

Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Pedro André Soares Almendra Ferreira

Estudo da eficácia e durabilidade de nanopartículas com diferentes agentes antimicrobianos em materiais têxteis funcionais

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

Trabalho efetuado sob a orientação da
Professora Doutora Mariana Henriques
co-orientação da
Doutora Fernanda Gomes
e supervisão da
Engenheira Inês Figueiredo

DECLARAÇÃO

Nome: Pedro André Soares Almendra Ferreira

Orientadora: Mariana Contente Rangel Henriques

Co-orientadora: Fernanda Isabel Antunes Gomes

Supervisora na empresa: Inês Capitão Figueiredo

Ano de conclusão: 2015

Designação do Mestrado: Mestrado Integrado em Engenharia Biológica – Ramo

Tecnologia Química e Alimentar

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:

Título em PT: Estudo da eficácia e durabilidade de nanopartículas com diferentes agentes antimicrobianos em materiais têxteis funcionais

Título em EN: Study on the efficacy and durability of functionalized nanoparticles with antimicrobial agents on textile materials

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

Braga, Universidade do Minho, _____ / _____ / _____

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação não seria possível sem os apoios que foram diretamente e indiretamente recebidos. Desta forma, escrevo algumas palavras com um profundo sentimento de agradecimento.

Como sem conhecimento nada disto seria possível, deixo um agradecimento por toda a competência e pelo saber que me passaram com paciência e simpatia: à Professora Mariana Henriques pela orientação e por toda a disponibilidade e apoio ao longo da dissertação; à Doutora Fernanda Gomes por ter estado presente desde o início desta investigação e que sem a sua ajuda constante seria muito mais difícil de realizar; à supervisora na empresa Success Gadget, Engenheira Inês Figueiredo, pela oportunidade e por todas as instruções e ensinamentos desde o início do estágio.

O maior e mais importante agradecimento, quase nunca demonstrado, dedico aos meus pais, pelo apoio que sempre me deram a todos os níveis e ao meu irmão pelo papel importante que sempre teve na minha vida pessoal e formação académica.

Porque as melhores lembranças que ficarão na memória destes tempos, que culminaram nesta dissertação, foram passadas convosco, um obrigado aos “manos” por todos os momentos que passamos juntos.

A todos os outros que me acompanharam nesta caminhada, às “manas”, às afilhadas, aos presentes no CEB e aos presentes na empresa, a todos os outros familiares e amigos deixo um muito obrigado.

RESUMO

Nas últimas décadas tem-se assistido a importantes desenvolvimentos na área dos materiais têxteis funcionais bem como na crescente aplicação biotecnológica de nanopartículas. Além disso, nos dias de hoje, a principal preocupação neste tipo de materiais recai sobre a durabilidade do agente antimicrobiano presente nos diferentes materiais têxteis. Assim, o objetivo da presente dissertação consistiu no estudo da eficácia e durabilidade de nanopartículas com diferentes agentes antimicrobianos, peróxido de hidrogénio e ácido peracético, incorporadas em materiais têxteis funcionais.

A fixação das nanopartículas contendo os diferentes agentes antimicrobianos foi feita recorrendo a duas técnicas: esgotamento e *pad-batch*. A eficácia da atividade antibacteriana dos materiais têxteis funcionais foi realizada de acordo com a norma JIS L 1902:2008, em *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*. Além do estudo da atividade antibacteriana, realizou-se a caracterização das nanopartículas e dos materiais têxteis funcionalizados por diferentes técnicas: Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), microscopia eletrónica de varrimento (SEM), microscopia eletrónica de transmissão (TEM) e dispersão de luz dinâmica (DLS). De maneira a fazer um estudo comparativo entre a atividade antibacteriana e a presença do agente antimicrobiano, realizou-se a quantificação do princípio ativo no material têxtil por iodometria. Após estes testes iniciais as amostras sofreram 20 lavagens e quer a atividade antimicrobiana quer a quantificação do agente foram realizadas de novo.

Pela análise da atividade antimicrobiana dos materiais têxteis funcionais foi possível verificar uma taxa de redução de 100 % nas amostras produzidas inicialmente. Estes resultados foram de encontro com os obtidos pelas técnicas de caracterização utilizadas onde foi possível verificar as diferenças entre os materiais têxteis com e sem funcionalização e a presença quer das nanopartículas quer do agente ativo nos materiais têxteis. Os materiais têxteis obtidos após as várias lavagens apresentaram um decréscimo significativo na taxa de redução de microrganismos em relação à obtida inicialmente de acordo com os testes de atividade antimicrobiana realizados. Esta análise foi comprovada com a quantificação do agente ativo onde se verificaram menores concentrações do mesmo após as lavagens.

Com este estudo foi possível concluir que, embora os materiais têxteis apresentassem atividade antimicrobiana, esta diminui ou desaparece após lavagens.

ABSTRACT

In recent decades major developments were performed in the area of biofunctional textiles and the application of nanoparticles in biotechnology is growing. Nowadays, the main concern in this type of material is the durability of the antimicrobial agent incorporated on textiles. So, the objective of the present work consisted on the study of the efficacy and durability of nanoparticles, with different antimicrobial agents (hydrogen peroxide and peracetic acid) incorporated into functional textiles.

The incorporation of nanoparticles containing different antimicrobial agents, on the textile, was done using two techniques: exhaustion and pad-batch. The efficacy of the antibacterial activity of the functionalized textile material was performed according to the JIS L 1902: 2008 standard, using *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*. Besides the study of the antibacterial activity, the characterization of nanoparticles and functionalized textile materials was done using different techniques: Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM), and dynamic light scattering (DLS). In order to make a comparative study between the antibacterial activity and the presence of the antimicrobial agent, the quantification of the active ingredient in the textiles was done by iodometry. After these tests the samples underwent 20 washes and the antimicrobial activity tests and the quantification of the antimicrobial agent were repeated.

By analyzing the antimicrobial activity of the functional textiles it was observed a complete reduction in the samples produced initially. These results were in agreement with the ones obtained with the characterization techniques since it was possible to verify the differences between the textile materials with and without functionalization and the presence of the nanoparticles as well as of the active agent on the textile materials. The textile materials obtained after several washes showed a significant decrease in the reduction rate of microorganisms compared to the one obtained initially according to antimicrobial activity tests. This analysis was confirmed by the lower concentration of the active agent obtained after washing by its quantification.

With this study it was concluded that, although presenting some antimicrobial activity, the textiles lost it after several washing steps.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	III
RESUMO	V
ABSTRACT	VII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XIII
ÍNDICE DE FIGURAS	XV
ÍNDICE DE TABELAS	XIX
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Organização da dissertação	1
1.2. Empresa em estudo	1
1.3. Enquadramento	2
2. OBJETIVOS	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
3.1. O algodão	7
3.2. Colonização bacteriana de materiais têxteis	8
3.2.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	8
3.2.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	9
3.3. Compostos antimicrobianos nos materiais têxteis	10
3.3.1. Incorporação dos agentes antimicrobianos nos materiais têxteis	12
3.3.2. Exemplos de compostos antimicrobianos nos materiais têxteis funcionais	15
3.3.3. Mecanismo de ação	19
3.3.4. Avaliação da atividade antimicrobiana nos materiais têxteis	20
3.4. Técnicas de caracterização físico-química dos materiais têxteis funcionais	22
3.4.1. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier	22
3.4.2. Microscopia eletrônica de transmissão	24
3.4.3. Microscopia eletrônica de varrimento	25
3.4.4. Dispersão de luz dinâmica	26

3.4.5. Potencial zeta	26
4. METODOLOGIA	29
4.1. Funcionalização dos materiais têxteis	29
4.2. Caracterização físico-química	31
4.2.1. Caracterização do tamanho e estabilidade das nanopartículas.....	32
4.2.2. Caracterização dos materiais têxteis funcionais	33
4.3. Quantificação do princípio ativo.....	34
4.3.1. Titulação do meio líquido por iodometria	34
4.3.2. Titulação do material têxtil por iodometria	35
4.4. Avaliação da atividade antimicrobiana	35
4.4.1. Microorganismos e condições de crescimento.....	36
4.4.2. Determinação das curvas de calibração	36
4.4.3. Determinação das CMI e CMB	37
4.4.4. Determinação da eficácia e atividade antimicrobiana de materiais têxteis	38
4.4.5. Determinação da eficácia e atividade antimicrobiana dos compostos Luprintol PE e Prote-pon KB.....	39
4.5. Avaliação da durabilidade da atividade antimicrobiana dos materiais têxteis funcionais ..	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1. Determinação das CMI e CMB	42
5.2. Caracterização das nanopartículas	42
5.2.1. TEM	42
5.2.2. DLS.....	43
5.2.3. Potencial zeta	44
5.3. Funcionalização e caracterização dos materiais têxteis funcionais antes das lavagens....	45
5.3.1. Primeira fase de amostras dos materiais têxteis funcionais.....	45
5.3.2. Segunda fase de amostras dos materiais têxteis funcionais	53

5.4. Avaliação da eficácia e durabilidade da atividade antimicrobiana dos materiais têxteis funcionais após as lavagens.....	60
5.4.1. Quantificação do princípio ativo nos materiais têxteis funcionais após as lavagens ..	61
5.4.2. Determinação da eficácia e atividade antibacteriana dos materiais têxteis funcionais após as lavagens	62
6. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS	67
BIBLIOGRAFIA.....	71
ANEXOS	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AATCC	Associação Americana de Químicos Têxteis e Coloristas (<i>American Association of Textile Chemists and Colorists</i>)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
Ag	Prata
AgNO₃	Nitrato de prata
ATR	Reflectância total atenuada (<i>Attenuated Total Reflectance</i>)
BSA	Albumina de soro bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
C	Carbono
Cl	Cloro
CMB	Concentração Mínima Bactericida
CMI	Concentração Mínima Inibitória
CQA	Compostos quaternários de amônio
CH₃COOH	Ácido acético
C₂H₄O₃	Ácido peracético
DLS	Dispersão dinâmica de luz (<i>Dynamic Light Scattering</i>)
ELS	Espalhamento de luz eletroforético (<i>Electrophoretic Light Scattering</i>)
EPA	Agência de Proteção Ambiental
FTIR	Espetroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>)
H	Hidrogênio
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
IS	Norma Indiana (<i>Indian Standard</i>)
ISO	Organização Internacional para Padronização (<i>International Organization for Standardization</i>)
JIS	Normas industriais japonesas (<i>Japanese Industrial Standards</i>)
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KI	Iodeto de potássio
MHB	Meio Mueller-Hinton (<i>Mueller-Hinton Broth</i>)

N	Azoto
Na₂S₂O₃	Tiosulfato de Sódio
OH	Grupo Hidroxilo
PAA	Ácido Peracético (<i>Peracetic acid</i>)
PBS	Tampão fosfato-salino (<i>Phosphate-Buffered Saline</i>)
PH	Peróxido de Hidrogénio
R. B.	Razão de banho
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SEM	Microscópio eletrónico de varrimento (<i>Scanning Electron Microscope</i>)
SN	Norma Suiça (<i>Swiss Norm</i>)
TEM	Microscópio eletrónico de transmissão (<i>Transmission Electron Microscopy</i>)
TSA	Agar triptona de soja (<i>Tryptic Soy Agar</i>)
TSB	Meio triptona de soja (<i>Tryptic Soy Broth</i>)
UFC	Unidades formadoras de Colónias
WOB	Sem branqueador ótico (<i>Without Optical Brightener</i>)
ζ	zeta

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO

Figura 1.1. Logótipo da empresa Success Gadget.	2
---	---

CAPÍTULO 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 3.1. <i>Gossypium arboreum</i>	7
Figura 3.2. Exemplo de colónias de <i>K. pneumoniae</i> em agar triptona de soja (TSA – <i>Tryptic Soy Agar</i>)	8
Figura 3.3. Exemplo de colónias de <i>S. aureus</i> em TSA.	9
Figura 3.4. Processo de esgotamento.	13
Figura 3.5. Processo de <i>pad-batch</i>	13
Figura 3.6. Estrutura química do PH.	15
Figura 3.7. Produção de PAA.	16
Figura 3.8. Tecido com atividade antimicrobiana visível de acordo com a Norma JIS I 1902:2008.....	21
Figura 3.9. Espectro caraterístico do algodão obtido por FTIR.....	23
Figura 3.10. Grupos funcionais e a sua relação com as regiões de absorção de infravermelhos.	23
Figura 3.11. Imagem de fibras de algodão obtida por SEM.....	25

CAPÍTULO 4. METODOLOGIA

Figura 4.1. NanoSEM – FEI Nova 200 (FEG/SEM).	332
---	-----

CAPÍTULO 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 5.1. Exemplo de uma placa utilizada no teste de microdiluição para determinação da CMI do PH para <i>S. aureus</i> e <i>K. pneumoniae</i>	41
Figura 5.2. Imagens de nanopartículas de sílica obtidas por TEM.	42

Figura 5.3. Distribuição do tamanho por intensidade.....	43
Figura 5.4. Potencial ζ de nanopartículas de sílica.....	44
Figura 5.5. Espectro obtido por FTIR-ATR para o controlo negativo (a preto) e para o controlo 2 (a vermelho). (a) Materiais têxteis preparados por esgotamento; (b) Materiais têxteis preparados por <i>pad-batch</i>	46
Figura 5.6. Imagens SEM de materiais têxteis funcionais com nanopartículas.....	46
Figura 5.7. Amostras analisadas por JIS L 1902:2008. Ensaio feito usando <i>S. aureus</i> . (a) Controlo negativo 1 produzido por esgotamento (b) NPPH2 produzida por esgotamento; (c) NPPA2 produzida por esgotamento.....	49
Figura 5.8. Taxa de redução (%) para (a) <i>S. aureus</i> e (b) <i>K. pneumoniae</i> obtida por JIS L 1902:2008 – método quantitativo para as diferentes amostras preparadas na primeira fase com ambos os agentes e para o controlo negativo 1.....	51
Figura 5.9. Ensaio realizado com <i>S. aureus</i> . (a) Prote-pon KB; (b) Luprintol PE.....	52
Figura 5.10. Controlo negativo 2. Ensaio realizado com <i>S. aureus</i>	52
Figura 5.11. Espectro obtido por FTIR para o controlo negativo 1 (a preto) e controlo positivo (a vermelho). (a) Materiais têxteis preparados por esgotamento; (b) Materiais têxteis preparados por <i>pad-batch</i>	54
Figura 5.12. Espectro obtido por FTIR para o controlo negativo 1 (a preto) e a amostra NPPH3 (a vermelho). (a) Materiais têxteis preparados por esgotamento; (b) Materiais têxteis preparados por <i>pad-batch</i>	55
Figura 5.13. Espectro obtido por FTIR para as amostras NPPH3 preparadas por <i>pad-batch</i> (a preto) e esgotamento (a vermelho).....	55
Figura 5.14. Amostras produzidas por esgotamento analisadas por JIS L 1902:2008. Ensaio realizado usando (I) <i>S. aureus</i> ; (II) <i>K. pneumoniae</i> . (a) Controlo negativo; (b) Controlo positivo; (c) NPPH3.....	57
Figura 5.15. Taxa de redução (%) obtida por JIS L 1902:2008 – método quantitativo para as diferentes amostras. (a) <i>S. aureus</i> e (b) <i>K. pneumoniae</i>	59
Figura 5.16. Amostras analisadas após as 20 lavagens pelo método qualitativo da norma JIS L 1902:2008. Ensaio realizado usando <i>S. aureus</i> (a) controlo negativo; (b) Controlo positivo preparado por esgotamento; (c) Controlo positivo preparado por <i>pad-batch</i> ; (d) NPPH3 preparado por esgotamento; (e) NPPH3 preparado por <i>pad-batch</i>	62

Figura 5.17. Taxa de redução (%) para (a) *K. pneumoniae* e (b) *S. aureus* obtida por JIS L 1902:2008 – método quantitativo para o controlo negativo, controlo positivo e NPPH3 após as lavagens..... 64

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO 4. METODOLOGIA

Tabela 4.1. Composição dos banhos para as diferentes amostras	30
Tabela 4.2. Composição dos banhos para as diferentes amostras após aumento da concentração de PH	31

CAPÍTULO 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 5.1. Valores da CMI e CMB do PH e PAA para <i>S. aureus</i> e <i>K. pneumoniae</i>	41
Tabela 5.2. Concentração de PH nas diferentes amostras	47
Tabela 5.3. Amostras NPPH1, NPPH2, NPPA1, NPPA2 e controlo negativo 1 analisadas por JIS L 1902:2008 - Método qualitativo. Ensaio feito usando <i>S. aureus</i> e <i>K. pneumoniae</i> . (+) presença de atividade antimicrobiana; (-) ausência de atividade antimicrobiana.....	50
Tabela 5.4. Concentração de PH nas diferentes amostras	56
Tabela 5.5. Amostras NPPH3, controlo positivo e controlo negativo analisadas por JIS L 1902:2008 – Método qualitativo. Ensaio feito usando <i>S. aureus</i> e <i>K. pneumoniae</i> . (+) presença de atividade antimicrobiana; (-) ausência de atividade antimicrobiana.....	58
Tabela 5.6. Concentração média de PH após as diferentes lavagens dos têxteis antimicrobianos produzidos pelos dois métodos (esgotamento e <i>pad-batch</i>)	60
Tabela 5.7. Concentração de PH nas diferentes amostras após as lavagens	61
Tabela 5.8. Amostras NPPH3, controlo positivo e controlo negativo analisadas após as lavagens por JIS L 1902:2008 – Método qualitativo. Ensaio feito usando <i>S. aureus</i> e <i>K. pneumoniae</i> . (+) presença de atividade antimicrobiana; (-) ausência de atividade antimicrobiana.....	63

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO

1.1. Organização da dissertação

Esta dissertação está dividida em seis capítulos.

No presente capítulo é feito um enquadramento geral sob o tema a desenvolver.

No segundo capítulo, são delineados os objetivos principais deste trabalho e que foram seguidos ao longo da investigação.

No capítulo 3 é feita uma revisão bibliográfica dos vários temas abordados durante a dissertação como uma análise aos diferentes agentes antimicrobianos e a inclusão destes em materiais têxteis, assim como das técnicas utilizadas.

No capítulo 4 é descrita toda a metodologia realizada na parte experimental desta dissertação e no penúltimo capítulo são analisados e discutidos os resultados obtidos.

O último capítulo da tese diz respeito às conclusões da dissertação, onde se encontram também algumas sugestões para trabalhos futuros.

1.2. Empresa em estudo

A empresa onde as amostras têxteis foram desenvolvidas e onde se realizou parte da sua análise, a Success Gadget (Figura 1.1), sediada em Barcelos, é uma empresa que assenta o seu trabalho em princípios tecnológicos extremamente avançados e especializados aliado ao processo de investigação e desenvolvimento. O seu foco principal é o de conceber e produzir soluções na área dos têxteis funcionais que promovam o conforto e bem-estar, assim como minimizar ou resolver necessidades das pessoas de forma a contribuir para uma sociedade mais saudável. O seu foco assenta em duas soluções principais: repelência de mosquitos, de longa duração, e soluções antimicrobianas recarregáveis. Estas podem ser usadas no uso doméstico ou profissional em peças de roupa ou em tintas, vernizes, etc. A tecnologia desenvolvida pela empresa funciona como uma plataforma de transporte de princípios ativos e permite desenvolver produtos com várias funcionalidades e aplicadas em diferentes sectores e mercados.



Figura 1.1. Logótipo da empresa Success Gadget.

Além de outras áreas de investigação, esta empresa utiliza a nanotecnologia na produção de vestuário funcional e inteligente, fixando nanopartículas que são capazes de resistir ao longo do tempo de vida do produto e aos seus ciclos de lavagem. A empresa trabalha em cooperação com vários institutos e laboratórios de renome como o Instituto de Higiene e Medicina Tropical em Portugal, o *Swiss Tropical and Public Health Institute* da Suíça e o *Siri Life Science* da Índia. As suas soluções aplicadas em produtos têxteis são feitas segundo a norma Oeko-Tex100 e apresentam o menor grau de toxicidade em todas as categorias pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA).

Todo o processo de produção das diferentes nanopartículas utilizadas ao longo deste trabalho foi da responsabilidade da empresa.

1.3. Enquadramento

O vestuário está associado ao homem desde a pré-história havendo arquivos arqueológicos que demonstram a produção de vestuário pelo homem primitivo muito antes de plantar ou domesticar animais. Os produtos têxteis acompanharam e acompanham a evolução humana ao longo de toda a sua existência sendo que atualmente cada pessoa consome cerca de 5 kg a 10 kg de produtos têxteis por ano. Antigamente os produtos têxteis serviam apenas como uma proteção das condições climatéricas adversas e para conforto fisiológico. No entanto, nas últimas décadas, este setor tem feito avanços tecnológicos na indústria de maneira a diversificar-se da concorrência. Têm-se verificado assim novas tecnologias nas diferentes fases do processo de fabrico de maneira a produzir materiais têxteis com propriedades acrescidas das demais. Esta evolução obriga a uma versatilidade de processos de maneira a conciliar o *design* necessário e sustentabilidade ecológica à segurança e funcionalidade nos novos produtos.

