Metzler, M., Villadiego, S., Brandes, N., Hodgins, S., ... Morris, S. (2012). Chlorhexidine for Umbilical Cord Care, (February).

Sharma, A. (2012). An Ultraviolet-Sterilization Protocol for Microtitre Plates. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology*, 16(April), 144–147.

Shimamura, T., Kubota, N., & Shibuya, K. (2012). Animal model of dermatophytosis. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, 11. <http://doi.org/10.1155/2012/125384>

Siedenbiedel, F., & Tiller, J. C. (2012). Antimicrobial polymers in solution and on surfaces: Overview and functional principles. *Polymers*, 4(1), 46–71.

<http://doi.org/10.3390/polym4010046>

Smart Inovation Lda. (2016). Smart Inovation. Retrieved March 3, 2016, from <http://www.smartinnovation.com/>

Spickler, A. R. (2013). Dermatophytosis. Retrieved from <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/factsheets.php>

White, P. J., Biskup, B., Elzenga, J. T. M., Homann, U., Thiel, G., Wissing, F., & Maathuis, F. J. M. (1999). Advanced patch-clamp techniques and single-channel analysis. *Journal of Experimental Botany*, *50*, 1037–1054.

White, W. C., Bellfield, R., Ellis, J., & Vandendaele, I. P. (2007). Controlling the Spread of Nosocomial Infections in Hospital Wards by the Use of Antimicrobials on Textiles , Facilities and Devices. In *MEDTEX 07 – Fourth International Conference and Exhibition on Healthcare and Medical Textiles* (pp. 1–18). Bolton.

Windler, L., Height, M., & Nowack, B. (2013). Comparative evaluation of antimicrobials for textile applications. *Environment International*, *53*, 62–73. <http://doi.org/10.1016/j.envint.2012.12.010>

World Health Organization, (Who). (2011). *Report on the Burden of Endemic Health Care-Associated Infection Worldwide. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.*

Yamanaka, H. T., Barbosa, F. S., Bettiol, N. L. S., Tamdjian, R. M. M., Fazenda, J., Bonfim, G., ... Beger, R. (2006). Guia técnico ambiental tintas e vernizes- série P+L, 70. Retrieved from <http://www.crq4.org.br/downloads/tintas.pdf>

Yezli, S., Barbut, F., & Otter, J. A. (2014). Surface Contamination in Operating Rooms: A Risk for Transmission of Pathogens? *Surgical Infections*, *15*(6), 694–699. <http://doi.org/10.1089/sur.2014.011>

Zyara, A., Torvinen, E., Veijalainen, A.-M., & Heinonen-Tanski, H. (2016). The Effect of UV and Combined Chlorine/UV Treatment on Coliphages in Drinking Water Disinfection. *Water*, *8*(4), 130. <http://doi.org/10.3390/w8040130>

Anexos

A. Avaliação do crescimento de *Aspergillus niger* por análise visual

A.1. Em amostras têxteis

Tabela 17- Esquema de avaliação do crescimento de fungos nas amostras (adaptado de CT 4 (CITEVE), 2005)

Grau de crescimento	Avaliação
0 ^a	sem crescimento aparente mesmo visto com uma lupa (ampliação 50×)
1 ^a	sem crescimento visível, sem aparelho de ampliação, mas claramente visível com uma lupa
2	crescimento visível sem aparelho de ampliação, cobrindo até 25% da amostra
3	crescimento visível sem aparelho de ampliação, cobrindo até 50% da amostra
4	crescimento considerável, cobrindo mais de 50% da amostra
5	crescimento forte, cobrindo toda a superfície da amostra

^a Se o crescimento dos fungos estiver total ou parcialmente suprimido na proximidade da amostra, descrever e medir a distância da zona de inibição.