Essa inovação fez com que os produtos produzidos pelas empresas se diferenciassem de maneira a consolidar e criar vantagens competitivas. Desta maneira, os consumidores têm vindo a beneficiar com os novos produtos criados que podem oferecer utilidades a vários níveis. O surgimento de têxteis funcionais fez com que se estabelecesse um novo caminho para os

produtos têxteis fazendo com que, por exemplo, diversas peças de tecido possuíssem propriedades antimicrobianas e, conseqüentemente, elevadas performances em diversas situações. No entanto, a funcionalização de materiais têxteis inovadores deve ser feita de modo a não comprometer o toque, o aspeto e o conforto dos artigos têxteis.

A nanotecnologia, por exemplo, é uma das tecnologias que capacitou esta inovação fazendo com que a indústria têxtil e a medicina caminhassem a par para o enriquecimento e utilização de materiais têxteis com função antimicrobiana. Este tipo de tecidos possui uma grande importância na dermatologia uma vez que os têxteis estão em contacto com a pele, interagindo de uma forma muito intensa com esta e com vários microorganismos (cutâneos). Estes microorganismos são responsáveis por inúmeros problemas que levam a um impacto económico significativo em diversas áreas, o que justifica o crescente interesse na investigação dedicada aos têxteis funcionais uma vez que o objetivo destes têxteis é o de funcionar como uma estratégia preventiva para limitar a colonização e adesão microbiana.

Estatisticamente, os valores de mercado revelam uma taxa de crescimento de 4 % ao ano a nível mundial neste tipo de indústria (têxteis funcionais). Os têxteis funcionais representam cerca de 20 % a 25 % das exportações do país (Carvalho, 2013).

Os principais mercados são os da União Europeia, com destaque para a Espanha, França, Alemanha e Reino Unido e os Estados Unidos da América. Atualmente, o objetivo é diversificar os destinos de exportação também destes produtos, apostando sobretudo na Ásia, na América Latina e nos países africanos de expressão portuguesa (Carvalho, 2013).

A evolução dos têxteis continuará a acompanhar a evolução humana prevendo-se que a utilização de novos materiais têxteis funcionais continue a aumentar exponencialmente nos próximos tempos.

CAPÍTULO 2. OBJETIVOS

A pertinência da realização desta investigação prendeu-se na importância da produção de materiais têxteis funcionais com atividade antimicrobiana. Assim, esta dissertação teve como finalidade abordar os materiais têxteis funcionais, cujo ponto principal de inovação neste campo científico visa, nos dias de hoje, a obtenção da maior durabilidade possível da atividade antimicrobiana dos mesmos.

O objetivo do presente trabalho consistiu no estudo da eficácia e durabilidade do efeito antimicrobiano de materiais têxteis funcionais com nanopartículas com diferentes agentes antimicrobianos.

No âmbito deste estudo, a investigação centrou-se em algumas etapas principais:

- preparação de materiais têxteis funcionais por técnicas distintas, esgotamento e *pad-batch*, contendo dois agentes antimicrobianos diferentes (peróxido de hidrogénio e ácido peracético);
- verificação da atividade antimicrobiana e caracterização dos diferentes materiais têxteis funcionais;
- validação da durabilidade de ação antimicrobiana dos materiais têxteis funcionais através de testes de resistência à lavagem.

CAPÍTULO 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. O algodão

Os tecidos podem ser feitos a partir de diversos materiais provenientes de quatro fontes principais: animais (lã, seda), plantas (algodão, linho), minerais (amianto, fibra de vidro), e sintética (nylon, poliéster, acrílico). O algodão, a mais importante das matérias-primas para a indústria têxtil, é a forma mais pura de celulose disponível na natureza. É uma fibra esbranquiçada obtida dos frutos de plantas do género *Gossypium* (Figura 3.1), família Malvaceae. O algodão deve ser avaliado especificamente de acordo com o comprimento, a uniformidade de comprimento, a resistência, o micronaire (uma medida da espessura e da maturidade da fibra de algodão), a cor, a preparação, a folha e as impurezas presentes na fibra (Gordon, 2007).



Figura 3.1. *Gossypium arboreum* (Khartasia, 2015).

O algodão tem várias propriedades que fazem dele uma fibra desejável tornando-se importante para aplicações em têxteis funcionais como a sua alta resistência à tração, boa resistência à abrasão, alta absorção de humidade e rápida secagem.

A fibra de algodão apresenta uma estrutura de camadas múltiplas cujas camadas têm composições diferentes, não só nas diferentes estruturas como nos diferentes graus de maturação. A fibra de algodão contém 80 % a 90 % de celulose, onde os outros constituintes são polissacáridos não celulósicos que constituem até 10 % do peso total das fibras. As características físico-químicas da celulose fazem com que o algodão, além da resistência e elasticidade, consiga ter também afinidade à água e permeabilidade. Os constituintes não-celulósicos consistem em pectinas, gorduras e ceras, proteínas, corantes naturais, etc. Estes estão principalmente

localizados na cutícula e no lúmen e são os principais responsáveis pelas características não absorventes. O algodão cru tem que passar por vários processos químicos para obter propriedades adequadas para o uso. Com a lavagem, as substâncias não-celulósicas (cera de pectina, hemicelulose, proteínas, etc) que circundam o núcleo de fibra de celulose são removidos e, como resultado, as fibras tornam-se hidrofílicas e adequadas para o branqueamento, tingimento e outros processamentos (Gordon, 2007).

3.2. Colonização bacteriana de materiais têxteis

Os microrganismos que se encontram principalmente na superfície do corpo humano, e conseqüentemente nos materiais têxteis que são aplicados a este, são bactérias e fungos.

As bactérias podem ser divididas em duas classes: as gram-positivas e as gram-negativas, de acordo, com a presença de uma ou duas membranas celulares, respetivamente. As propriedades/eficácia antimicrobiana dos materiais têxteis deve ser testada para ambas. Neste trabalho, utilizaram-se as bactérias *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*, uma vez que se tratam de uma bactéria gram-negativa e outra gram-positiva, respetivamente.

3.2.1. *Klebsiella pneumoniae*

A *Klebsiella pneumoniae* (Figura 3.2) é uma bactéria gram-negativa, do género *Klebsiella* e da família das Enterobactérias, encapsulada, anaeróbia facultativa em forma de bastonete, não-móvel e que faz a fermentação de lactose (Yu, 2015). Este organismo está rodeado por uma parede celular que aumenta a sua virulência, atuando como uma barreira física para evitar a resposta imunitária do hospedeiro (Yu, 2015).



Figura 3.2. Exemplo de colónias de *K. pneumoniae* em agar triptona de soja (TSA – *Tryptic Soy Agar*) (Hedetniemi, 2014).

Embora seja encontrada na flora normal da boca, pele e intestino, esta bactéria pode provocar alterações destrutivas (morte celular) nos pulmões humanos se inalada. As infecções por *Klebsiella* acontecem principalmente em pessoas com um sistema imunitário comprometido afetando na maioria das vezes, homens de meia-idade e idosos com doenças debilitantes. Muitas destas infecções são contraídas em ambiente hospitalar (infecções nosocomiais). Uma vez que as infecções por *Klebsiella* estão relacionadas com várias doenças, e sendo considerada a *K. pneumoniae* a estirpe mais importante, justifica o estudo de agentes antimicrobianos que sejam eficazes contra esta bactéria (Yu, 2015).

3.2.2. *Staphylococcus aureus*

A *Staphylococcus aureus* (Figura 3.3) é uma bactéria gram-positiva do género *Staphylococcus*.

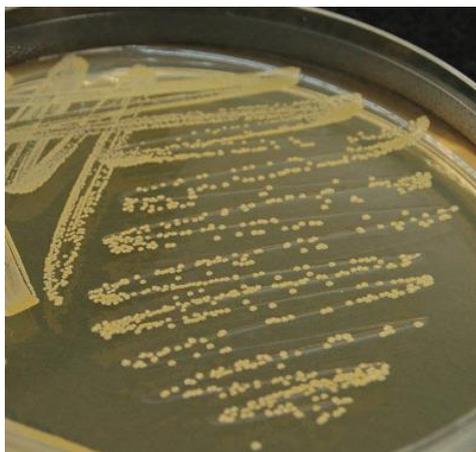


Figura 3.3. Exemplo de colónias de *S. aureus* em TSA (Hedetniemi, 2014).

Esta bactéria é frequentemente encontrada no trato respiratório e na pele do Homem, e embora nem sempre seja patogénica, é uma causa comum de doenças respiratórias (sinusite), infecções cutâneas (furúnculos) e intoxicações alimentares. As estirpes patogénicas promovem infecções por produzirem toxinas e expressarem proteínas de superfície celular que se ligam e inativam anticorpos (Baron, 1996).

As infecções por *S. aureus* podem-se propagar através do contacto com feridas infetadas, contacto pele-a-pele e contacto com objetos como toalhas, lençóis, roupas ou equipamentos desportivos usados por uma pessoa infetada. O aparecimento de estirpes resistentes aos antibióticos é um problema mundial em medicina clínica. Além disso, *S. aureus* é uma das cinco causas mais comuns de infecções nosocomiais e é muitas vezes a causa de infecções de feridas

pós-cirúrgicas fazendo com que, tal como a *K. pneumoniae*, crie um interesse na procura de materiais têxteis funcionais com agentes antimicrobianos (Baron, 1996).

3.3. Compostos antimicrobianos nos materiais têxteis

A aplicação de agentes antimicrobianos nos materiais têxteis remonta à antiguidade quando no antigo Egito usavam ervas e especiarias para preservar as faixas de algodão que eram usadas no processo de mumificação (Fouda, 2011).

Os materiais têxteis para uso ao ar livre ou para uso hospitalar estão constantemente expostos à influência de bactérias e fungos, sendo de extrema importância evitar a proliferação desses mesmos microorganismos. A maior parte dos materiais têxteis atualmente utilizados em hospitais e hotéis são transmissores de infecções cruzadas. Isto deve-se ao facto deste tipo de materiais, especialmente os materiais têxteis feitos a partir de fibras naturais, serem um excelente ambiente para o crescimento microbiano, devido à sua grande área superficial e capacidade para reter a humidade (Windler, Height, & Nowack, 2013).

Nos dias de hoje, vários compostos químicos têm sido utilizados para conferir atividade antimicrobiana aos têxteis. Os agentes antimicrobianos utilizados podem ter duas finalidades diferentes de proteção antimicrobiana, onde a proteção pode ser a do utilizador contra microorganismos patogénicos ou a proteção do próprio têxtil contra odor/danos (mofo, bolor ou podridão) causados pelos microorganismos que os produzem. A colonização bacteriana não é tão prejudicial para as fibras mas é a mais nociva para a saúde humana e a que mais atenção centra para a produção de materiais têxteis com acabamentos antimicrobianos (Vieira, 2006).

Como consequência da sua importância, o número de diferentes agentes antimicrobianos adequados para aplicações têxteis no mercado tem aumentado drasticamente. Estes agentes antimicrobianos diferem na sua estrutura química, eficácia, método de aplicação, resistência à lavagem e influência sobre as pessoas e o meio ambiente, bem como custo. (Vieira, 2006).

Os agentes microbianos podem ter função bactericida, bacteriostática, fungicida e/ou fungistática. Os biocidas incluem agentes que matam as bactérias e os fungos enquanto os bioestáticos inibem o crescimento dos microorganismos. O seu modo de ação é diretamente relacionado com a concentração da substância ativa. A concentração mínima

inibitória (CMI) é a concentração mínima necessária para um agente antimicrobiano ter atividade biostática ao passo que a concentração bactericida mínima (CMB) é a concentração mínima para que este apresente atividade biocida (Andrews, 2006). A eficácia dos agentes antimicrobianos depende diretamente da concentração, a qual não deve ser abaixo da CMI. No entanto, processos como por exemplo as lavagens dos tecidos, podem causar uma redução da concentração da substância ativa, podendo descer abaixo do limite, não sendo a CMI/CMB alcançada (Raoult, 2013).

A velocidade com que o agente atua deverá ser a mais rápida possível dada a velocidade do desenvolvimento dos microrganismos. Ainda assim, existem alguns materiais têxteis em que não é exigido uma velocidade alta de eliminação dos microrganismos e onde a durabilidade do agente microbiano no têxtil é mais importante, como é o caso das cortinas separadoras nos hospitais. Nestes casos, além da durabilidade, é importante que o seu espectro de ação seja elevado. Já para outros materiais como batas cirúrgicas, o seu espectro de atividade deve ser elevado e a eliminação dos microrganismos deve ser rápida. Nesta situação, a durabilidade não é o aspeto mais importante, uma vez que após um curto espaço de tempo as batas terão de ser descartadas e os agentes terão de voltar a ser aplicados (Purwar, 2004). Os agentes antimicrobianos devem ainda ser fácil de aplicação e ser compatíveis com outros processos químicos envolvidos no acabamento têxtil, ser de baixo custo e não devem afetar negativamente as fibras têxteis. Além disso, devem ser resistentes às condições atmosféricas e possuírem durabilidade às lavagens domésticas, lavagens a seco bem como na passagem a ferro (Purwar, 2004).

Os agentes antimicrobianos podem ser incluídos nos acabamentos que são quimicamente ligados à superfície das fibras têxteis, onde atuam como uma barreira de controlo de microrganismos e que entram em contacto com a superfície da fibra (Windler et al., 2013). A ligação do agente à superfície têxtil pode ser assegurada covalentemente, se houver um número suficiente de grupos reativos entre o agente e as fibras, e se o processo de aplicação for realizado sob condições adequadas. Assim, quando se usam agentes antimicrobianos, o mecanismo de ligação química à superfície têxtil e as condições que iniciam ou catalisam a reação deve ser conhecida. Em termos de aplicação industrial, além da eficácia e durabilidade, a escolha de determinado acabamento antimicrobiano deve recair também no impacto do mesmo no meio ambiente, saúde e aspetos de segurança da sua utilização. A libertação de agentes

antimicrobianos para o ambiente pode ter impactos negativos sobre os organismos vivos, podendo afetar bactérias sensíveis e, assim, potencialmente selecionar bactérias resistentes. Dado o impacto que estes agentes antimicrobianos podem ter no ambiente, foi necessário estabelecer alguns requisitos de maneira a que o funcionamento dos mesmos alie a eficácia e a durabilidade à segurança para o ambiente, bem como para o utilizador. Desta forma, devem ser conhecidos os parâmetros exigidos pelas entidades reguladoras (Windler et al., 2013).

Tendo isto em consideração, muita investigação tem-se centrado na síntese de novos agentes antimicrobianos devido à sua necessidade de proteger e preservar as muitas aplicações têxteis e a saúde humana em diferentes áreas, principalmente no setor hospitalar.

3.3.1. Incorporação dos agentes antimicrobianos nos materiais têxteis

Os métodos de introdução dos agentes antimicrobianos nos materiais têxteis podem dividir-se em dois grupos podendo ocorrer durante o processo de fiação (pelo meio de fibras químicas) ou durante a fase de acabamento do tecido.

No primeiro grupo a introdução do agente antimicrobiano é feito na matriz polimérica, anteriormente ou simultaneamente à extrusão da fibra, por processos como “*melt spinning*”, “*dry spinning*” e “*wet spinning*” (Kiron, 2012).

No segundo grupo a aplicação do composto antimicrobiano durante o acabamento dos tecidos e fibras pode ser feito por um processo de esgotamento ou de impregnação (*pad-batch*).

No processo de esgotamento (Figura 3.4) o material têxtil fica em contacto permanente com a solução que contém o agente antimicrobiano por um certo período de tempo, temperatura e rotação de maneira a promover a ligação química por afinidade com a fibra.

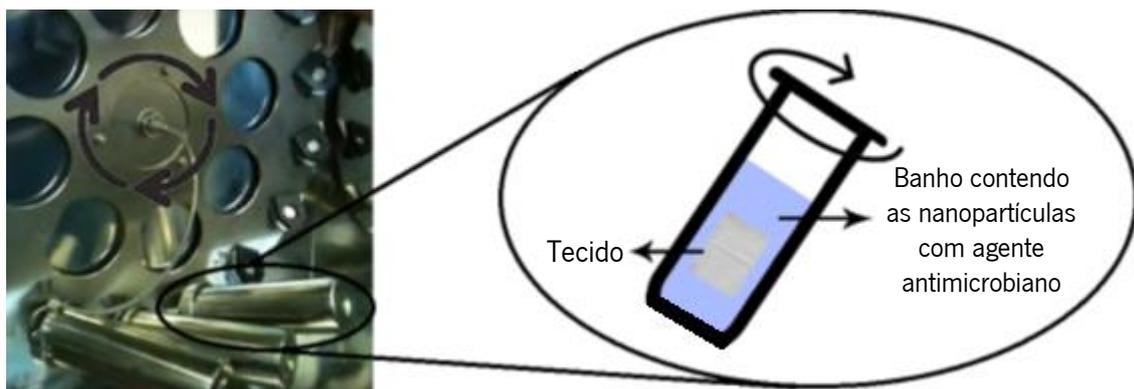


Figura 3.4. Processo de esgotamento.

Quando o agente é incorporado por *pad-batch* (Figura 3.5) o tecido passa por entre rolos espremedores a uma determinada pressão e velocidade de passagem de maneira a garantir uma penetração uniforme do agente antimicrobiano. Os materiais têxteis antimicrobianos que são obtidos por este método permitem o uso de uma vasta gama de compostos antimicrobianos de rápida aplicação com um baixo custo no processo. O desempenho deste processo depende da permanência do composto antimicrobiano no tecido que está relacionado com a sua solubilidade em água aquando da lavagem. Para evitar a sua libertação são geralmente adicionadas substâncias ligantes de maneira a aumentar a sua durabilidade no tecido.

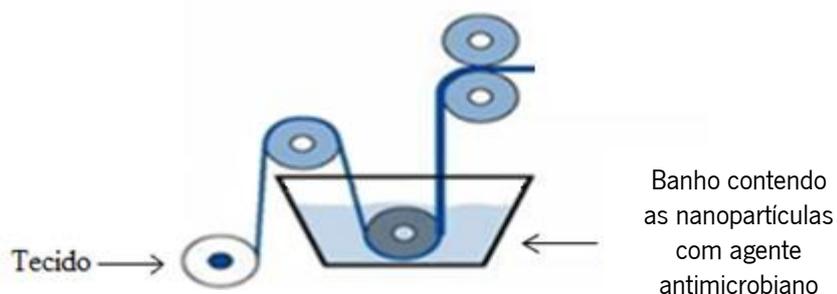


Figura 3.5. Processo de *pad-batch*.

Estes métodos permitem obter materiais têxteis com propriedades antimicrobianas mas cuja principal diferença se encontra na durabilidade do agente antimicrobiano nos têxteis após sucessivas lavagens.

As tecnologias que permitem aumentar a permanência do agente antimicrobiano no tecido podem ser divididas em três grupos: libertação controlada, tratamento à superfície da fibra e ligação química à fibra (Vieira, 2006).

A libertação controlada, cujo principal objetivo é manter a concentração do agente antimicrobiano, é uma opção viável para as fibras sintéticas dado que os compostos podem ser aplicados antes ou durante os processos de extrusão das fibras (Kiron, 2012).

Outro método, adsorção à superfície da fibra, é feito por processos de troca iónica, onde são criadas ligações iónicas entre os grupos funcionais do composto antimicrobiano e os locais carregados ionicamente na fibra que podem também ser feitos por *pad-batch* com resinas (Vieira, 2006).

Quando a ligação à fibra é feita quimicamente, há a total imobilização do agente antimicrobiano e, portanto, o processo de inibição ocorre quando existe contacto do microrganismo com a superfície do material têxtil. Este processo permite, obter uma durabilidade da atividade elevada em fibras celulósicas como o algodão (Vieira, 2006).

Os agentes antimicrobianos ligados covalentemente são muito mais resistentes às lavagens, no entanto, a durabilidade do agente à lavagem não garante a durabilidade da função antimicrobiana. Esta última poderá diminuir ou até mesmo acabar com a acumulação de sujidade ou com a formação de complexos entre o acabamento e os diferentes detergentes que possam ser usados durante as lavagens (Vieira, 2006).

Os agentes antimicrobianos, como foi descrito, podem ser misturados posteriormente com as fibras de forma a obter-se um material antimicrobiano. Estes processos de acabamento (esgotamento e *pad-batch*) embora permitam que o composto se difunda directamente para o interior da fibra, apresentam algumas limitações quanto à durabilidade do agente antimicrobiano. De maneira a tentar otimizar ambos os métodos e contornar este problema, a incorporação de nanopartículas com o princípio ativo antimicrobiano durante os processos de acabamento das fibras permite uma duração prolongada da atividade antimicrobiana, durante o ciclo de vida do artigo têxtil, mesmo depois de várias lavagens. As nanopartículas, além do seu diâmetro característico e elevada área superficial podem ter outras vantagens como maior durabilidade, capacidade antimicrobiana e resistência à água. Estas características fazem das nanopartículas uma das melhores opções para incorporação do agente ativo em materiais têxteis (Soares et al., 2004).

3.3.2. Exemplos de compostos antimicrobianos em materiais têxteis funcionais

A adição de compostos antimicrobianos em têxteis tem sido o ponto principal de estudo na produção de têxteis funcionais. Uma vasta gama de compostos tem sido testada de maneira a verificar quais apresentam as maiores vantagens a ser usados na produção deste tipo de materiais.

3.3.2.1. Peróxido de hidrogénio

O peróxido de hidrogénio (PH) é um composto químico com a fórmula H_2O_2 (Figura 3.6). Na sua forma pura é um líquido incolor e ligeiramente mais viscoso do que a água. Por razões de segurança é habitualmente utilizado como uma solução aquosa e é um oxidante forte que é usado como agente de branqueamento e desinfetante. O PH puro, quando aquecido, pode causar graves queimaduras sendo, por isso, muitas vezes utilizada uma solução diluída deste mesmo composto (Service, 2002).

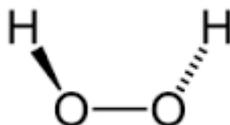


Figura 3.6. Estrutura química do PH.

A ação antimicrobiana do PH não é devida às suas propriedades oxidativas como uma molécula, mas principalmente na produção de outros produtos oxidantes como o radical hidroxilo (OH). Estas espécies reativas de oxigénio causam danos irreversíveis a uma série de componentes celulares, tais como enzimas, constituintes da membrana e de ácido desoxirribonucleico (ADN). O radical hidroxilo tem a maior importância na toxicidade do PH. Quando em contacto com a hélice de ADN, os radicais hidroxilo podem tanto adicionar bases de ADN como retirar átomos de hidrogénio da hélice de ADN. Além disso os radicais hidroxilo também podem danificar membrana celular graças ao aumento da peroxidação lipídica (Schurman, Sumner, & Marcy, 2001).

O PH pode ser utilizado para a esterilização de várias superfícies, incluindo instrumentos cirúrgicos. Este composto tem uma eficácia de largo espectro contra vírus, bactérias, leveduras e esporos bacterianos. De um modo geral, verifica-se uma maior ação contra bactérias gram-

positivas do que contra bactérias gram-negativas, no entanto, a presença de catalase ou outras peroxidases nestes organismos pode aumentar a sua tolerância sendo necessárias concentrações mais elevadas de PH e tempos de contacto mais longos para terem uma função bactericida (Service, 2002).

O PH é visto como uma alternativa ambientalmente segura como agente antimicrobiano em produtos têxteis. Historicamente, o PH sempre foi utilizado para a desinfeção de feridas, por causa do seu baixo custo e disponibilidade imediata, em comparação com outros antissépticos (Assessment, 2005).

No entanto, novos estudos mostram que este composto pode retardar a cicatrização e levar à formação de cicatrizes porque destrói células recém-formadas da pele. A maior desvantagem do uso de PH como agente antimicrobiano em matérias têxteis recai sobre requerer um longo tempo de contacto para ser eficaz contra microorganismos (Drosou, 2003).

3.3.2.2. Ácido peracético

O ácido peracético (PAA) é uma mistura de ácido acético (CH_3COOH) e peróxido de hidrogénio (H_2O_2) em solução aquosa. É um composto químico com a fórmula $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_3$, é um líquido claro, incolor que tem um odor penetrante e é produzido por uma reação entre o peróxido de hidrogénio e ácido acético (Figura 3.7) (Xue-bing, Ting, Yu-jie, & De-hua, 2008).

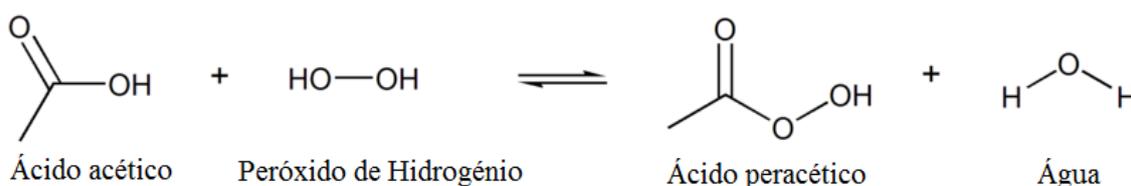


Figura 3.7. Produção de PAA.

Os produtos da degradação de ácido PAA são não-tóxicos e podem facilmente dissolver-se em água. O PAA é um poderoso oxidante e é utilizado principalmente na indústria alimentar em que é aplicado como um produto de limpeza e desinfetante (Guerreiro-Tanomaru, Morgental, Faria-Junior, Berbert, & Tanomaru-Filho, 2011).

Desde 1950, o PAA tem sido aplicado para a remoção de bactérias e fungos em frutas e legumes, sendo também utilizado para a desinfeção de água. Atualmente, o ácido peracético é

aplicado na desinfecção de material médico, de forma a evitar a formação de biofilme, sendo também usado como agente antimicrobiano na indústria têxtil. O PAA é também utilizado em torres de arrefecimento para desinfecção da água evitando a formação de biofilmes (Guerreiro-Tanomaru et al., 2011)

O PAA oxida as membranas celulares sendo eficaz contra uma ampla variedade de microorganismos patogénicos e também vírus e esporos. O PAA é mais eficaz a uma temperatura de 35 °C. A maior desvantagem do uso de PAA como agente antimicrobiano em materiais têxteis recai sobre a irritabilidade que este composto pode causar à pele (Fate, 2010).

3.3.2.3. Outros compostos antimicrobianos

Além dos compostos anteriormente referidos, são comumente utilizados outros compostos antimicrobianos em materiais têxteis funcionais.

Os **compostos quaternários de amónio** (CQA) são compostos são ativos contra um largo espectro de microorganismos, tais como bactérias gram-positivas e gram-negativas, fungos e certos tipos de vírus. No entanto, apresentam uma melhor eficiência sobre as bactérias gram-positivas do que sobre as gram-negativas (Shahidi & Wiener, 2012). A função antimicrobiana depende de interações atrativas entre o grupo amónio dos CQA, carregado positivamente e a parede celular dos microorganismos, carregada negativamente. Estas interações promovem a interrupção de todas as funções essenciais da membrana celular e, assim, a cessação da atividade da bactéria (Wakelyn, 1967).

As **N-haloaminas** são compostos orgânicos heterocíclicos que contêm uma ou duas ligações covalentes que se estabelecem entre o azoto (N) e o grupo halogenado, normalmente o cloro. As N-haloaminas são biocidas eficazes contra um largo espectro de bactérias, fungos e vírus. As suas propriedades antimicrobianas são baseadas na substituição electrofílica do Cl por um átomo de hidrogénio na ligação N-H. Esta reação resulta na transferência de iões Cl^+ que se ligam a regiões aceitadoras dos microorganismos influenciando nos processos enzimáticos e metabólicos dos microorganismos e levando à destruição dos mesmos (Ranganath, 2011). As N-haloaminas podem ser aplicadas a várias superfícies têxteis incluindo celulose, poliamida e fibras de poliéster. Os materiais têxteis contendo N-haloaminas decompõem-se quando expostos

à radiação ultravioleta o que acaba por ser uma grande desvantagem neste tipo de agentes (Fouda, 2011).

O **quitosano** é um polissacarídeo natural derivado da quitina, principalmente extraído da casca de camarões e outros crustáceos marinhos. Quimicamente é designado por poli-(1,4)-2-amido-desoxi-β-D-glucose. Além de apresentar atividade antimicrobiana contra uma variedade de microorganismos, o quitosano tem a vantagem de não ser tóxico, e de ser biocompatível e biodegradável (Mahmoud Abbas, 2010). O quitosano pode ser adicionado aquando da produção das fibras ou como um agente de acabamento para a modificação da superfície, principalmente de fibras de celulose. O quitosano é carregado positivamente e a sua função antimicrobiana resulta da sua natureza policatiónica, que é causada pela protonação dos grupos amino na posição C-2. A sua função antimicrobiana é muito semelhante à dos CQA, uma vez que os grupos amina ligam-se à superfície bacteriana (que é carregada negativamente), resultando na quebra da membrana celular e no aumento da sua permeabilidade. O quitosano pode também interagir com o ADN dos microorganismos, impedindo a síntese proteica (Shahidi & Wiener, 2012).

O **triclosano**, um fenol halogenado, é o biocida mais comumente utilizado e está presente em muitos dos produtos de cuidados de saúde pessoal, detergentes e objetos domésticos, incluindo têxteis e plásticos. O triclosano é muito eficaz contra uma vasta gama de microorganismos, incluindo estirpes de bactérias resistentes a antibióticos. O triclosano atua através de um mecanismo de libertação controlada. Devido ao seu uso generalizado e ao seu mecanismo, a resistência microbiana a este agente antimicrobiano tem aumentado elevando os riscos à saúde pública (Davison & Maillard, 2010). Apesar da sua eficácia como agente antimicrobiano, o uso do triclosano tem sido colocado em causa devido à sua toxicidade e à crescente resistência microbiana a este composto que foi descrita anteriormente. Assim, o uso generalizado de triclosano pode representar um risco potencial para a saúde pública no que diz respeito ao desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos. Desta forma o uso do triclosano como agente antimicrobiano em materiais têxteis tem sido evitado (Yazdankhah, et al., 2006).

A **prata**, de símbolo químico Ag, é um metal importante nos processos de fabrico e em muitos produtos finais diferentes devido às suas propriedades únicas como, por exemplo, o seu efeito antimicrobiano. Uma vez que na sua forma metálica a prata é inerte, são usados sais de prata tais como nitrato de prata (AgNO_3). O mecanismo de acção é feito pela ligação de iões Ag^+ a

grupos tiol, presentes por exemplo em proteínas, que irá induzir a alteração e/ou inibição da síntese proteica e enzimática das células microbianas o que poderá resultar na inativação celular. O íon Ag^+ é também capaz de inibir a divisão celular e destruir a parede celular dos microrganismos bem como afetar os ácidos nucleicos uma vez que a entrada de íons prata na célula e a sua intercalação entre os pares de bases de purina e pirimidina promovem a quebra das ligações de hidrogénio entre as duas cadeias anti-paralelas e causam a desnaturação das moléculas de ADN. Isto irá resultar na incapacidade do ácido ribonucleico (ARN) se replicar (Windler et al., 2013).

3.3.3. Mecanismo de ação

O mecanismo de ação, bem como o espectro de atividade, a durabilidade e a eficácia dos agentes microbianos, deve ser adequado à função a que este se irá destinar. A maior parte dos agentes atua de forma intracelular, afetando proteínas e ácidos nucleicos, inibindo a síntese dos mesmos e impedindo a ação enzimática. Outros agentes antimicrobianos atuam no exterior da célula promovendo a destruição ou reticulação da parede celular ou aumentando a sua permeabilidade, originando a sua rutura (Schindler & Hauser, 2004).

Os compostos antimicrobianos podem ser classificados em dois grandes grupos quanto ao seu mecanismo de ação.

No primeiro tipo de mecanismo de ação, denominado como “*leaching*”, o agente antimicrobiano é libertado na superfície ou no interior da fibra sendo bastante eficiente à superfície do mesmo bem como no ambiente circundante. Ainda assim, como estes compostos saem da superfície da fibra para serem aplicados para o exterior irá originar um consumo significativo do agente diminuindo a eficácia e a durabilidade da sua atividade. Este tipo de ação pode originar mutações dos microrganismos dada a migração para o exterior do composto e a sua interação com vários tipos de micróbios que poderão ganhar resistência a esse mesmo composto. Além disso, existe um risco associado à absorção do composto pela pele que poderá afetar a flora bacteriana que normalmente existe podendo causar algumas irritações ou alergias (Schindler & Hauser, 2004).

O segundo tipo de agentes antimicrobianos consiste em compostos que são quimicamente ligados às superfícies das fibras e fazem o controlo microbiano presente na superfície das fibras, sem haver libertação ou migração do composto para o ambiente circundante, tendo um tipo de atividade não-difusivo. Dada esta ligação química com as fibras os compostos não perdem tão facilmente a sua eficácia, fornecendo um material têxtil que retém a funcionalidade do agente durante quase todo o ciclo de vida. Este tipo de agentes são menos absorvidos pela pele dado que não são libertados para o exterior, não tendo efeitos prejudiciais para o utilizador (Matos, 2014).

3.3.4. Avaliação da atividade antimicrobiana nos materiais têxteis

Os métodos de avaliação da atividade antimicrobiana nos materiais têxteis são uma ferramenta capaz de avaliar a eficácia e a eficiência da aplicação de determinado agente antimicrobiano. Estes podem ser divididos em testes qualitativos e em testes quantitativos.

Este tipo de testes apenas avalia a eficácia antimicrobiana dos têxteis, sendo que antes de serem comercializados estes têm que passar por testes de biocompatibilidade que envolvem três ensaios distintos: citotoxicidade, sensibilização e irritação.

3.3.4.1. Testes qualitativos

Os testes de difusão em agar são, normalmente, um tipo de ensaio preliminar para detetar a presença do acabamento antimicrobiano. Este tipo de testes estão descritos nas seguintes normas: Associação Americana de Químicos Têxteis e Coloristas (AATCC - *American Association of Textile Chemists and Colorists*) 147-2004, Normas industriais japonesas (JIS - *Japanese Industrial Standards*) L 1902-2002 e Norma Suiça (SN - *Swiss Norm*) 195920-1992. Nestas normas é recomendado o uso das estirpes *K. pneumoniae* e *S. aureus*. Apesar de serem apenas qualitativos, a sua simplicidade de execução é bastante adequada para um grande número de amostras sobre as quais se quer verificar a presença ou não de atividade antimicrobiana. Nestes testes, as células bacterianas são inoculadas em meio sólido sobre o qual as amostras têxteis são colocadas em contacto. A ausência de crescimento à volta e debaixo da amostra de tecido indica a presença de atividade antimicrobiana. Se não se verificar a formação de uma zona de inibição (halo), é possível também concluir que o agente antimicrobiano está firmemente ligado

ao tecido e daí impedir a sua difusão no agar. Caso ocorra difusão do agente antimicrobiano no agar, formar-se-á uma zona de inibição (Figura 3.8) em que o tamanho da mesma fornece uma indicação da atividade antimicrobiana, ou da taxa de libertação do agente (Pinho, Magalhães, Henriques, & Oliveira, 2011).

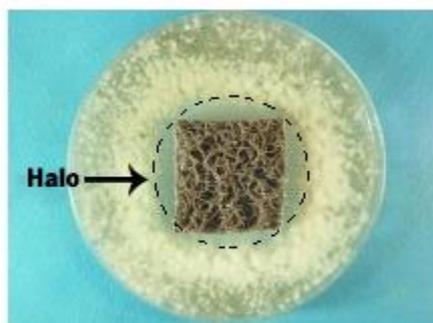


Figura 3.8. Tecido com atividade antimicrobiana visível de acordo com a Norma JIS I 1902:2002 (Silver, 2009).

3.3.4.2. Testes quantitativos

Este tipo de testes podem ser executados seguindo as normas: AATCC 100-2004, JIS L 1902;2002 e SN 195924-1992. Nas normas referidas é recomendado o uso das estirpes *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*. Estes métodos fornecem valores quantitativos sobre o acabamento antimicrobiano, mas ao contrário dos testes qualitativos a sua execução é mais demorada. Normalmente este tipo de testes implica que um pequeno volume de inóculo seja totalmente absorvido pelas amostras de tecido, sem deixar qualquer líquido livre, o que irá assegurar um contacto total entre o tecido e as bactérias. Depois de incubar os tecidos, o número total de células viáveis é determinado. A atividade antimicrobiana é expressa em termos de percentagem de redução e inibição dependendo da norma utilizada. Estes ensaios de suspensão são sempre realizados em condições artificiais que promovem o crescimento. Os resultados produzidos por vezes resultam em taxas de redução acima dos 99 % o que indica uma forte impressão da eficácia antimicrobiana. No entanto, durante o uso normal de um têxtil com o agente antimicrobiano não se costuma verificar esse resultado. Para uma melhor simulação de vida real, a norma JIS L 1902:2002 utiliza células bacterianas suspensas em meio fortemente diluído para limitar os níveis de nutrientes (Pinho et al., 2011).

3.4. Técnicas de caracterização físico-química dos materiais têxteis funcionais

Os materiais têxteis são concebidos para ter uma estrutura que confira ao produto final propriedades características para uma ampla gama de aplicações. Após a aplicação de um agente antimicrobiano, é de grande importância compreender como se relaciona com as propriedades do produto têxtil a nível químico. Para além das possíveis diferenças estruturais no têxtil com o acabamento antimicrobiano é necessário ter conhecimento de qual a concentração do agente antimicrobiano presente no têxtil assim como a caracterização de outros componentes que possam estar no tecido como, por exemplo, nanopartículas.

3.4.1 Espetroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR - *Fourier transform infrared spectroscopy*) é uma técnica que é utilizada para obter um espectro de infravermelho de um sólido, líquido ou gás. Um espectrómetro FTIR recolhe simultaneamente dados espectrais de alta resolução através de um espectro de vasta gama o que confere uma vantagem significativa sobre um espectrómetro de dispersão que mede a intensidade ao longo de uma estreita faixa de comprimentos de onda de cada vez (Shaikh & Agrawal, 2014). A energia infravermelha é emitida a partir de uma fonte de corpo negro brilhante. Este feixe passa através de uma abertura que controla a quantidade de energia apresentada à amostra. O feixe entra no interferómetro onde tem lugar a "codificação espectral". Para fins de identificação qualitativos, o espectro é comumente apresentado como transmitância versus número de onda (Figura 3.9)

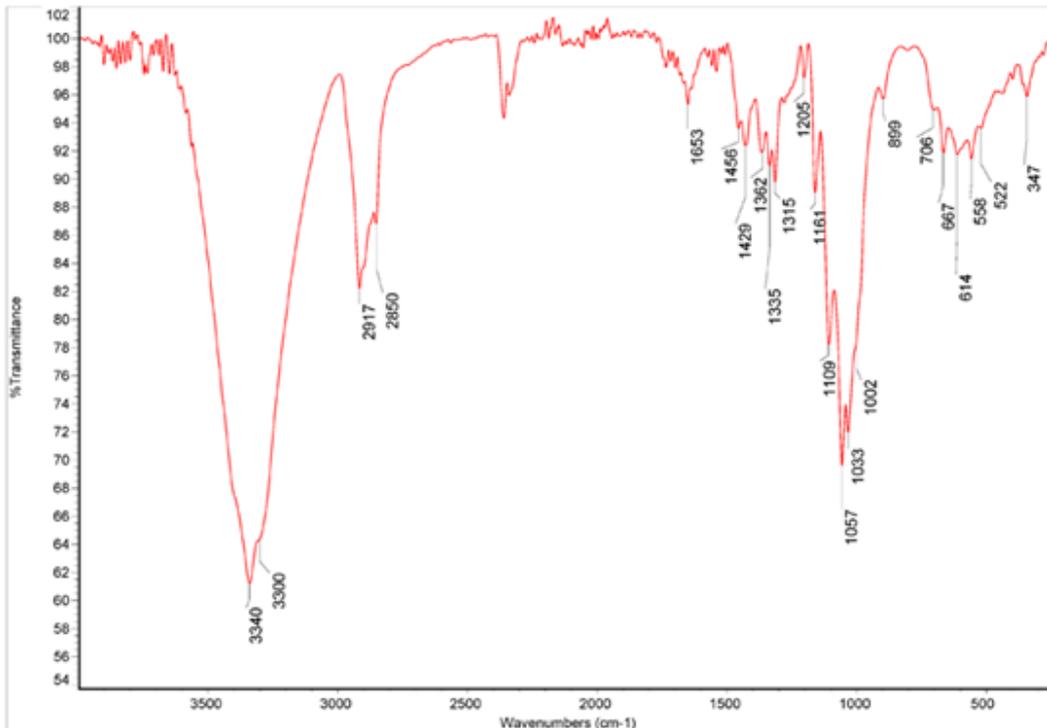


Figura 3.9. Espectro característico do algodão obtido por FTIR (Chemistry, 2015).

Cada grupo funcional tem a sua vibração característica fundamental que dá origem a absorção em certas gamas de frequência do espectro. No entanto, vários grupos funcionais podem absorver na mesma gama de frequência, e um grupo funcional pode ter picos de absorção característicos múltiplos (figura 3.10) (Bykov, 2008).

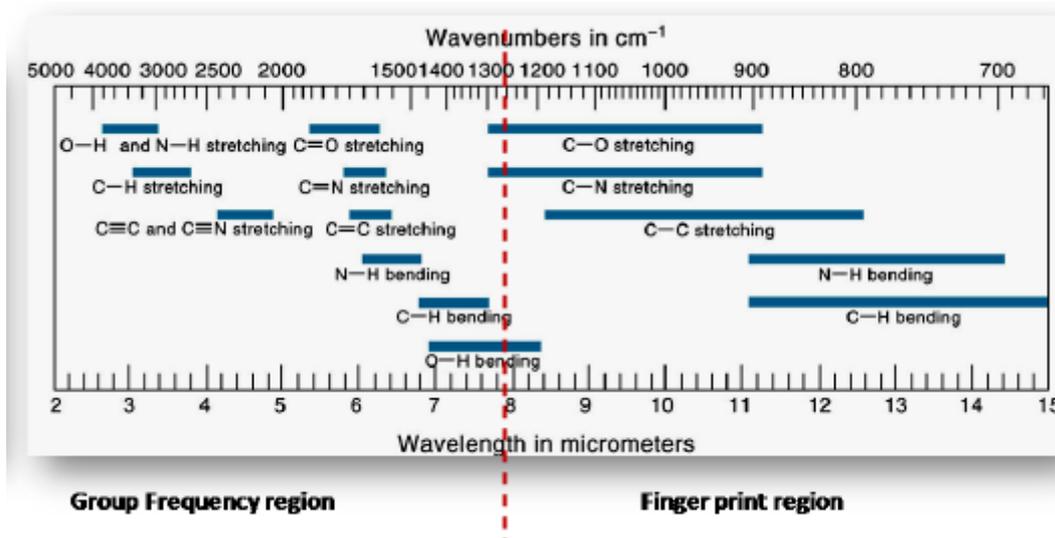


Figura 3.10. Grupos funcionais e a sua relação com as regiões de absorção de infravermelho (Shaikh & Agrawal, 2014).