A.2. Em meio agar (na zona de contacto com a amostra)

Tabela 18- Esquema de avaliação do crescimento de fungos no meio agar, na zona de contacto com a amostra (adaptado de CT4 (CITEVE), 2005)

Grau de crescimento	Avaliação
0 ^a	sem crescimento aparente mesmo visto com uma lupa (ampliação 50×)
1 ^a	sem crescimento visível, sem aparelho de ampliação, mas claramente visível com uma lupa
2	crescimento visível sem aparelho de ampliação, intensidade até 25% do controlo
3	crescimento visível sem aparelho de ampliação, intensidade até 50% do controlo
4	crescimento considerável, intensidade mais de 50% do controlo
5	crescimento forte, intensidade igual à do controlo

^a A inibição significa “não crescimento” no agar em torno da amostra. A inibição incompleta (crescimento reduzido) não deve ser classificada como inibição. Se o crescimento dos fungos no agar estiver parcialmente suprimido perto da amostra, descrevê-lo.

B. Determinação do número de bactérias viáveis, N

B.1. Controlo negativo: placa de madeira com tinta não tratada (sem a formulação Si Bactericida Aditivo Tintas e Vernizes)

Tabela 19- Cálculo do número de bactérias viáveis (N) em placas de madeira com tinta de base aquosa mate contendo 3 % e 4% em massa de Si Bactericida Aditivo Tintas e Vernizes após 24 h e em placas de madeira com tinta não tratada (sem a formulação Si Bactericida Aditivo Tintas e Vernizes)

Amostra	Tempo (h)	N_1 (células/cm ²)	N_2 (células/cm ²)	N_3 (células/cm ²)	$N_{médio}$	Desvio padrão
Placa de madeira com tinta não tratada	0	2,41E+04	2,47E+04	2,28E+04	2,39E+04	9,55E+02
Placa de madeira com tinta não tratada	24	5,66E+06	5,56E+06	5,84E+06	5,69E+06	1,43E+05
Placa de madeira com tinta tratada (3% em massa)	24	10	10	10	10	0
Placa de madeira com tinta tratada (4% em massa)	24	10	10	10	10	0

B.2. Controlo negativo: placa de vidro sem tinta (sem formulação Si)

Tabela 20- Cálculo do número de bactérias viáveis (M) em placas de madeira com tinta de base aquosa mate contendo 3% e 4% em massa de Si Bactericida Aditivo Tintas e Vernizes após 24 h e em placas de vidro sem tinta (sem formulação Si) às 0 h e 24 h

Amostra	Tempo (h)	N_1 (células/cm ²)	N_2 (células/cm ²)	N_3 (células/cm ²)	$N_{médio}$	Desvio padrão
Placa de vidro sem tinta	0	2,72E+04	2,59E+04	2,28E+04	2,53E+04	2,25E+03
Placa de vidro sem tinta	24	6,94E+06	6,53E+06	7,03E+06	6,83E+06	2,66E+05
Placa de madeira com tinta tratada (3% em massa)	24	10	10	10	10	0
Placa de madeira com tinta tratada (4% em massa)	24	10	10	10	10	0

C. Validação do teste Bactericida Aditivo Tintas

C.1. Controlo negativo: placa de madeira com tinta não tratada (sem a formulação Si Bactericida Aditivo Tintas e Vernizes)

- Condição 1:

$$\frac{L_{max} - L_{min}}{L_{médio}} \leq 0,2$$

Tabela 21- Validação da condição 1, para o controlo negativo: placa de madeira com tinta não tratada (sem a formulação Si Bactericida Aditivo Tintas e Vernizes)

Placa de madeira com tinta não tratada				
Tempo (h)		Valor		Valor
0	N_{max}	2,47E+04	L_{max}	4,39
	N_{min}	2,28E+04	L_{min}	4,36
	$N_{médio}$	2,39E+04	$L_{médio}$	4,38
Condição			0,008	≤0,2

- Condição 2:

$$6,2 \times 10^3 \frac{\text{células}}{\text{cm}^2} \leq N_{médio} \leq 2,5 \times 10^4 \frac{\text{células}}{\text{cm}^2}$$

Tabela 22- Validação da condição 2, para o controlo negativo: placa de madeira com tinta não tratada (sem a formulação Si Bactericida Aditivo Tintas e Vernizes)

Placa de madeira com tinta não tratada			
Tempo (h)		Valor	Condição
0	$N_{médio}$	2,39E+04	$\geq 6,2 \times 10^3$
			$\leq 2,5 \times 10^4$