Devido à gama de produtos químicos, fibras diferentes exibem uma variedade de comportamentos químicos e físicos onde a leitura da absorvância entre 600 cm^{-1} e 4000 cm^{-1} constitui o espectro de infravermelho para aquela molécula. Uma vez que cada molécula tem um arranjo único de átomos ligados, cada molécula absorve um diferente conjunto de frequências infravermelhas resultando como uma impressão digital molecular. Assim, o conhecimento da composição química dos vários materiais têxteis com e sem funcionalização pode ser facilmente distinguida com FTIR (Shaikh & Agrawal, 2014).

3.4.2. Microscopia eletrónica de transmissão

A microscopia eletrónica de transmissão (TEM – *Transmission electron microscopy*) é uma técnica de microscopia na qual um feixe de eletrões é transmitido através de uma amostra. No entanto, o seu princípio é semelhante ao do microscópio ótico. Para uma quantidade observável de eletrões passar através da amostra, a preparação da mesma deve ser bastante complexa de maneira a ficar muito fina e ser possível a sua leitura. A imagem é formada a partir da interação do feixe de eletrões com a amostra através das lentes do condensador. Os eletrões defletidos e não defletidos são focados pela lente objetiva que dão origem a uma imagem intermédia. A imagem é depois ampliada e focada por um dispositivo de imagem que permite captar imagens com uma resolução significativamente mais elevada do que microscópios óticos. Isso permite que se consiga examinar detalhes como por exemplo uma simples coluna de átomos, que é milhares de vezes menor do que o menor objeto visível num microscópio de luz (Joshi, Bhattacharyya, & Ali, 2008).

O TEM constitui um método importante de análise numa grande variedade de campos científicos, sendo uma ferramenta de caracterização vital para gerar imagens diretas de estruturas, tais como nanopartículas, uma vez que permite uma análise da distribuição de tamanho, bem como da morfologia. O TEM é amplamente utilizado na indústria têxtil uma vez que revela a distribuição e dispersão de nanopartículas em fibras têxteis (Joshi et al., 2008).

3.4.3. Microscopia eletrônica de varrimento

O microscópio eletrônico de varrimento (SEM - *Scanning electron microscope*) é um tipo de microscópio eletrônico que produz imagens de uma amostra (Figura 3.11), usando um feixe focalizado de elétrons. A técnica baseia-se no varrimento de uma amostra com um feixe de elétrons focado (Hafner & Hafner, 2007).

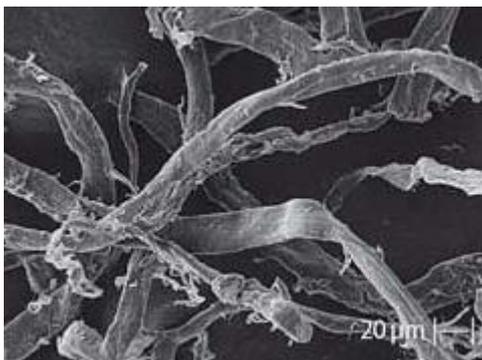


Figura 3.11. Imagem de fibras de algodão obtida por SEM (Silva, et al., 2015).

O SEM pode produzir muitas imagens de alta resolução, revelando pormenores de cerca de 1 nm a 5 nm de tamanho, no seu modo de detecção primário, ou seja, imagens de elétrons secundários (Schneider, 2008).

A maioria das fibras têxteis, naturais e sintéticas, são polímeros orgânicos que têm alguma estrutura morfológica característica com particularidades facilmente detetáveis. No caso das fibras naturais tais como algodão e lã, esta estrutura é geneticamente determinada e pode ser influenciada pelas várias condições de crescimento enquanto as fibras sintéticas são projetadas e desenvolvidas para uma estrutura pré-determinada. Estas características estruturais especiais podem ser utilizadas para a identificação de fibra, para a previsão das características da fibra, ou para a determinação de alterações que ocorreram na fibra devido a uma reação química ou acabamento, ou de danos provocados por insetos, fungos, calor, desgaste, ou reações químicas. O estudo por SEM destas variações pode fornecer informações úteis sobre a estrutura da superfície. A estrutura da superfície de nanofibras, nanopartículas e nanocápsulas pode também ser visualizadas através de SEM com grande clareza como imagens de alta resolução e é o processo mais adequado para estudar materiais têxteis funcionalizados com nanopartículas (Joshi et al., 2008).

3.4.4. Dispersão de luz dinâmica

A dispersão de luz dinâmica (DLS - *Dynamic light scattering*) é uma técnica que pode ser utilizada para determinar o perfil da distribuição de tamanho de pequenas partículas em suspensão ou polímeros em solução. Pode também ser utilizada para investigar o comportamento de fluidos complexos, tais como soluções concentradas de polímeros (Melro, 2011).

DLS é um método não invasivo frequentemente usado para medir o tamanho de moléculas e partículas tipicamente na região dos submicron (Joshi et al., 2008). Esta técnica baseia-se na medição da intensidade da luz dispersa pelas moléculas na amostra em função do tempo. Ao medir a flutuação da intensidade da luz dispersa causada pelo movimento das partículas (movimento Browniano) é possível obter a distribuição do diâmetro hidrodinâmico das mesmas, podendo fornecer informações sobre o tamanho médio, distribuição de tamanho, polidispersibilidade de moléculas e partículas em solução através desvio da luz dispersa para um detetor que converte as intensidades médias (Martins, 2011).

As nanopartículas de prata, titânio, sílica e óxido de zinco são muitas vezes utilizadas em materiais têxteis para se melhorar a funcionalidade desses mesmos têxteis. As nanopartículas de sílica, por exemplo, podem ser estudadas usando a técnica de DLS. As nanopartículas têm tendência a aglomerar e, portanto, para obter o seu tamanho por DLS deve ser feita uma preparação de maneira a analisar a sua estabilidade e a promover a sua dispersão de modo a conseguir medir o tamanho de cada uma, de maneira a fazer o seu estudo antes de aplicar aos materiais têxteis (Sartor, 2003).

3.4.5. Potencial zeta

A análise do potencial zeta é uma técnica para determinar a carga superficial das nanopartículas em solução. As nanopartículas têm uma carga superficial que atrai uma fina camada de iões de carga oposta à da superfície da nanopartícula. Esta dupla camada de iões viaja com a nanopartícula uma vez que se difunde ao longo da solução. O potencial eléctrico no limite da camada dupla é conhecido como o potencial zeta das nanopartículas e tem valores que variam tipicamente desde -100 mV a 100 mV (Bedê, 2010).

A magnitude do potencial zeta está intrinsecamente ligada com a estabilidade das nanopartículas sendo uma análise muito usada em estudos de estabilidade e adsorção. Para valores de potencial zeta maiores que 25 mV ou inferiores a -25 mV as nanopartículas têm, normalmente, um alto grau de estabilidade. Isto pode ser explicado pelo aumento das interações repulsivas à medida que o potencial zeta aumenta que conduzirá à formação de partículas mais estáveis evitando a formação de agregados (Martins, 2011).

Para a medição do potencial zeta ainda não existe nenhuma técnica totalmente eficaz, no entanto, este valor pode ser determinado por espalhamento de luz eletroforético (ELS - *Electrophoretic light scattering*). Nesta técnica é feita a medição da mobilidade eletroforética e é calculado de seguida o potencial zeta (Weiner, Tscharnuter, & Fairhurst, 1993).

CAPÍTULO 4. METODOLOGIA

4.1. Funcionalização dos materiais têxteis

Para a produção dos materiais têxteis funcionais utilizou-se como base de todos os ensaios um tecido 100 % algodão branqueado. As nanopartículas utilizadas ao longo do trabalho foram nanopartículas de sílica já funcionalizadas com os diferentes agentes antimicrobianas pela empresa.

A funcionalização antimicrobiana dos materiais têxteis (de algodão) foi realizada através de duas técnicas diferentes utilizadas em acabamentos têxteis: esgotamento e *pad-batch* (ou impregnação).

Numa primeira fase, foram testadas quatro amostras diferentes (Tabela 4.1). Em todas as amostras preparam-se os banhos necessários contendo 40 g/L de agente ligante fornecido pela empresa, 5 g/L de Prote-pon KB e 5 g/L de Luprintol PE e 40 g/L de nanopartículas de sílica (cuja concentração de agente ativo no banho final equivale à representada na Tabela 4.1.) tendo-se perfeito o volume de 150 mL dos banhos com água destilada. O composto Prote-pon KB (álcool primário etoxilado) e o composto Luprintol PE (tensoactivo não-iónico) foram usados como agentes auxiliares no processo de acabamento de maneira a acelerar a molhagem, melhorar a compatibilidade com os produtos e eliminar as sujidades de toda a natureza. Estes banhos foram preparados de modo semelhante para ambos os métodos de acabamento a serem analisados.

Os agentes ativos presentes em cada amostra, bem como a sua concentração, encontram-se na Tabela 4.1. O banho utilizado para a preparação do controlo negativo 1 continha os compostos Prote-pon KB, Luprintol PE, agente ligante e água destilada nas mesmas concentrações/quantidades descritas anteriormente. Para a preparação do controlo negativo 2 utilizou-se um banho contendo água destilada e nanopartículas de sílica sem qualquer agente antimicrobiano.

Tabela 4.1. Composição dos banhos para as diferentes amostras

Amostras	Funcionalização	Concentração do agente ativo no banho final (g/L)
NPPH1	Nanopartículas funcionalizadas com peróxido	2
NPPH2	de hidrogénio (PH)	3
NPPA1	Nanopartículas funcionalizadas com ácido	2
NPPA2	peracético (PAA)	3

Na primeira fase, as amostras preparadas por esgotamento (Mathis CH-8156) foram colocadas em contacto com os diferentes banhos (Tabela 4.1) com uma razão de banho (R. B.) de 1:10 (Peso do material (Kg):Volume do banho (L)) a pH 5. As amostras estiveram em contacto com as diferentes soluções durante 90 min a 40 °C e a uma frequência de rotação de 40 min⁻¹.

No processo por *pad-batch* os materiais têxteis foram impregnados nas diferentes soluções descritas na Tabela 4.1 a pH 5 e à temperatura ambiente. O processo foi realizado num equipamento Mathis HVF-57401 a uma pressão de 4 bar com uma velocidade de 1 m/s tendo-se feito passar o substrato têxtil apenas uma vez pelo rolo de impregnação. A taxa de expressão utilizada foi de 80 %.

No final de ambos os métodos os materiais têxteis foram secos na máquina de secar INDESIT IS31V durante 30 min.

Após os resultados obtidos da avaliação antimicrobiana e da quantificação do agente antimicrobiana dos materiais têxteis funcionalizados preparados numa primeira fase tornou-se necessário a preparação de novas amostras com uma maior concentração de agente antimicrobiano. Nestas novas amostras apenas foi utilizado o PH como agente antimicrobiano, uma vez que houve dificuldades em quantificar o PAA.

Assim, numa segunda fase, foi testada a amostra NPPH3 tendo sido também adicionado um controlo positivo (Tabela 4.2). Para ambas as amostras houve um aumento (indiscriminado) da concentração do agente antimicrobiano (PH). Os banhos necessários continham 40 g/L de agente ligante fornecido pela empresa, 5 g/L de Prote-pon KB, 5 g/L de Luprintol PE e 40 g/L

de nanopartículas (cuja concentração de agente ativo no banho final equivale à representada na Tabela 4.2.) para ambos os métodos, tendo-se perfeito o volume de 150 mL dos banhos com água destilada. O controlo positivo continha o agente antimicrobiano (PH) diretamente presente no banho cuja concentração se encontra na Tabela 4.2. Neste conjunto de amostras, o controlo negativo usado para avaliação da atividade antimicrobiana foi algodão cru que se trata de algodão onde não foi realizado o processo de branqueamento tendo-se apenas utilizado o controlo negativo 1 para comparação por FTIR.

Tabela 4.2. Composição dos banhos para as diferentes amostras após aumento da concentração de PH

Amostras	Funcionalização	Concentração de PH no banho final (g/L)
Controlo positivo	PH	37.5
NPPH3	Nanopartículas funcionalizadas com PH	37.5

Nesta fase as amostras preparadas na aplicação por esgotamento (Mathis CH-8156) foram realizadas nas mesmas condições descritas anteriormente.

No processo por *pad-batch* os materiais têxteis foram impregnados nas diferentes soluções descritas na Tabela 4.2 a pH 5 e à temperatura ambiente. O processo foi realizado num equipamento Mathis HVF-57401 mas, ao contrário das condições descritas para as amostras preparadas na primeira fase, o processo foi realizado a uma pressão de 2 bar com uma velocidade de 3 m/s e uma taxa de expressão de 95 %, tendo-se feito passar o substrato têxtil duas vezes pelo rolo de impregnação.

No final de ambos os métodos os materiais têxteis foram secos nas mesmas condições referidas anteriormente.

4.2. Caracterização físico-química

As propriedades de cada têxtil funcionalizado, bem como das nanopartículas utilizadas, foram estudadas por utilização de diferentes técnicas com o objetivo de caracterizar o tamanho, a

superfície, a forma e a polidispersão das nanopartículas bem como a caracterização química e a quantificação do princípio ativo no caso dos têxteis funcionalizados.

4.2.1. Caracterização do tamanho e estabilidade das nanopartículas

4.2.1.1. TEM

Para efetuar a microscopia eletrónica de transmissão (TEM) foi necessário revestir-se a amostra das nanopartículas com carbono (material condutor) para evitar acumulação de carga na superfície da amostra. Para tal, as amostras foram preparadas por deposição de uma gota de solução de partículas numa grelha de cobre e revestidas com carbono, deixando-se secar. Depois de preparadas, colocaram-se as amostras no suporte do equipamento Nova NanoSEM 200 (Figura 4.1) e analisou-se o tamanho das nanopartículas.



Figura 4.1. NanoSEM – FEI Nova 200 (FEG/SEM).

4.2.1.2. DLS/Potencial zeta

Esta técnica foi utilizada com a finalidade de efectuar a medição do tamanho e o potencial zeta (ζ) das nanopartículas. A preparação da amostra foi realizada contendo 0,1 % das nanopartículas utilizadas e 1 % de albumina de soro bovino (BSA – *bovine serum albumin*) num volume de 25 mL de água ultra-pura tendo sido sonicada durante 20 min num suporte com gelo a uma amplitude de 30 % com recurso ao equipamento Ultrasonic Processor da Cole-Parmer. Estas medições foram efetuadas com recurso ao equipamento Zetasizer Nano ZS.

4.2.2. Caracterização dos materiais têxteis funcionais

4.2.2.1. FTIR

Esta técnica foi utilizada para analisar os grupos funcionais na superfície, antes e depois do acabamento. Para a preparação da amostra para a análise por FTIR, fragmentaram-se os materiais têxteis com o auxílio de um moinho. Com o produto obtido nesse processo adicionou-se KBr, bem seco, sendo a mistura depois prensada. Como resultado da prensagem obteve-se uma pastilha, necessária para a análise por FTIR, composta pela mistura descrita anteriormente. As medições por FTIR foram realizadas à temperatura ambiente num dispositivo FT-IR IRAffinity-1S, por transmitância, com uma largura de banda entre 400 cm^{-1} e 4000 cm^{-1} . A resolução utilizada foi de 8 cm^{-1} e 60 varrimentos tendo-se obtido o espectro com o *software* LabSolutions IR. Para avaliação dos materiais têxteis, no modo de reflectância total atenuada (ATR - *Attenuated Total Reflectance*), colocou-se a amostra de cada substrato têxtil no suporte do equipamento utilizando-se uma largura da banda entre 400 cm^{-1} e 4000 cm^{-1} . A resolução utilizada foi de 4 cm^{-1} , tendo-se efectuado 60 varrimentos, e tendo-se obtido o espectro com o *software* LabSolutions IR.

4.2.2.2. SEM

Esta técnica foi utilizada com a finalidade de analisar a morfologia das amostras. A preparação da amostra foi a mesma que a realizada para a caracterização das nanopartículas por TEM. As amostras foram colocadas numa grelha de cobre e revestidas com carbono, deixando-se secar. Depois de preparadas, colocaram-se as amostras no suporte do equipamento Nova NanoSEM 200 e analisou-se a sua morfologia.

4.3. Quantificação do princípio ativo

4.3.1. Titulação do meio líquido por iodometria

4.3.1.1. Quantificação do peróxido de hidrogénio

Para quantificação do peróxido de hidrogénio presente nos banhos iniciais e nos banhos finais, realizou-se uma titulação por iodometria do meio líquido. A quantificação de PH no banho final só foi possível realizar para os materiais têxteis funcionalizados cujo acabamento antimicrobiano foi efetuado por esgotamento, uma vez que, por este processo, ao contrário do processo por *pad-batch*, é possível reaproveitar o banho final após o mesmo. Para a realização desta técnica, foi utilizado um protocolo adaptado, tendo sido feita inicialmente a pesagem de 10 mL do banho a quantificar. De seguida adicionou-se aos 10mL de banho, 50 mL de água destilada, 10 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) e 10 mL de iodeto de potássio (KI), bem como uma gota de molibdato de amónio (catalisador). Após a junção das soluções descritas fez-se a titulação da amostra com tiosulfato de sódio ($Na_2S_2O_3$), registando-se o volume necessário até se verificar uma mudança de cor da amostra de amarelo acastanhado para incolor (Kingzett, 1880; Kolthoff, 1920). A concentração de PH, em mg/L, foi feita de acordo com a equação 1, onde A representa o volume medido inicialmente de $Na_2S_2O_3$ e B o volume final de $Na_2S_2O_3$ após a titulação. O valor da normalidade do $Na_2S_2O_3$ foi de 0.1 e a pesagem da amostra (do banho inicial de 10 mL) foi feita em gramas.

$$\text{Concentração de PH} = \frac{(A - B) \times \text{Normalidade do } Na_2S_2O_3 \times 1.7}{\text{Peso da amostra}} \times 10000 \quad (1)$$

Após a quantificação de PH no banho inicial e no banho final, para as amostras preparadas por esgotamento, considerou-se que a concentração de PH retida no material têxtil funcional seria a diferença entre os mesmos. Assim, o cálculo da concentração de PH, em mg/L, no material têxtil foi feito de acordo com a equação 2.

$$\text{Concentração de PH no material têxtil funcional} = \text{Concentração de PH no banho inicial} - \text{Concentração de PH no banho final} \quad (2)$$

4.3.1.2. Quantificação do ácido peracético

A quantificação do ácido peracético presente nos banhos finais, tal como na quantificação do PH, só foi possível quantificar o PAA no banho final para os materiais têxteis funcionalizados preparados por esgotamento. A realização desta técnica foi feita utilizando um *kit* da empresa *LaMotte* tendo-se seguido o protocolo presente no mesmo. Inicialmente foi feita a pesagem de 10 mL do banho a quantificar. Após a pesagem, foram adicionados aos 10 mL de banho, 10 gotas de H_2SO_4 , 1 gota de indicador de ferroína e 1 gota de KI (a 20 %). Após a adição destes compostos, verificando-se uma mudança de cor do banho de incolor para castanho, adicionaram-se gotas de titulante de PAA até se verificar a alteração da cor do banho para laranja/cor-de-rosa. A concentração de PAA, em mg/L, foi feita multiplicando-se por 15 o número de gotas utilizado do titulante de PAA (LaMotte, 2015).

Este tipo de técnica não se revelou eficaz para o cálculo da concentração de de PAA uma vez que o *kit* utilizado não se enquadrava na gama de concentrações de PAA que foram utilizadas nos materiais têxteis funcionais.

4.3.2. Titulação do material têxtil por iodometria

A quantificação do agente ativo (peróxido de hidrogénio) no substrato têxtil funcionalizado realizou-se adicionando num gobelé 10 mL de H_2SO_4 e 100 mL de água destilada a 5 mg do tecido a analisar. Após 10 min colocaram-se 10 mL de KI, no mesmo gobelé, mantendo-o durante 20 min num local escuro. No fim desse tempo adicionou-se uma gota de molibdato de amónio e titulou-se a amostra com tiosulfato de sódio registando o volume necessário para ocorrer a mesma mudança de cor descrita anteriormente (Kingzett, 1880; Kolthoff, 1920). O cálculo da concentração de PH, em mg/L, foi feito de acordo com a equação 1 descrita anteriormente. Neste caso o peso da amostra, em gramas, foi o do material têxtil.

4.4. Avaliação da atividade antimicrobiana

Este trabalho teve como objetivo a avaliação da atividade antimicrobiana de dois diferentes agentes antimicrobianos distintos: PH e PAA. A avaliação da atividade antimicrobiana dos materiais têxteis utilizados foi realizada de acordo com a norma JIS L 1902:2008.

4.4.1. Microorganismos e condições de crescimento

Ao longo deste trabalho, foram utilizadas duas estirpes provenientes da coleção americana, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 11296 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Estas estirpes foram selecionadas de acordo com a norma acima referida.

As culturas bacterianas foram crescidas em meio triptona de soja (TSB - *Tryptic Soy Broth*) (Anexo A1), inoculando o meio com uma única colónia de cada estirpe e incubando 18 h a 37 °C e frequência de rotação de 120 min⁻¹. Esse inóculo foi usado nos ensaios subsequentes. A composição de todos os meios e soluções usados ao longo deste trabalho encontra-se no Anexo A.

Todos os ensaios biológicos foram realizados sob condições assépticas, utilizando material estéril em câmaras de fluxo laminar.

4.4.2. Determinação das curvas de calibração

De modo a ser possível correlacionar a densidade ótica (DO) com o número de unidades formadoras de colónias (UFC) procedeu-se à construção de uma curva de calibração para cada bactéria em estudo. Para tal, inocularam-se as bactérias tal como é explicado na secção anterior. Procedeu-se então a diversas diluições do inóculo em TSB. Mediu-se a DO das diluições a 660 nm e garantiu-se que esta estava sempre entre 0.1 e 1. Para cada diluição do inóculo determinou-se o número de UFC fazendo diluições de 1:10 em Tampão fosfato-salino (PBS - *Phosphate-Buffered Saline*) 1X (Anexo A6). Estas colónias foram plaqueadas em agar triptona de soja (TSA - *Tryptic Soy Agar*) (1,5 %) (Anexo A2) e incubaram-se as placas durante 18 h a 24 h, a 37 °C, no caso da bactéria *Staphylococcus aureus* e após esse tempo procedeu-se à contagem de colónias em placa. Para a bactéria *Klebsiella pneumoniae*, incubaram-se as placas a 37 °C, no entanto, o seu crescimento foi acompanhado ao longo do tempo de incubação até ser possível essa mesma contagem. Com os valores de DO registados para cada diluição e o n° de células por mL correspondentes a cada DO traçou-se a curva de calibração (Anexo B).

4.4.3. Determinação das CMI e CMB

De forma a conhecer a concentração dos agentes antimicrobianos a utilizar nos materiais têxteis funcionalizados foi necessário determinar as CMI's e CMB's dos agentes antimicrobianos referidos anteriormente (peróxido de hidrogénio e ácido peracético) para as bactérias em estudo. Para tal, prepararam-se soluções *stock* dos agentes antimicrobianos e utilizando essas soluções realizou-se, em placas de 96 poços, diluições de 1:2 em meio Mueller-Hinton (MHB - *Mueller-Hinton Broth*) (Anexo A3). Com este processo, testaram-se várias concentrações dos agentes antimicrobianos numa gama entre 0.6 mg/L e 39550 mg/L. Com auxílio das curvas de calibração, acertou-se a DO do inóculo de modo a que a concentração celular fosse aproximadamente 1×10^8 mL⁻¹. A solução anterior foi diluída de 1:100 em meio MHB, misturando-se bem a amostra. Adicionou-se o inóculo nas placas com os agentes antimicrobianos a testar e incubou-se 24 h a 37 °C. Após o tempo de incubação, determinou-se a CMI analisando-se a turbidez dos diferentes poços. Para este ensaio foram feitos 2 controlos: controlo positivo (inóculo + meio) e controlo negativo (meio). Para determinação da CMB utilizaram-se as duas concentrações acima e as duas concentrações abaixo da CMI determinadas em cada ensaio. Após se transferir o volume necessário de cada poço respondente a uma dessas concentrações utilizadas efectuaram-se sucessivas diluições usando a solução de soro fisiológico (Anexo A4) de maneira a ser possível determinar as UFC em TSA (1,5 %). De seguida incubaram-se as placas a 37 °C durante 18 h a 24 h para *S. aureus* e aproximadamente 18 h para *K. pneumoniae* e após análise das placas determinou-se a CMB (Wiegand, et al., 2008). A CMB foi determinada após se verificar a partir de qual concentração se obteve uma taxa de redução bacteriana de 99,9 %. A taxa de redução foi determinada de acordo com a equação 3, onde R representa a taxa de redução em percentagem, C o número de células imediatamente após a inoculação e D o número de células após o tempo de incubação desejado.

$$R = 100 \times \frac{(C - D)}{C} \quad (3)$$

4.4.4. Determinação da eficácia e atividade antibacteriana de materiais têxteis

A avaliação da eficácia antibacteriana dos diferentes materiais têxteis ao longo deste trabalho foi baseada na norma JIS L 1902:2008. Este método foi concebido para testar a atividade antimicrobiana dos materiais têxteis tratados com agentes antimicrobianos.

4.4.4.1 Método qualitativo

Para a realização do método qualitativo (método do halo) de acordo com a norma JIS L 1902:2008 fez-se a preparação das amostras cortando-se os materiais têxteis com 2.8 cm x 2.8 cm. Seguidamente preparou-se, em meio TSB, um inóculo com uma concentração celular de cerca de 5×10^8 mL⁻¹. Adicionou-se, em TSA (1,5 %) a aproximadamente 45 °C, o inóculo preparado anteriormente, e colocou-se 16 mL da suspensão em cada placa de petri. Depois da preparação das placas, colocaram-se no centro da placa, com o auxílio de uma pinça, as amostras de cada substrato têxtil em contacto com o meio, incubando as placas 18 h a 24 h a 37 °C. Após o tempo de incubação registou-se fotograficamente a presença ou ausência de atividade microbiana pela análise da zona (halo de inibição) à volta e por baixo de cada amostra.

4.4.4.2. Método quantitativo

Para a execução do método quantitativo (método de absorção) segundo a norma JIS L 1902:2008 foi feita a preparação das amostras pesando-se 0,4 g de cada substrato têxtil. As amostras de controlo foram analisadas logo às 0 h e às 24 h, as amostras funcionalizadas analisadas apenas às 24 h. Para preparação do inóculo acertou-se a DO de modo a que a concentração de células fosse entre 1×10^8 mL⁻¹ a 3×10^8 mL⁻¹. De seguida adicionou-se 0,4 mL desse inóculo a 20 mL de TSB deixando-se incubar o mesmo durante $3 \text{ h} \pm 1 \text{ h}$ a 37 °C e frequência de rotação de 120 min⁻¹. Após incubação a DO foi acertada diluindo o inóculo em meio TSB 20x diluído em água destilada de modo a obter-se uma concentração celular de aproximadamente 1×10^8 mL⁻¹ a 3×10^8 mL⁻¹. De seguida, inoculou-se 0,2 mL do inóculo em vários pontos da amostra e incubou-se durante $18 \text{ h a } 24 \text{ h} \pm 1 \text{ h}$, a 37 °C. Para as amostras analisadas no tempo 0 h adicionou-se a cada amostra 20 mL da solução *Physiological saline for shake out* (Anexo A5), à temperatura ambiente, e vortexou-se durante 5 s e cinco vezes enquanto para as outras amostras, após o período de incubação, adicionou-se o mesmo volume dessa

mesma solução mas a uma temperatura de aproximadamente 4 °C. No final realizou-se a quantificação das UFC (Association, 2008). Após a quantificação das UFC calculou-se a taxa de redução de acordo com a equação 3 descrita anteriormente.

4.4.5. Determinação da eficácia e atividade antibacteriana dos compostos Luprintol PE e Prote-pon KB

Para a determinação de eficácia e atividade antibacteriana dos compostos Luprintol PE e Prote-pon KB, preparou-se, em meio TSB, um inóculo com uma concentração celular de cerca de 5×10^6 mL⁻¹. Adicionou-se, em TSA (1,5 %) a aproximadamente 45 °C, o inóculo preparado anteriormente, e colocou-se 16 mL da suspensão em cada placa de petri. Depois da preparação das placas, colocaram-se, com o auxílio de uma pinça, os discos de papel de filtro com aproximadamente 5 mm de diâmetro esterilizados que foram embebidos no produto a analisar e aplicados na placa com o inóculo. Em cada placa colocaram-se três discos relativamente equidistantes entre si contendo o mesmo produto. As placas foram incubadas a 18 h a 24 h a 37 °C e após o tempo de incubação registou-se fotograficamente a presença ou ausência de atividade microbiana pela análise da zona (halo de inibição) à volta e por baixo de cada disco (Vital, Reis, García-Zapata, & Cunha, 2004).

4.5. Avaliação da durabilidade da atividade antimicrobiana dos materiais têxteis funcionais

Para a avaliação da durabilidade da atividade antimicrobiana das amostras funcionalizadas utilizaram-se ensaios de lavagem de acordo com a norma ISO105:C06 A2S.

Os ensaios de lavagem foram realizados num dispositivo mecânico apropriado de acordo com a norma, contendo um eixo giratório que suportou, radialmente, recipientes de aço inoxidável fechados hermeticamente com cada amostra. O movimento de rotação do conjunto formado pelo eixo e pelos recipientes teve a frequência de 40 min⁻¹. Os recipientes de aço, além de cada amostra dos materiais têxteis, continham um volume de banho de água de 150 mL, 1 g/L de perborato de sódio e 4 g/L de detergente AATCC - sem branqueador ótico (WOB - *without optical brightener*). Além disso, foram usadas 10 esferas de aço inoxidável de 6 mm de diâmetro de

maneira a simular o desgaste dos tecidos que acontece na realidade. Cada lavagem foi realizada durante 30 min a 40 °C. Neste trabalho foram executadas 20 lavagens a cada amostra preparando-se novos banhos de lavagem, com os compostos anteriormente referidos, no final de cada lavagem.

De maneira a avaliar a perda do princípio ativo a cada lavagem por parte dos materiais têxteis funcionais foi realizada a quantificação do princípio ativo no final da 5^a, 10^a, 15^a e 20^a lavagem. A quantificação do princípio ativo foi feita procedendo-se à quantificação do banho que se obteve no final das lavagens referidas. Essa quantificação foi realizada como descrita em 4.3.1.1. tendo-se calculado a concentração do princípio ativo de acordo com a equação 1 descrita nesse capítulo. A quantificação do princípio ativo no material têxtil, descrita em 4.3.2., foi feita no final da 20^a lavagem. A avaliação da atividade antimicrobiana das amostras funcionalizadas após a lavagem foi feita de acordo com a norma JIS L 1902:2008 descrita anteriormente em 4.4.4.

CAPÍTULO 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Determinação das CMI e da CMB

A primeira etapa deste trabalho consistiu na determinação da CMI e da CMB dos agentes antimicrobianos testados, o peróxido de hidrogénio (PH) e o ácido peracético (PAA). Para tal, foram realizados cinco ensaios independentes de acordo com a metodologia descrita em 4.3.3, fazendo-se uma análise da turbidez após incubação (Figura 5.1), bem como a quantificação da viabilidade celular por determinação de UFC.

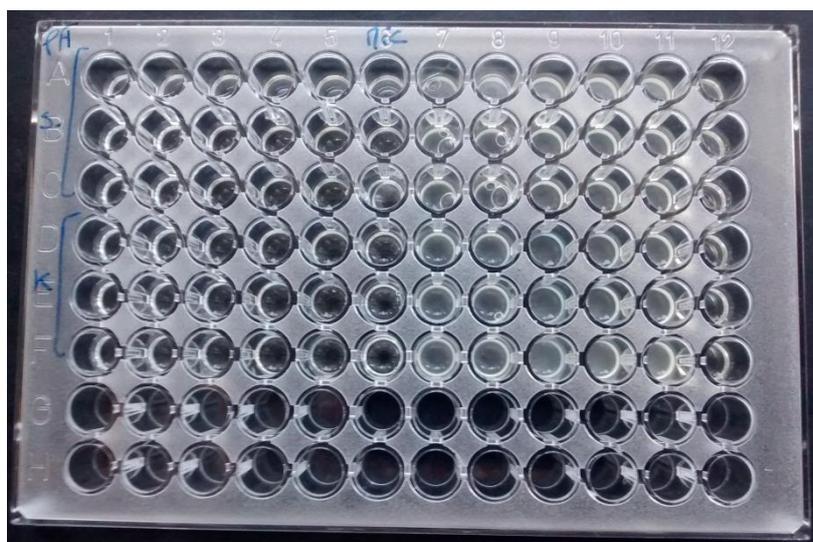


Figura 5.1. Exemplo de uma placa utilizada no teste de microdiluição para determinação da CMI do PH para *S. aureus* e *K. pneumoniae*.

Através da análise da placa de 96 poços considerou-se a CMI a concentração a partir da qual não se verificou turbidez após o tempo de incubação. Por sua vez a CMB foi a concentração mínima a partir da qual houve uma redução de 99,9 % do inóculo (Tabela 5.1).

Tabela 5.1. Valores da CMI e CMB do PH e PAA para *S. aureus* e *K. pneumoniae*

Agente antimicrobiano	<i>S. aureus</i>		<i>K. pneumoniae</i>	
	CMI (mg/L)	CMB (mg/L)	CMI (mg/L)	CMB (mg/L)
PH	39	39	19	39
PAA	77	77	77	77

Analisando a Tabela 5.1, foi possível verificar que os valores da CMI e CMB para o PH e o PAA foram aproximadamente iguais tanto para *S. aureus* como *K. pneumoniae*, o que significa que é necessária uma concentração aproximadamente igual de cada agente ativo para obter um efeito inibitório ou bactericida nessas mesmas bactérias. Os resultados obtidos estiveram bastante próximos dos reportados noutros trabalhos (Mazzola, Jozala, Novaes, Moriel, & Penna, 2009; Ghotaslou, 2012). Assim, os valores de CMI e de CMB foram usados como valores de referência para preparação dos têxteis funcionais de modo a garantir que a concentração presente fosse inibitória e/ou bactericida para as bactérias em questão.

5.2. Caracterização das nanopartículas

Antes da caracterização dos têxteis, e uma vez que o princípio ativo estava incorporado em nanopartículas de sílica, estas foram caracterizadas fisicamente. Esta caracterização foi feita por visualização em TEM, análise de distribuição de tamanhos (DLS) e carga elétrica (potencial zeta). O sucesso da incorporação destas nanopartículas nos têxteis foi avaliado quimicamente (FTIR) e visualmente por SEM.

5.2.1. TEM

Por TEM foi possível visualizar a morfologia, tamanho e dispersão das nanopartículas cujos resultados se encontram na Figura 5.2.

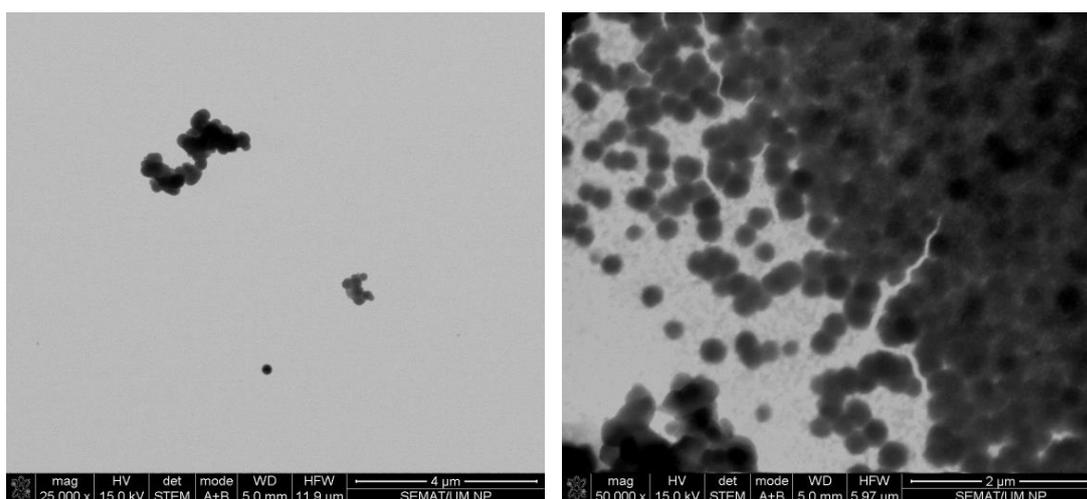


Figura 5.2. Imagens de nanopartículas de sílica obtidas por TEM.

As imagens obtidas por TEM, patentes na figura 5.2, mostram que as nanopartículas de sílica apresentam uma morfologia definida, caracterizada por uma estrutura circular. O seu tamanho foi determinado por uma contagem realizada pelo *software* utilizado para a visualização das imagens, obtendo-se um diâmetro médio de cerca de 174 nm. Por esta técnica foi ainda possível verificar a formação de alguns aglomerados das nanopartículas. O tamanho destas nanopartículas foi confirmado por DLS.

5.2.2. DLS

A técnica DLS foi utilizada, uma vez que permite avaliar o tamanho médio das nanopartículas. Na distribuição de tamanhos por intensidade foi possível obter o gráfico presente na Figura 5.3.

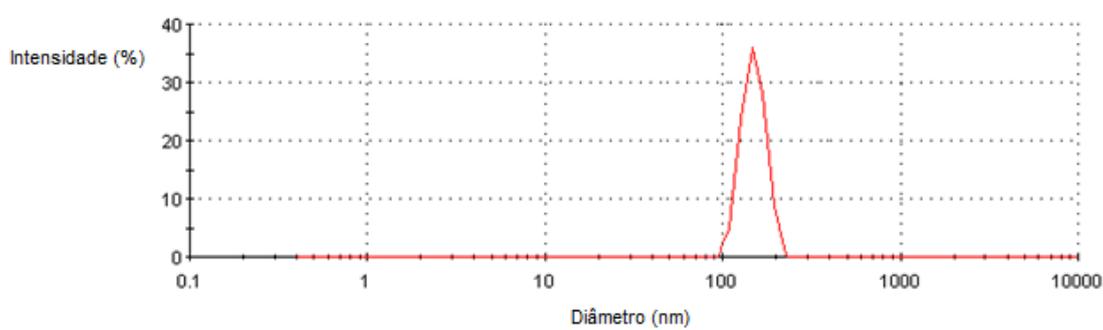


Figura 5.3. Distribuição do tamanho por intensidade.

A distribuição de tamanhos por intensidade obtida por DLS mostrou, em média, uma monodispersão com um pico estreito com um tamanho de 188 nm de diâmetro (Figura 5.3). Além disso, a partir da distribuição por número e por volume obtiveram-se valores de tamanhos bastante próximos do obtido por intensidade. Este tipo de distribuição de tamanhos, executada pelo DLS, deve ser interpretada cuidadosamente e ser apenas aceite se houver uma boa curva de correlação (fornecida pelo software), o que se verificou em todas as medições efetuadas.

Comparando os resultados obtidos pelas duas técnicas referidas, TEM e DLS, verificou-se que o valor de tamanho médio das partículas foi semelhante. Os tamanhos obtidos encontram-se acima dos tamanhos usualmente utilizados na produção de nanopartículas (1 nm a 100 nm). No entanto, uma vez que pode existir penetração na pele por parte das nanopartículas para tamanhos abaixo dos 100 nm, este tamanho é aconselhável para o uso em materiais têxteis funcionais que se encontram, normalmente, em contacto direto com a pele (Vollath, 2013; Patzelt, Richter, Sterry, & Lademann, 2008).

5.2.3. Potencial zeta

As medições do potencial zeta (ζ) foram realizadas de modo a determinar a estabilidade das nanopartículas de sílica (Figura 5.4).

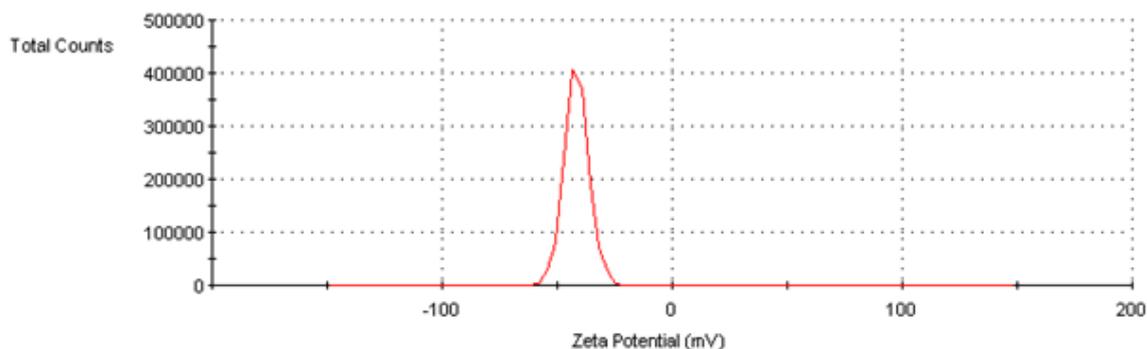


Figura 5.4. Potencial ζ de nanopartículas de sílica.