- Condição 3:

$$N \geq 6,2 \times 10^1 \frac{\text{células}}{\text{cm}^2}$$

Tabela 23- Validação da condição 3, para o controlo negativo: placa de madeira com tinta não tratada (sem a formulação Si Bactericida Aditivo Tintas e Vernizes)

Placa de madeira com tinta não tratada			
Tempo (h)		Valor	Condição
24	N_1	5,66E+06	$\geq 6,2 \times 10^1$
	N_2	5,56E+06	
	N_3	5,84E+06	

C.2. Controlo negativo: placa de vidro sem tinta (sem formulação Si)

- Condição 1:

$$\frac{L_{max} - L_{min}}{L_{medio}} \leq 0,2$$

Tabela 24- Validação da condição 1, para o controlo negativo: placa de vidro sem tinta (sem formulação Si)

Placa de vidro sem tinta				
Tempo (h)		Valor		Valor
0	N_{max}	2,72E+04	L_{max}	4,43
	N_{min}	2,28E+04	L_{min}	4,36
	N_{medio}	2,53E+04	L_{medio}	4,40
Condição			0,017	$\leq 0,2$

- Condição 2:

$$6,2 \times 10^3 \frac{\text{células}}{\text{cm}^2} \leq N_{medio} \leq 2,5 \times 10^4 \frac{\text{células}}{\text{cm}^2}$$

Tabela 25- Validação da condição 2, para o controlo negativo: placa de vidro sem tinta (sem formulação Si)

Placa de vidro sem tinta			
Tempo (h)		Valor	Condição
0	N_{medio}	2,53E+04	$\geq 6,2 \times 10^3$
			$\leq 2,5 \times 10^4$

- Condição 3:

$$N \geq 6,2 \times 10^1 \frac{\text{células}}{\text{cm}^2}$$

Tabela 26- Validação da condição 3. para o controle negativo: placa de vidro sem tinta (sem formulação Si)

Placa de vidro sem tinta			
Tempo (h)		Valor	Condição
24	N_1	6,94E+06	$>6,2 \times 10^1$
	N_2	6,53E+06	
	N_3	7,03E+06	

D. Cálculo da atividade antibacteriana, R

$$R = (U_t - U_0) - (A_t - U_0) = U_t - A_t$$

D.1. Placa de madeira com tinta de base aquosa mate contendo 3% e 4% em massa de Si Bactericida Aditivo Tintas e Vernizes

D.1.1. Controlo negativo: placa de madeira com tinta não tratada (sem a formulação Si Bactericida Aditivo Tintas e Vernizes)

Tabela 27- Determinação da atividade antibacteriana, R , com o controlo negativo: placa de madeira com tinta não tratada (sem a formulação Si Bactericida Aditivo Tintas e Vernizes)

Placa de madeira com tinta não tratada					
Tempo (h)	N	Valor	Log_{10}	U_i	Desvio padrão
24	N_1	5,66E+06	6,75	6,75	1,09E-02
	N_2	5,56E+06	6,75		
	N_3	5,84E+06	6,77		
Placa de madeira com tinta tratada (3% e 4% em massa)					
Tempo (h)	N	Valor	Log_{10}	A_t	Desvio padrão
24	N_1	10	1	1	0
	N_2	10	1		
	N_3	10	1		

R	5,75
-----	------

D.1.2. Controlo negativo: placa de vidro sem tinta (sem formulação Si)

Tabela 28- Determinação da atividade antibacteriana, R , com o controlo negativo: placa de vidro sem tinta (sem formulação Si)

Placa de vidro sem tinta					
Tempo (h)	N	Valor	Log_{10}	U_i	Desvio padrão
24	N_1	6,94E+06	6,84	6,83	1,71E-02
	N_2	6,53E+06	6,81		
	N_3	7,03E+06	6,85		
Placa de madeira com tinta tratada (3% e 4% em massa)					
Tempo (h)	N	Valor	Log_{10}	A_i	Desvio padrão
24	N_1	10	1	1	0
	N_2	10	1		
	N_3	10	1		

R	5,83
-----	------