Relativamente à carga superficial das nanopartículas de sílica, os resultados, médios, indicaram que as nanopartículas apresentam um potencial ζ de aproximadamente $-42,2 \pm 1,14$ mV, valor ilustrado na figura 5.4.

A estabilidade está geralmente associada a valores de potencial ζ maiores que +30 mV e menores que -30 mV (Bedê, 2010; Martins, 2011). À medida que o potencial ζ aumenta, as interações repulsivas serão maiores, o que conduzirá à formação de partículas mais estáveis sendo determinante esta estabilidade para evitar a formação de agregados. Pela análise do valor obtido para o potencial ζ foi possível verificar que as nanopartículas utilizadas são estáveis dado que o seu valor é menor do que -30 mV.

5.3. Funcionalização e caracterização dos materiais têxteis funcionais antes das lavagens

5.3.1. Primeira fase de amostras dos materiais têxteis funcionais

Numa primeira fase foram preparadas as amostras NPPH1, NPPH2, NPPA1 e NPPA2 cuja concentração dos diferentes agentes ativos foi feita de acordo com os resultados obtidos da CMI e CMB para *S. aureus* e *K. pneumoniae* (Tabela 5.1). Como controlos negativos foram utilizados o controlo negativo 1 (algodão branqueado) e o controlo negativo 2 (algodão branqueado com nanopartículas de sílica sem o agente ativo).

5.3.1.1. Caracterização físico-química dos materiais têxteis funcionais

Para realizar a caracterização química dos diferentes materiais têxteis funcionalizados produzidos por esgotamento e *pad-batch* fez-se a análise dos mesmos por **FTIR**.

De maneira a verificar a influência das nanopartículas nos materiais têxteis foi feita a comparação entre os controlos negativos utilizados. Na Figura 5.5 é possível verificar a diferença entre o controlo negativo 1 e 2, sem e com adição de nanopartículas de sílica, sem qualquer agente ativo.

O espetro obtido por FTIR permitiu verificar que não existiram alterações significativas no que respeita aos grupos funcionais entre o controlo negativo 1 e a amostra que continha as nanopartículas sem os diferentes agentes ativos mostrando que a presença de nanopartículas não causa alterações significativas à estrutura do têxtil. Além disso foi possível verificar a presença de PH uma vez que se verifica alterações no número de onda que corresponde aos grupos hidroxilo referentes ao PH (3420 cm^{-1}). A presença de PH no controlo negativo 1 e controlo negativo 2 pode ser explicada uma vez que, aquando da produção dos têxteis, estes sofrerem um processo de branqueamento no qual se utiliza PH como agente branqueador.

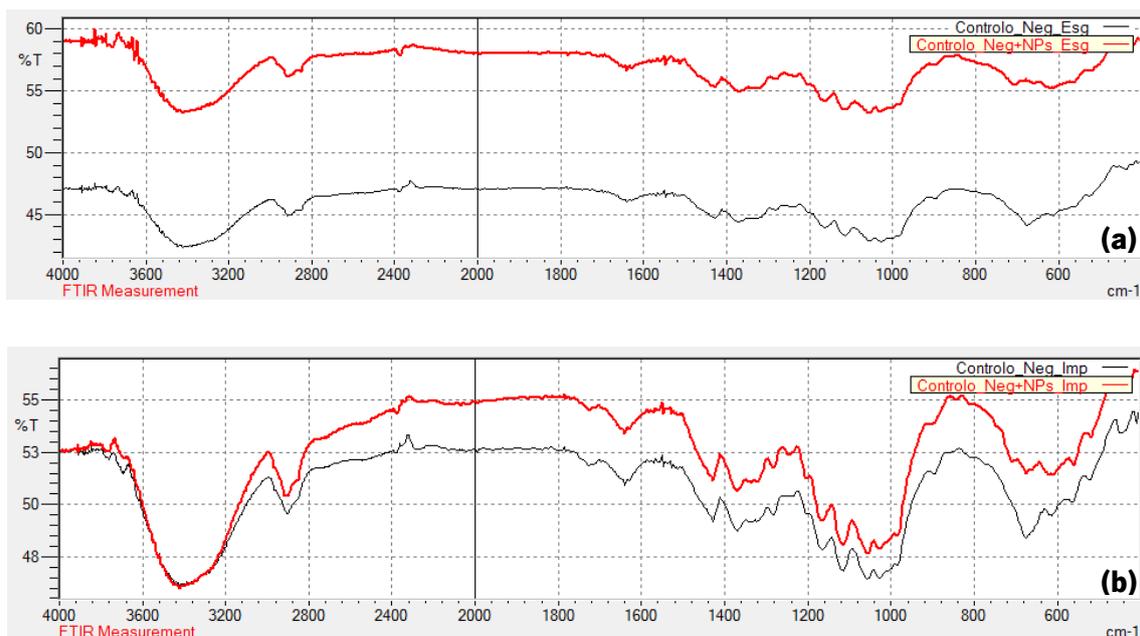


Figura 5.5. Espectro obtido por FTIR-ATR para o controlo negativo 1 (a preto) e para o controlo 2 (a vermelho). (a) Materiais têxteis preparados por esgotamento; (b) Materiais têxteis preparados por *pad-batch*.

Por **SEM** foi possível observar a superfície das fibras de algodão funcionalizado (Figura 5.6).

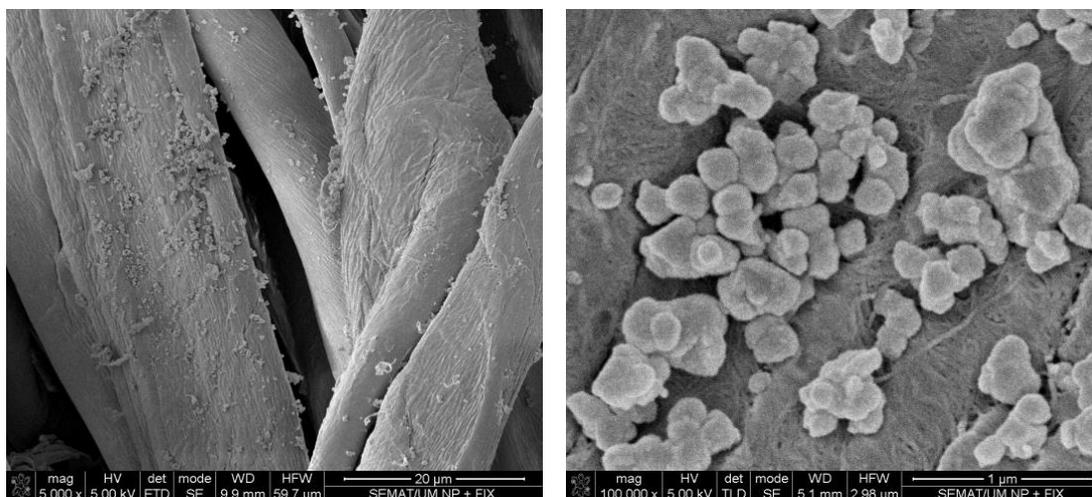


Figura 5.6. Imagens SEM de materiais têxteis funcionais com nanopartículas.

Pela análise da Figura 5.6 verificou-se a existência de nanopartículas de sílica na superfície das fibras de algodão funcionalizado e, tal como por TEM, visualizou-se a aglomeração das nanopartículas, o que é corroborado por outros autores (Kan, Lam, & Yuen, 2012).

5.3.1.2. Quantificação do princípio ativo

De maneira a determinar a concentração do princípio ativo presente nas várias amostras realizou-se a quantificação dos mesmos por iodometria. Dada a dificuldade em quantificar o PAA, uma vez que o *kit* utilizado (LaMotte, 2015) não se mostrou eficaz, procedeu-se apenas à quantificação dos materiais têxteis que continham PH.

Para as amostras produzidas por esgotamento esta quantificação realizou-se por dois métodos diferentes, descritos em 4.3., quantificando a presença do PH no banho final e no banho inicial e quantificação de PH diretamente no material têxtil. Na análise dos banhos considerou-se que a diferença de concentrações será, teoricamente, a que ficou retida no material têxtil. Para os materiais têxteis funcionalizados preparados por *pad-batch* apenas se realizou a quantificação do material têxtil por iodometria uma vez que, como foi referido, não foi possível reaproveitar o banho final após o processo.

Na Tabela 5.2 encontram-se as concentrações de PH determinadas para as amostras utilizadas na primeira fase deste trabalho.

Tabela 5.2. Concentração de PH nas diferentes amostras

Amostras	Concentração de PH calculada por diferença de banhos (mg/L)	Concentração de PH no têxtil (mg/L)	
Esgotamento	Controlo negativo 1	0	260.34
	NPPH1	139.75	308.60
	NPPH2	38.14	303.66
<i>Pad-batch</i>	Controlo negativo 1	-	173.55
	NPPH1	-	180.31
	NPPH2	-	180.37

Pela análise da Tabela 5.2, é possível verificar que as amostras preparadas por *pad-batch* retiveram uma concentração bastante menor de PH dada a sua concentração final no têxtil em comparação com as amostras preparadas por esgotamento. Esta diferença de concentrações

finais pode ser explicada pelo maior tempo de contacto que existe entre os materiais têxteis e as nanopartículas quando o acabamento funcional é feito por esgotamento. Para além das concentrações de PH obtidas na Tabela 5.2. foi possível quantificar a concentração de PH nos banhos iniciais (antes do processo de esgotamento e *pad-batch*). Como resultado dessa quantificação obteve-se uma concentração de PH de 955 mg/L para o banho inicial usado para a amostra NPPH1 e de 1135 mg/L para NPPH2. Com estes resultados foi possível verificar que a concentração final de PH nos materiais têxteis funcionalizados foi bastante inferior para ambas as técnicas (esgotamento e *pad-batch*). Ainda assim, os valores de concentração de PH estavam acima dos valores obtidos para a CMI e a CMB para ambas as bactérias. Analisando os valores obtidos para a concentração de PH pelos dois métodos de análise, foi possível verificar que estes foram bastante diferentes. Uma vez que os métodos utilizados são ambos para determinar a concentração de PH nas amostras seria expectável uma maior semelhança entre os mesmos. Esta diferença de concentrações pode ser explicada pela acumulação de erros nas titulações realizadas pelo método de cálculo de determinação da concentração de PH com base na diferença de banhos.

Nas amostras usadas como controlo negativo 1 preparadas por esgotamento e *pad-batch*, onde havia apenas água, encontraram-se concentrações diferentes que não foram de acordo com o esperado. Além dessa concentração de PH poder ter resultado do processo de branqueamento, como já foi referido, esta diferença de concentrações pode ser justificada pelo processo de secagem em que as amostras NPPH1 e NPPH2, preparadas por esgotamento, estiveram em contacto com o controlo negativo 1, também preparado por esgotamento, podendo assim ter havido alguma passagem do agente antimicrobiano para este controlo. Esta explicação também justifica os valores obtidos para o controlo negativo 1 preparado por *pad-batch*, uma vez que no processo de secagem esteve em contacto com as amostras NPPH1 e NPPH2, preparados por *pad-batch*, podendo, mais uma vez, ter havido alguma passagem do agente antimicrobiano para este controlo. Assim, a menor concentração de PH dos materiais têxteis funcionais preparados por *pad-batch* (comparando com os preparados por esgotamento), justifica a menor concentração do controlo negativo 1 preparado por *pad-batch* em relação ao preparado por esgotamento.

5.3.1.3. Determinação da eficácia e atividade antibacteriana dos materiais têxteis funcionais

Tal como já referido, numa primeira fase deste trabalho foram usadas as amostras NPPH1, NPPH2, NPPA1 e NPPA2 descritas anteriormente no capítulo 4.1.

De forma a se proceder à avaliação da atividade antimicrobiana dos materiais funcionalizados recorreu-se aos métodos quantitativo e qualitativo da norma JIS L 1902:2008.

Usando o método qualitativo, foi possível fazer uma análise preliminar da atividade antimicrobiana dos diferentes materiais têxteis (Figura 5.7.).

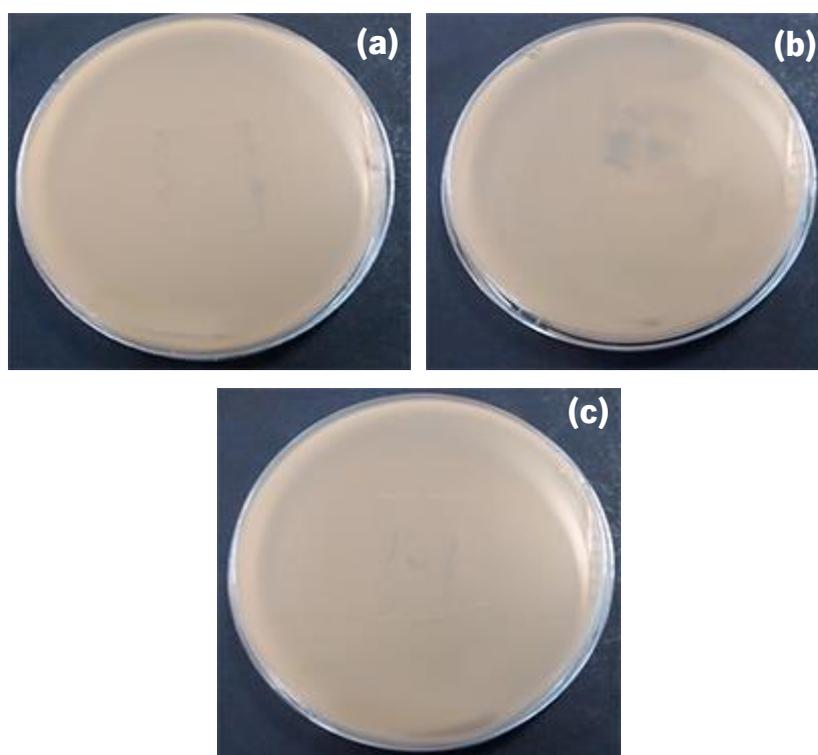


Figura 5.7. Amostras analisadas por JIS L 1902:2008. Ensaio feito usando *S. aureus*. (a) Controlo negativo 1 produzido por esgotamento (b) NPPH2 produzida por esgotamento; (c) NPPA2 produzida por esgotamento.

Constata-se na Figura 5.7 que, analisando a zona debaixo do tecido (que estava colocado no centro da placa) dos diferentes materiais têxteis, foi possível verificar alguma atividade antimicrobiana dado que se visualizou uma zona sem crescimento bacteriano. No entanto, a zona de inibição quase não foi notória, principalmente para as amostras que continham maior concentração do agente antimicrobiano (NPPA2 e NPPH2). Para *K. pneumoniae* a análise da atividade antimicrobiana foi semelhante, verificando-se também uma atividade antimicrobiana pouco notória. Os resultados obtidos, fotograficamente, para *K. pneumoniae* são semelhantes

aos de *S. aureus*, e portanto não foram aqui apresentados, apresentando-se assim na Tabela 5.3. a presença ou ausência de atividade antimicrobiana para ambas as bactérias e para todas as amostras testadas.

Tabela 5.3. Amostras NPPH1, NPPH2, NPPA1, NPPA2 e controlo negativo 1 analisadas por JIS L 1902:2008 – Método qualitativo. Ensaio feito usando *S. aureus* e *K. pneumoniae*. (+) presença de atividade antimicrobiana; (-) ausência de atividade antimicrobiana.

Amostras										
Bactérias	Esgotamento					Pad-batch				
	Controlo negativo 1	NPPH1	NPPH2	NPPA1	NPPA2	Controlo negativo 1	NPPH1	NPPH2	NPPA1	NPPA2
<i>S. aureus</i>	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-

Pela análise de todos os resultados, demonstrados na Tabela 5.3. foi possível verificar que apenas se verificou a presença de atividade antimicrobiana para a amostra NPPH2 e NPPA2 preparadas por esgotamento enquanto para todas as outras amostras se verificou a ausência de atividade antimicrobiana que se pode dever ao material têxtil funcional, por vezes, não estar em contacto direto com a bactéria e à menor concentração de agente antimicrobiano nessas amostras

Após a realização deste método foi efetuado o método quantitativo segundo a norma anteriormente referida. A Figura 5.8 representa a taxa de redução média obtida para as várias amostras testadas. Para cálculo da taxa de redução, de acordo com a equação 3 descrita anteriormente, recorreu-se à contagem do número de UFC e posterior cálculo do número de células.

Pela análise da Figura 5.8 foi possível constatar que todas as amostras apresentaram atividade antimicrobiana, verificando-se que, em todos os ensaios os têxteis funcionalizados testados obtiveram uma taxa de redução de 100 %. O controlo negativo 1 obteve em média, e para ambos os métodos, uma taxa de redução de 70 % para *S. aureus* e de 100 % para *K. pneumoniae*. Este resultado encontra-se ao contrário teoricamente esperado, dado que neste material têxtil era esperado a ausência de atividade antimicrobiana. No entanto, este resultado pode ser explicado pelo facto de, como foi referido, aquando da produção dos têxteis, estes

sofrerem um processo de branqueamento no qual se utiliza PH como agente branqueador. Assim, este resultado advém do facto de existir uma presença de PH no controlo negativo 1, resultando na atividade antimicrobiana verificada (SB, et al., 2013). Além disso, pelos resultados obtidos pela quantificação do agente antimicrobiano, presentes na Tabela 5.2, é possível corroborar estes resultados uma vez que na quantificação de PH nos controlos utilizados se verificou uma concentração de PH acima da CMB para ambas as bactérias (39 mg/L). Com a comparação destes resultados foi possível verificar que o valor mais correto a considerar seria o obtido pela quantificação do PH no material têxtil, uma vez que se a amostra NPPH2 tivesse a concentração de PH determinada pela quantificação por diferença de banhos, não deveria apresentar uma taxa de redução de 100 % para nenhuma das bactérias. Após a obtenção destes resultados foi realizada uma neutralização das amostras com água destilada. De seguida, realizou-se novamente o método quantitativo segunda a norma JIS L 1902:2008 tendo-se obtido uma taxa de redução de 0 % para todas as amostras (NPPH1, NPPH2, NPPA1, NPPA2 e controlo negativo 1).

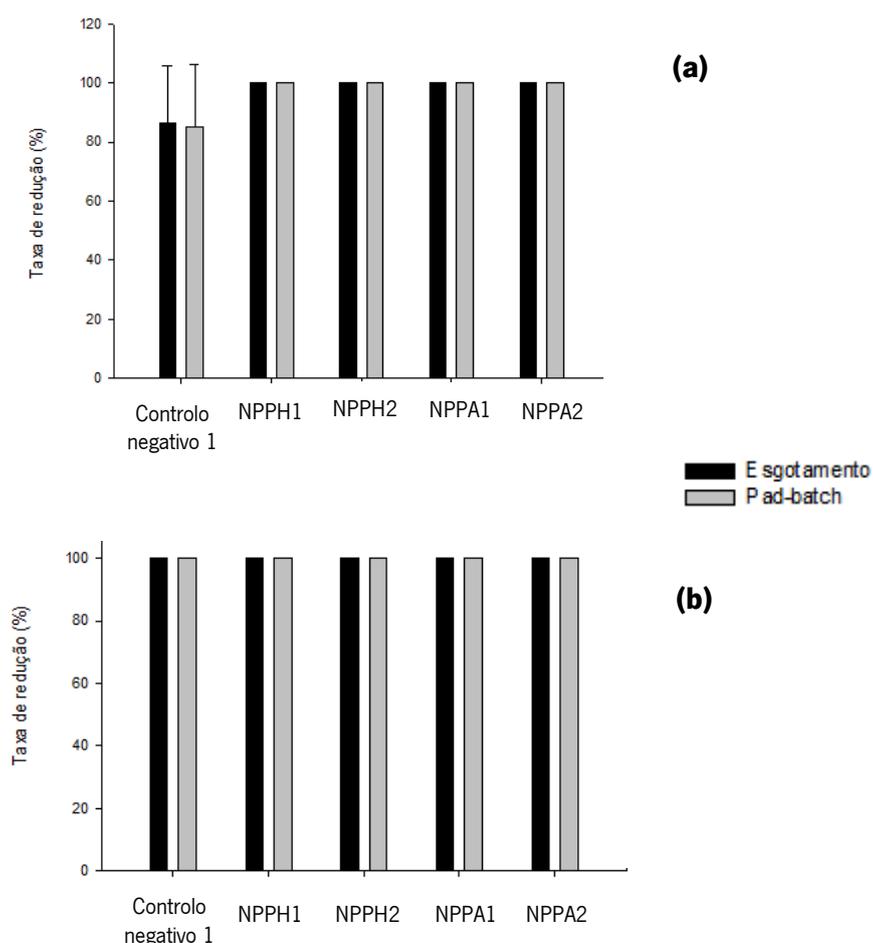


Figura 5.8. Taxa de redução (%) para (a) *S. aureus* e (b) *K. pneumoniae* obtida por JIS L 1902:2008 – método quantitativo para as diferentes amostras preparadas na primeira fase com ambos os agentes e para o controlo negativo 1.

Dados os resultados obtidos com a amostra de controlo negativo 1, decidiu-se testar a atividade de todos os agentes utilizados no processo de funcionalização dos materiais têxteis. Neste processo utilizaram-se dois agentes auxiliares, nomeadamente Prote-pon KB e Luprintol PE, e assim procedeu-se à realização do teste do halo com estes agentes (Figura 5.9).

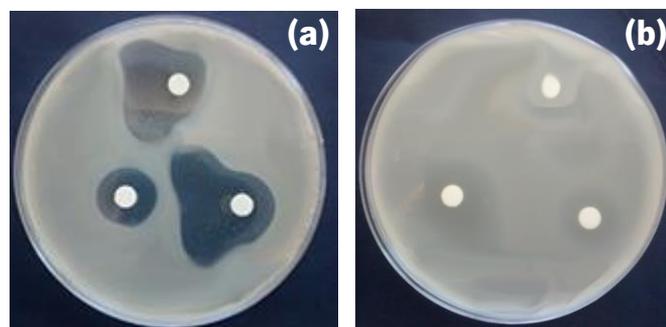


Figura 5.9. Ensaio realizado com *S. aureus*. (a) Prote-pon KB; (b) Luprintol PE.

Analisando os resultados obtidos pelo método realizado foi possível verificar, como demonstrado na Figura 5.9, a presença de atividade antimicrobiana do composto Prote-pon KB usado como agente auxiliar. Por seu lado o composto Luprintol PE não apresentou atividade antimicrobiana para nenhuma das bactérias testadas (os resultados obtidos para *K. pneumoniae* são semelhantes aos de *S. aureus*, e portanto não foram aqui apresentados).

Além disso, de forma a avaliar se as nanopartículas de sílica, sem qualquer agente antimicrobiano, teriam atividade antimicrobiana realizou-se o método qualitativo de acordo com a norma JIS L 1902:2008 para o controlo negativo 2 (Figura 5.10).



Figura 5.10. Controlo negativo 2. Ensaio realizado com *S. aureus*.

Pela análise da Figura 5.10, foi possível comprovar que as nanopartículas de sílica, por si só, não têm qualquer atividade antimicrobiana, uma vez que não se verificou qualquer diferença em toda a placa.

5.3.2. Segunda fase de amostras dos materiais têxteis funcionais

Pela análise dos materiais têxteis funcionais preparados numa primeira fase (NPPH1, NPPH2, NPPA1 e NPPA2), foi possível verificar que a concentração de PH quantificada, além de ter sido relativamente igual à do controlo negativo 1 (algodão branqueado), seria insuficiente para a avaliação da durabilidade do efeito antimicrobiano dos mesmos. Além disso, pelo método qualitativo não foi possível verificar zonas notórias de atividade antimicrobiana para nenhuma das amostras. Assim, após a análise dos resultados obtidos para as amostras anteriores para a atividade antimicrobiana de acordo com o método qualitativo e quantitativo (antes e após a neutralização), aliado à sua quantificação de PH, tornou-se necessário aumentar a concentração de agente ativo a reter no tecido de maneira a avaliar a eficácia e durabilidade das nanopartículas nos materiais têxteis funcionais. Face também à dificuldade em quantificar o PAA anteriormente referida, resolveu-se apenas aumentar a concentração de PH nos novos materiais têxteis funcionais que foram preparados por esgotamento e *pad-batch*.

Para tal, realizou-se a preparação dos novos tecidos, referidos no capítulo 4.1: NPPH3 e controlo positivo. Nestas amostras houve um aumento da concentração do agente antimicrobiano em relação às amostras utilizadas anteriormente. O controlo positivo utilizado foi realizado com a mesma concentração de princípio ativo inicial usada para a amostra NPPH3 mas o agente antimicrobiano (PH) estava directamente presente no banho, não tendo sido utilizadas nanopartículas de sílica.

5.3.2.1. Caracterização físico-química dos materiais têxteis funcionais

A caracterização química das amostras preparadas numa segunda fase da investigação foi também realizada por FTIR.

Na Figura 5.11. encontram-se os resultados relativos ao estudo da influência da presença do agente ativo (comparação do controlo negativo 1 e do controlo positivo).

Comparando o controlo negativo 1 com o controlo positivo, para ambos os métodos, foi possível observar um aumento da intensidade da banda (3420 cm^{-1}) que corresponde aos grupos hidroxilo referentes ao PH e se deve à maior concentração de PH. No caso do controlo positivo verificaram-se ainda alterações significativas nas bandas relativa a ligações -CH no algodão ($1370\text{-}1385\text{ cm}^{-1}$) (Coates, 2000). Pela análise da Figura 5.11. foi ainda possível verificar que

não se registaram alterações significativas entre o controlo positivo preparado por esgotamento e *pad-batch* relativamente aos grupos funcionais.

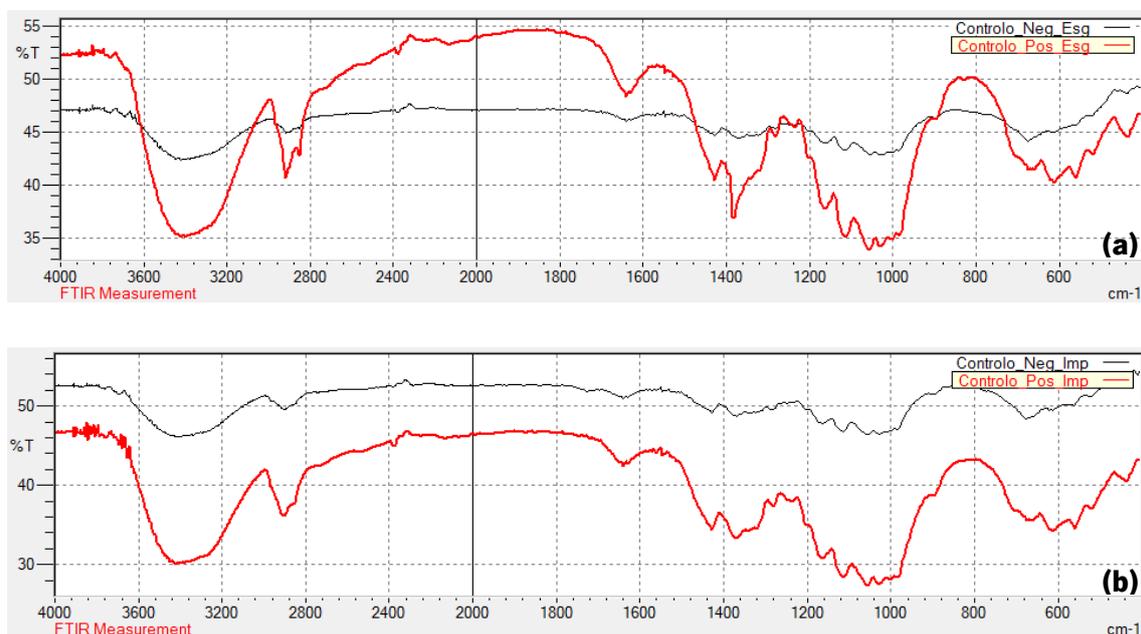


Figura 5.11. Espectro obtido por FTIR para o controlo negativo 1 (a preto) e controlo positivo (a vermelho). (a) Materiais têxteis preparados por esgotamento; (b) Materiais têxteis preparados por *pad-batch*.

Na Figura 5.12 é possível efetuar a comparação entre a amostra do material têxtil funcionalizado NPPH3 e o controlo negativo 1.

Tal como no espectro anterior, é possível verificar, pela Figura 5.12, que no tecido com as nanopartículas contendo o PH foi possível observar, mais uma vez, o aumento de intensidade na banda (3420 cm^{-1}) que corresponde aos grupos hidroxilo (ligação -OH). Além disso, verificam-se também alterações em várias bandas correspondentes a ligações -CH ($1370\text{-}1385\text{ cm}^{-1}$) que se formaram no material têxtil funcional (Coates, 2000).

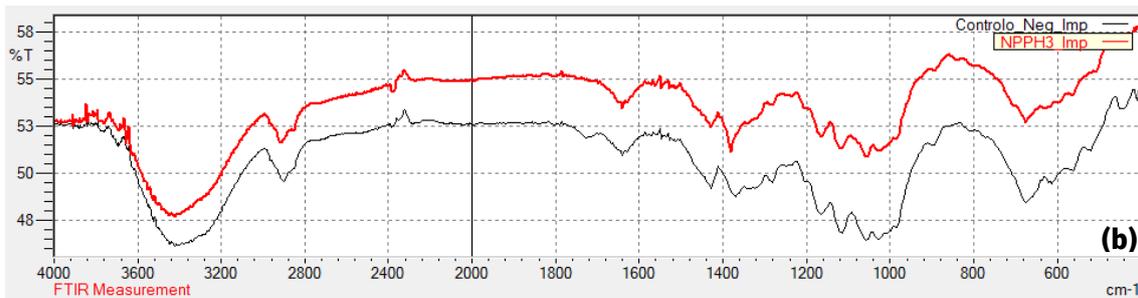
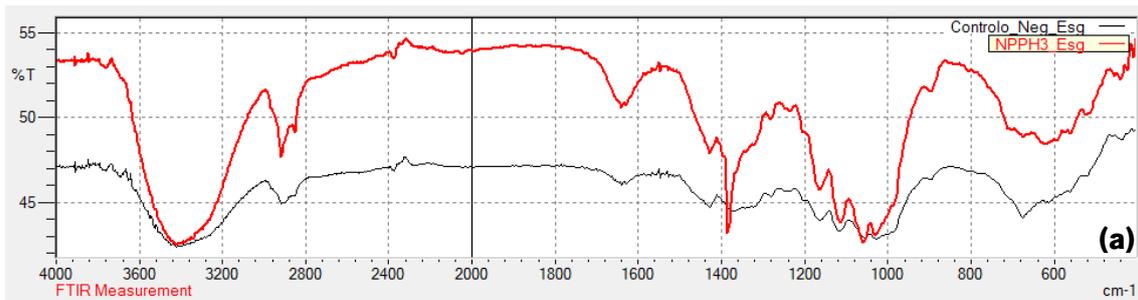


Figura 5.12. Espectro obtido por FTIR para o controlo negativo 1 (a preto) e a amostra NPPH3 (a vermelho). (a) Materiais têxteis preparados por esgotamento; (b) Materiais têxteis preparados por *pad-batch*.

Pela Figura 5.13, foi possível verificar comparar os espectros entre a amostra NPPH3 preparada por esgotamento e *pad-batch*.

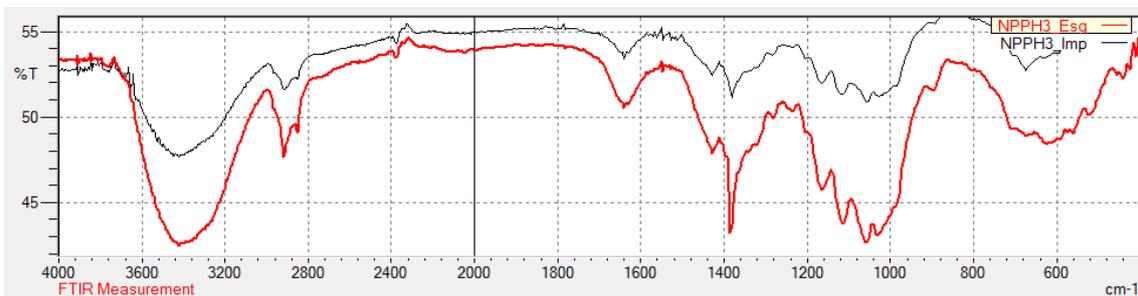


Figura 5.13. Espectro obtido por FTIR para as amostras NPPH3 preparadas por *pad-batch* (a preto) e esgotamento (a vermelho).

Comparando as amostras NPPH3 preparadas por esgotamento e *pad-batch*, pela Figura 5.13, é possível verificar que apesar da semelhança no perfil das bandas características existe uma maior intensidade em várias bandas no tecido preparado por esgotamento. Mais uma vez essa maior intensidade de bandas foi principalmente visível na banda (3420 cm^{-1}) que corresponde aos grupos hidroxilo (ligação -OH) e a ligações -CH ($1370\text{-}1385\text{ cm}^{-1}$). Esta maior intensidade das bandas nos tecidos preparados por esgotamento em relação aos preparados por *pad-batch* foi também possível verificar nos espectros obtidos para o controlo positivo (Coates, 2000). Esta maior intensidade das bandas deve-se a uma maior retenção do agente antimicrobiana pelos

materiais têxteis preparados por esgotamento. Apesar da maior intensidade das bandas, não se verificaram alterações significativas entre a amostra NPPH3 preparada por esgotamento e pad-batch relativamente aos grupos funcionais.

Verificando-se a funcionalização da amostra NPPH3 pelos resultados obtidos por FTIR e dado que as amostras foram preparadas com o mesmo tipo de nanopartículas de sílica, não se revelou pertinente a caracterização física desta amostra por SEM.

5.3.2.3. Quantificação do princípio ativo

Para a determinação da concentração do princípio ativo presente nas várias amostras realizou-se a quantificação dos mesmos por iodometria.

Na Tabela 5.4 encontram-se os valores de concentração de PH nos materiais têxteis que foram preparados na segunda fase deste trabalho, nomeadamente as amostras NPPH3.

Tabela 5.4. Concentração de PH nas diferentes amostras

Amostras		Concentração de PH	Concentração de PH
		calculada por diferença de banhos (mg/L)	no têxtil (mg/L)
Esgotamento	Controlo positivo	3208.78	6578.60
	NPPH3	5900.64	5394.17
<i>Pad-batch</i>	Controlo positivo	-	2024.78
	NPPH3	-	1938.73

Nos novos materiais têxteis que foram preparados, NPPH3, foi possível verificar pela Tabela 5.4 que a concentração final de PH nos mesmos foi superior, em relação às amostras anteriores. Tal como já referido, nas amostras produzidas por esgotamento, além de ser possível quantificar a concentração final de PH no têxtil, quantificou-se também a concentração de PH por diferença de banhos, entre o banho inicial e final. Como resultado desses métodos foi possível verificar que para a amostra NPPH3, cujo acabamento foi feito por esgotamento, as concentrações de PH que foram determinadas pelos dois métodos de avaliação foram bastante semelhantes, ao contrário da quantificação para o controlo positivo. Esta diferença de concentrações obtidas para

o controlo positivo pode-se ter devido, tal como aconteceu anteriormente, a erros nas titulações realizadas quando se quantificou a concentração de PH calculada por diferença de banhos.

Tal como se verificou pela análise da Tabela 5.2, também nos resultados verificados na Tabela 5.4 verificou-se uma maior concentração de PH nas amostras preparadas por esgotamento, havendo uma maior retenção do agente antimicrobiano nos materiais têxteis cujo acabamento foi realizado por esta técnica. A maior retenção das nanopartículas, e conseqüentemente do agente antimicrobiano, pode ser explicada, mais uma vez, pelo maior tempo de contacto entre a fibra e as nanopartículas quando a funcionalização é realizada por esgotamento.

5.3.2.3. Determinação da eficácia e atividade antibacteriana dos materiais têxteis funcionais

De maneira a fazer uma avaliação preliminar da atividade antimicrobiana das amostras preparadas numa segunda fase realizou-se o método qualitativo segundo a norma JIS L 1902:2008 cujos resultados se encontram na Figura 5.14.

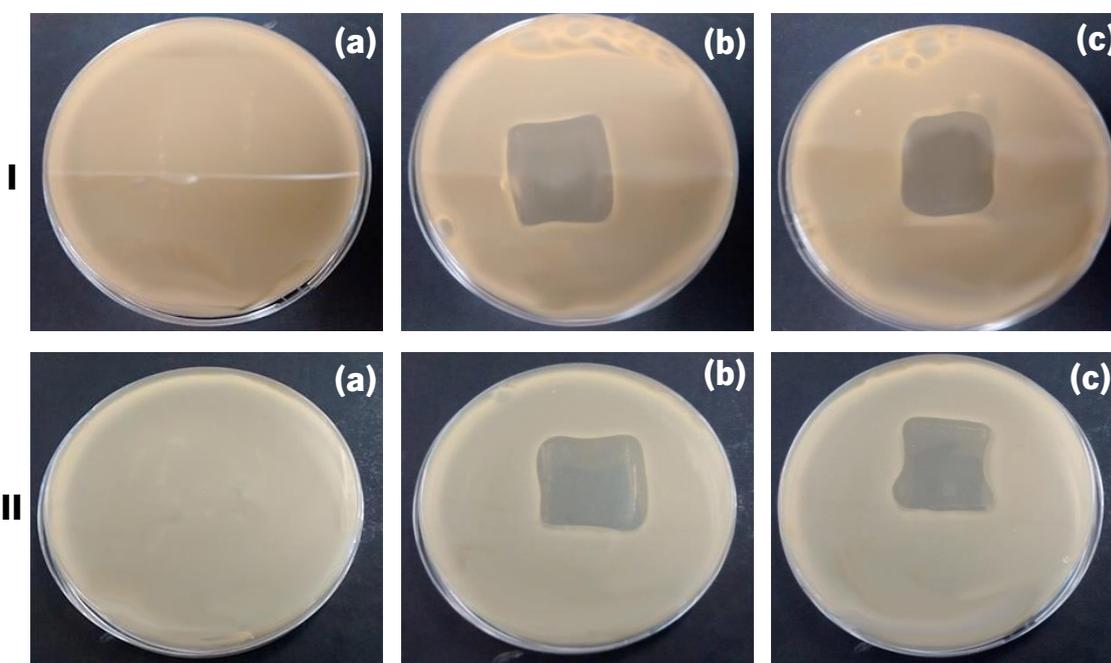


Figura 5.14. Amostras produzidas por esgotamento analisadas por JIS L 1902:2008. Ensaio realizado usando (I) *S. aureus*; (II) *K. pneumoniae*. (a) Controlo negativo; (b) Controlo positivo; (c) NPPH3.

Pela análise da Figura 5.14 verificou-se, comparativamente com a Figura 5.7, um aumento da atividade antimicrobiana dado que na zona onde se encontrava o tecido não se verificou

crescimento microbiano. Para o tecido usado como controlo positivo (Figura 5.14. (b)), descrito anteriormente, preparado por esgotamento foi ainda possível verificar a presença de halo de aproximadamente 5 mm. Esta presença de zona de inibição de crescimento, e em alguns casos a presença de halo, indicou uma maior atividade antimicrobiana que foi corroborada por uma maior concentração de PH que foi determinada anteriormente. Comparando o controlo positivo com a amostra NPPH3, foi possível verificar que ambas tiveram uma zona de atividade antimicrobiana na zona em que se colocou o material têxtil tendo-se, ainda assim, notado uma maior atividade antimicrobiana para o controlo positivo que pode ser explicada, como foi dito anteriormente, por uma maior concentração de PH nessa amostra.

Os resultados demonstrados, fotograficamente, para as amostras por *pad-batch* para *K. pneumoniae* são semelhantes aos de *S. aureus*, e portanto não foram aqui apresentados, apresentando-se assim na Tabela 5.5. a presença ou ausência de atividade antimicrobiana para ambas as bactérias e para todas as amostras testadas.

Tabela 5.5. Amostras NPPH3, controlo positivo e controlo negativo analisadas por JIS L 1902:2008 – Método qualitativo. Ensaio feito usando *S. aureus* e *K. pneumoniae*. (+) presença de atividade antimicrobiana; (-) ausência de atividade antimicrobiana.

Bactérias	Amostras					
	Esgotamento			<i>Pad-batch</i>		
	Controlo negativo	Controlo positivo	NPPH3	Controlo negativo	Controlo positivo	NPPH3
<i>S. aureus</i>	-	+	+	-	+	+
<i>K. pneumoniae</i>	-	+	+	-	+	+

Pela análise dos resultados na Tabela 5.5. foi possível verificar-se a presença de atividade antimicrobiana na amostras NPPH3 e no controlo positivo e ausência de atividade antimicrobiana para o controlo negativo tanto para esgotamento e *pad-batch*. Estes resultados vão de acordo com os valores de quantificação de PH obtidos para estas amostras uma vez que para a amostra NPPH3 e para o controlo positivo esse valor encontrava-se acima da CMB para ambas as bactérias (39 mg/L) e no caso do controlo negativo esse valor encontrava-se abaixo da CMB (0 mg/L de PH no algodão cru).

As taxas de redução obtidas pela realização do método quantitativo de acordo com a norma JIS L 1902:2008 encontram-se na Figura 5.15.

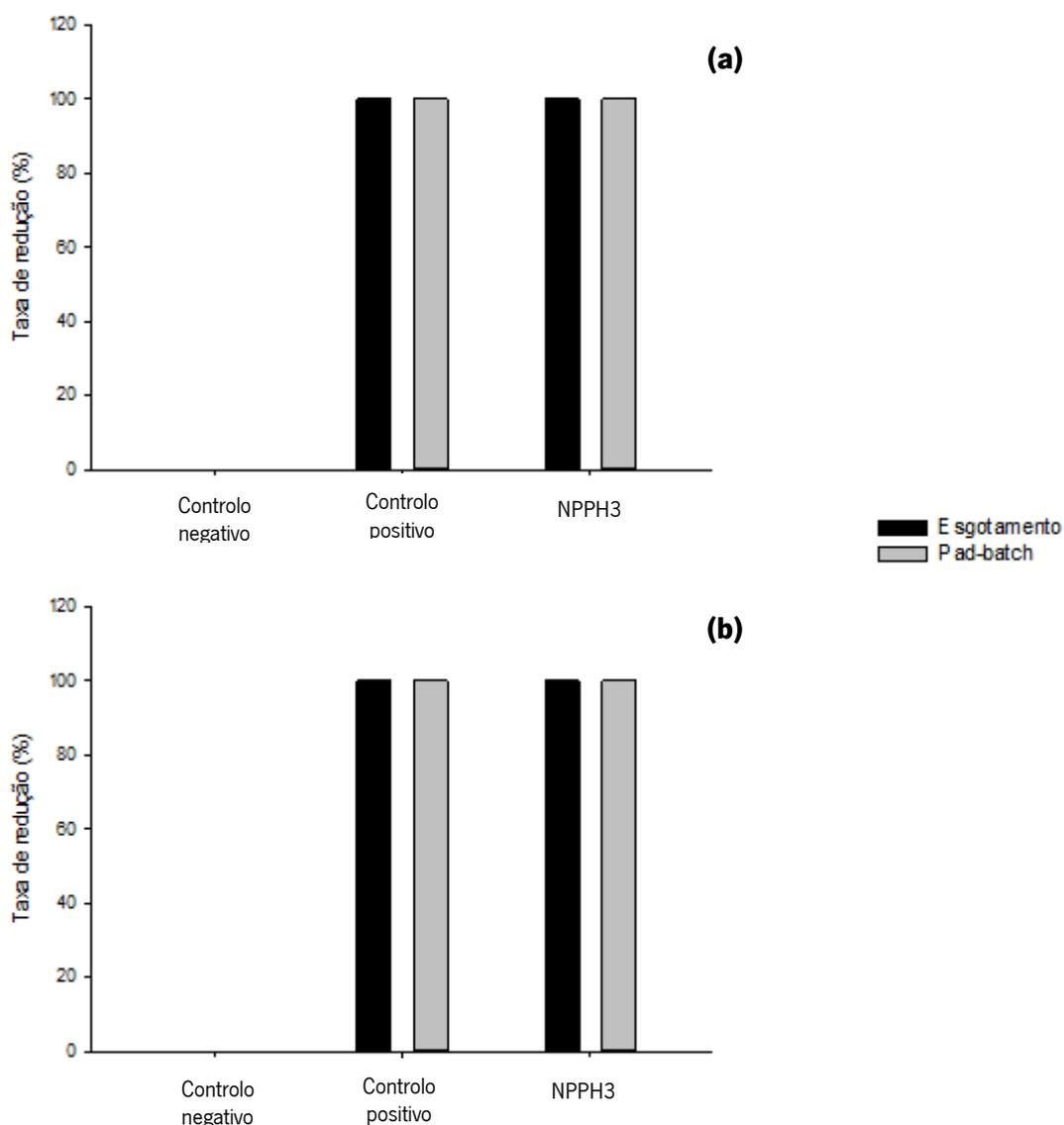


Figura 5.15. Taxa de redução (%) obtida por JIS L 1902:2008 – método quantitativo para as diferentes amostras.

(a) *S. aureus* e (b) *K. pneumoniae*.

Pela análise dos resultados da Figura 5.15, verificou-se uma taxa de redução de 100 % para a amostra NPPH3 e para o controlo positivo, preparados por esgotamento e pad-batch, para ambas as bactérias. Estes resultados corroboraram os resultados obtidos pelo método qualitativo realizado de acordo com a mesma norma. Estes resultados vão de acordo com o esperado uma vez que, como foi dito anteriormente, a concentração de PH nestes tecidos era maior que a CMB das duas bactérias.

5.4. Avaliação da eficácia e durabilidade da atividade antimicrobiana dos materiais têxteis funcionais após as lavagens

O principal objectivo deste trabalho foi a avaliação do efeito das lavagens na atividade antimicrobiana dos materiais têxteis funcionalizados. Para tal, efetuaram-se vinte ensaios de lavagem segundo a norma ISO 105:C06 A2S, tendo-se quantificado a concentração de PH e verificado a atividade antimicrobiana das amostras (controlo negativo 1, controlo positivo e NPPH3) após as 20 lavagens realizadas. Tendo em conta os resultados obtidos anteriormente, foi selecionada a amostra NPPH3 para efetuar a análise da eficácia e durabilidade do material têxtil funcional referido.

5.4.1. Quantificação do princípio ativo nos materiais têxteis funcionais após as lavagens

De maneira a se verificar a influência das lavagens na eficácia e durabilidade das nanopartículas, quantificou-se o PH no banho final aquando da 5^a, 10^a, 15^a e 20^a lavagem (Tabela 5.6). Apesar de terem sido efetuadas as 20 lavagens no controlo negativo 1 não foi feita a sua quantificação de PH tendo em conta a baixa concentração que foi obtida anteriormente.

Tabela 5.6. Concentração média de PH após as diferentes lavagens dos têxteis antimicrobianos produzidos pelos dois métodos (esgotamento e *pad-batch*)

		Quantificação média de PH a cada lavagem (mg/L)			
Amostras		5 ^a lavagem	10 ^a lavagem	15 ^a lavagem	20 ^a lavagem
Esgotamento	Controlo Positivo	14.93 ± 6.50	13.47 ± 10.74	15.32 ± 4.83	8.29 ± 2.45
	NPPH3	17.48 ± 5.41	21.07 ± 13.92	11.58 ± 0.56	8.81 ± 4.89
<i>Pad-batch</i>	Controlo Positivo	2.91 ± 10.48	3.14 ± 4.05	0	2.32 ± 4.81
	NPPH3	0.89 ± 6.86	8.04 ± 7.62	0	0

Pela análise dos valores presentes na Tabela 5.6. é possível verificar que para as amostras preparadas (controlo positivo e NPPH3) por esgotamento verificou-se que, tendo em conta o desvio padrão, houve uma perda idêntica na 5^a, 10^a e 15^a lavagem ao contrário das amostras preparadas por *pad-batch*. Esta diferença pode ser explicada pela maior concentração de PH nas primeiras amostras (controlo positivo e NPPH preparadas por esgotamento), levando a uma

constante redução do PH a cada lavagem enquanto nas amostras por *pad-patch* a maior parte do agente antimicrobiano terá sido retirado do material têxtil nas primeiras lavagens. Dado que o processo de lavagem é feito usando perborato de sódio, que é solúvel em água e liberta PH, a esta quantificação média de PH foi retirado o valor da concentração inicial que se adicionava de perborato de sódio, o que explica a obtenção de valores nulos, que se traduz na ausência quase total do agente antimicrobiano à 15ª lavagem para as amostras produzidas por *pad-batch* (McKillopa & Sandersonb, 1995).

Após as lavagens foi também possível quantificar a presença de PH no material têxtil final. Para tal, calculou-se um valor médio das diferentes concentrações de PH obtidas nos três ensaios efetuados (Tabela 5.7).

Tabela 5.7. Concentração de PH nas diferentes amostras após as lavagens

Amostras		Concentração de PH no material têxtil (mg/L)
Esgotamento	Controlo Positivo	473.75 ± 7.37
	NPPH3	25.65 ± 0.15
<i>Pad-batch</i>	Controlo Positivo	15.63 ± 6.73
	NPPH3	17.34 ± 4.67

Foi possível constatar que o controlo positivo, cujo acabamento antimicrobiano foi preparado por esgotamento, apresenta um valor bastante mais alto de concentração de PH em relação às outras amostras. Com estes resultados é possível verificar que a concentração de PH na amostra NPPH3, preparada por esgotamento e *pad-batch*, é mais baixa que a CMB para *K. pneumoniae* (39 mg/L) e *S. aureus* (39 mg/L). Apesar do controlo positivo apresentar uma concentração maior do agente ativo que a amostra NPPH3, após as vinte lavagens, não foi possível saber se este valor se deveu a uma maior taxa de retenção por parte deste tecido dado que a sua concentração inicial antes das lavagens também foi maior como se pôde verificar pela Tabela 5.4. A concentração total média de PH libertada poderia ser feita, considerando que a concentração libertada a cada lavagem era aproximadamente linear, calculando a média da concentração de PH libertada nas 4 lavagens que esta foi quantificada e multiplicando esse valor médio pelo total das 20 lavagens. Subtraindo esse valor, para as amostras por esgotamento (294.70 mg/L), por exemplo, à concentração inicial da amostra NPPH3 (5394.17), seria

expectável obter o valor obtido na Tabela 5.6. No entanto, para a amostras preparada por esgotamento, por exemplo, esse valor foi de 5099.47 mg/L que é bastante maior que o obtido pela quantificação do PH na amostra NPPH3 após as lavagens (25.65 mg/L) o que pode ser explicado por haver uma maior libertação de PH aquando das primeiras lavagens, até à 5^a, cujos valores não foram possível quantificar (Ranganath, 2011).

5.4.2. Determinação da eficácia e atividade antibacteriana dos materiais têxteis funcionais após as lavagens

De maneira a avaliar a atividade antimicrobiana dos Materiais têxteis após as lavagens realizou-se o método qualitativo da norma JIS L 1902:2008 para o controlo negativo, controlo positivo e amostra NPPH3, para *S. aureus* (Figura 5.16) e *K. pneumoniae* (resultados não apresentados por serem semelhantes).

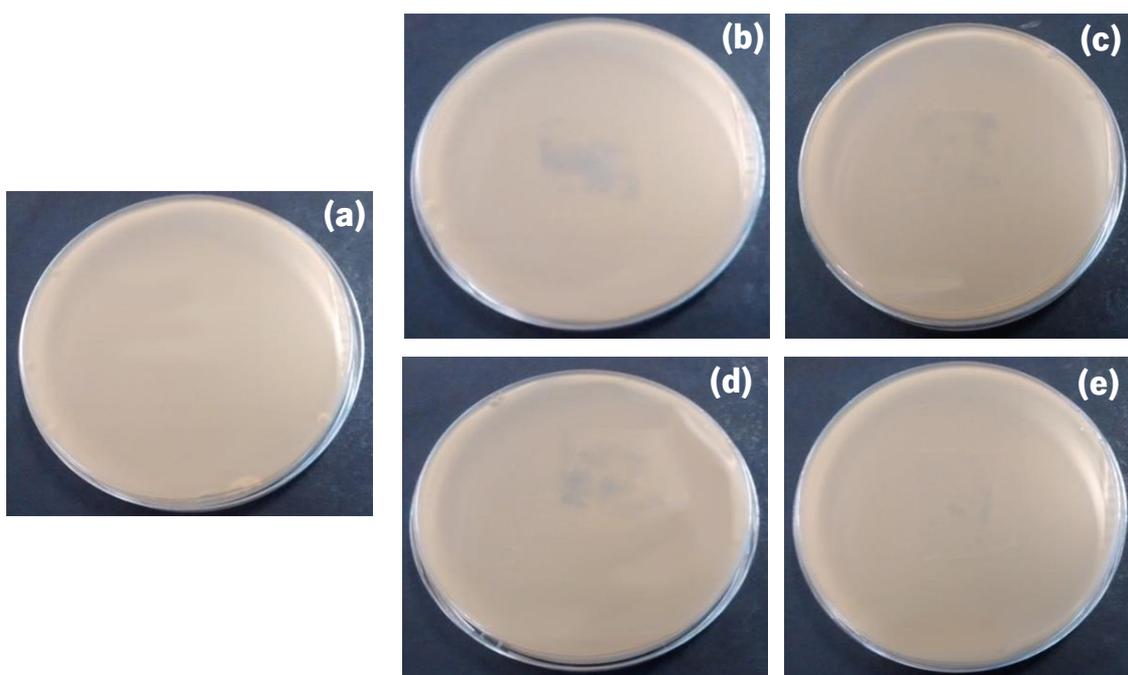


Figura 5.16. Amostras analisadas após as 20 lavagens pelo método qualitativo da norma JIS L 1902:2008.

Ensaio realizado usando *S. aureus* (a) controlo negativo; (b) Controlo positivo preparado por esgotamento; (c) Controlo positivo preparado por *pad-batch*; (d) NPPH3 preparado por esgotamento; (e) NPPH3 preparado por *pad-batch*.

Pelos resultados obtidos, presentes na Figura 5.16, foi possível verificar algumas zonas de inibição na amostra NPPH3 e, principalmente, no controlo positivo preparado por esgotamento. No entanto, comparando estes resultados com os obtidos na Figura 5.14 é possível verificar uma

diminuição significativa da zona de inibição e, assim, uma diminuição da atividade antimicrobiana que seria expectável tendo em conta os resultados obtidos para a quantificação de PH nos materiais têxteis funcionais após as lavagens. Ainda assim, seria expectável ter-se obtido uma zona de inibição maior para o método qualitativo relativamente à bactéria *S. aureus* para o controlo positivo preparado por esgotamento dado que a concentração de PH presente neste material têxtil é maior que a CMB da bactéria para o agente ativo. Este facto pode ser explicado por neste método (método qualitativo segundo a norma JIS L 1902:2008) não haver, por vezes, um contacto direto com a bactéria em todas as zonas da amostra.

Os resultados demonstrados, fotograficamente, para as amostras por *pad-batch* e esgotamento para *K. pneumoniae* são semelhantes aos de *S. aureus*, e portanto não foram aqui apresentados, apresentando-se assim na Tabela 5.8. a presença ou ausência de atividade antimicrobiana para ambas as bactérias e para todas as amostras testadas.

Tabela 5.8. Amostras NPPH3, controlo positivo e controlo negativo analisadas após as lavagens por JIS L 1902:2008 – Método qualitativo. Ensaio feito usando *S. aureus* e *K. pneumoniae*. (+) presença de atividade antimicrobiana; (-) ausência de atividade antimicrobiana.

Bactérias	Amostras					
	Esgotamento			<i>Pad-batch</i>		
	Controlo negativo	Controlo positivo	NPPH3	Controlo negativo	Controlo positivo	NPPH3
<i>S. aureus</i>	-	+	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	+	-	-	-	-

Pela análise dos resultados da Tabela 5.8. foi possível verificar que apenas para o controlo positivo, preparado por esgotamento, se verificou atividade antimicrobiana em algumas zonas da placa que, ainda assim, pela análise das placas, foi bastante inferior à que se verificou antes das lavagens. Para a amostra NPPH3 e para o controlo negativo verificou-se uma ausência de atividade antimicrobiana que é corroborada pela concentração de PH nestes tecidos se encontrar abaixo da CMB de ambas as bactérias (39 mg/L).

Para avaliar a atividade antimicrobiana das amostras após as 20 lavagens a nível quantitativo foi analisada a taxa de redução para as bactérias *S. aureus* e *K. pneumoniae* cujos resultados se encontram na Figura 5.17.

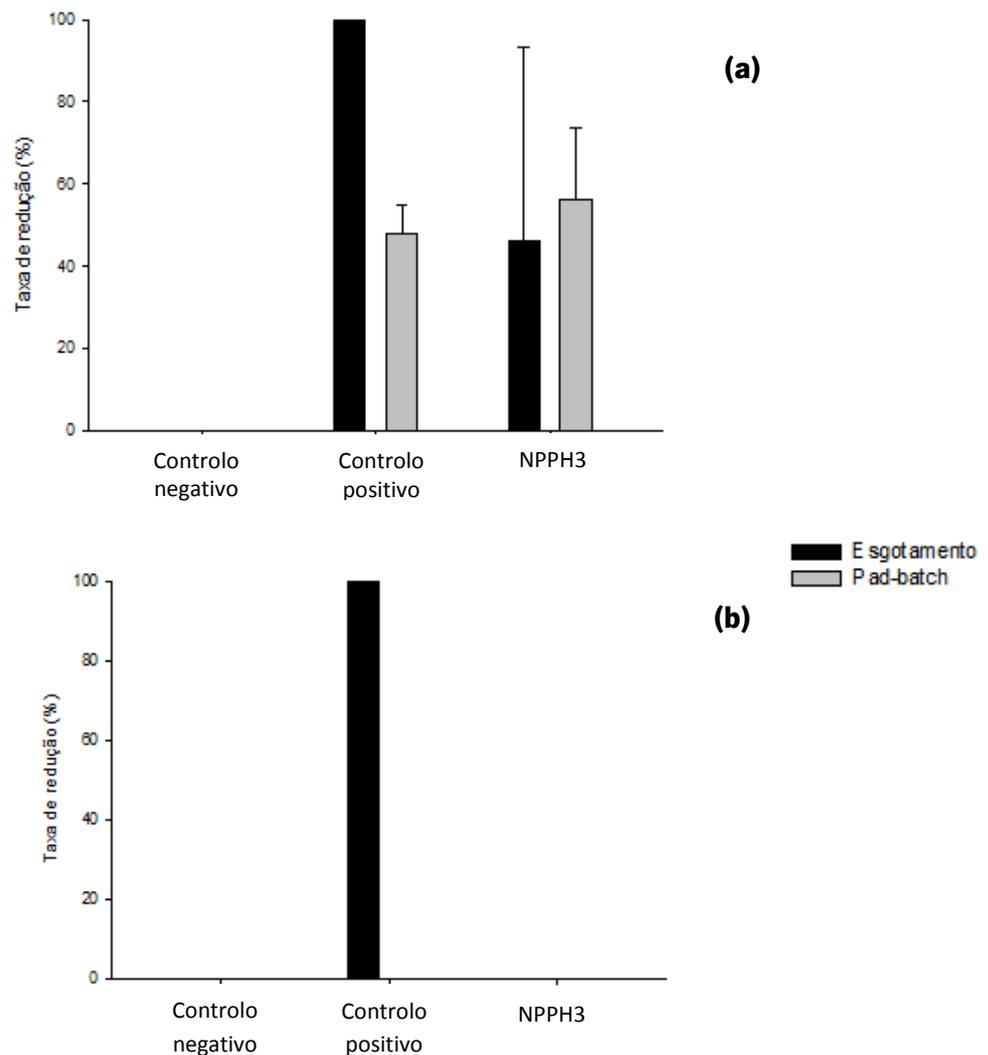


Figura 5.17. Taxa de redução (%) para (a) *K. pneumoniae* e (b) *S. aureus* obtida por JIS L 1902:2008 – método quantitativo para o controlo negativo 1, controlo positivo e NPPH3 após as lavagens.

Pela análise da Figura 5.17, foi possível verificar, para ambas as bactérias, uma diminuição da taxa de redução bacteriana da amostra NPPH3 após lavagens, preparada por esgotamento e *pad-batch*, bem como do controlo positivo preparado por *pad-batch*. Estes resultados permitiram averiguar que após vinte lavagens a eficácia das nanopartículas com PH nos materiais têxteis funcionais é bastante menor. Ainda assim, apesar do decréscimo esperado na taxa de redução, é possível verificar que as nanopartículas apresentam alguma durabilidade no material têxtil pelo menos até às vinte lavagens apesar da diminuição de concentração do agente ativo apresentando, ainda uma taxa de redução perto dos 50 % para *K. pneumoniae* (Ranganath, 2011). A existência de um desvião-padrão tão elevado para a amostra NPPH3, por esgotamento em relação a *K. pneumoniae*, pode ter sido devida a uma aplicação não uniforme do agente antimicrobiano no material têxtil ou a uma aplicação repetida do inóculo em alguns pontos da

amostra nos ensaios realizados com esta bactéria. Esta aplicação não uniforme do agente antimicrobiano no material têxtil ou a aplicação repetida do inóculo em alguns pontos do material têxtil pode também explicar o valor obtido para a taxa de redução bacteriana, e desvio-padrão correspondente, para o controlo positivo preparado por *pad-batch* para essa mesma bactéria. Para *S. aureus*, como esperado uma vez que a concentração de PH na amostra NPPH3 (aproximadamente de 25.65 mg/L para esgotamento e 17.34 mg/L para *pad-batch*) é menor que a CMI e a CMB (39 mg/L) da bactéria, o material têxtil funcional não teve nenhum efeito antimicrobiano, obtendo-se uma taxa de redução bacteriana de 0 %.

Para o controlo positivo, preparado por esgotamento, obteve-se uma taxa de redução bacteriana de 100% para ambas as bactérias ao contrário da amostra NPPH3 (preparada por ambos os métodos) e do controlo positivo preparado por *pad-batch*. Este valor de taxa de redução bacteriana é corroborado pelo valor obtido pela quantificação de PH nessa amostra (473.75 mg/L) que está acima da CMI e da CMB de ambas as bactérias.

Estes resultados, observados na Figura 5.16 e 5.17, podem ser corroborados com os obtidos pela quantificação do PH no material final, na Tabela 5.6, uma vez que a menor concentração de PH na amostra NPPH3, preparada por esgotamento e *pad-batch*, explica a minimização da taxa de redução e da zona de inibição.

Os valores obtidos das taxas de redução foram relacionados com o decréscimo na quantificação de PH nos banhos e no têxtil final. A partir da 15ª lavagem não se verificou quantificação de PH no banho de lavagem, após efectuar a diferença com a concentração de perborato de sódio usada inicialmente, para as amostras preparadas por *pad-batch*. Esse decréscimo na quantificação de PH foi também observado para as amostras preparadas por esgotamento onde se verificou um decréscimo na quantificação de PH da 15ª lavagem para a 20ª lavagem. Uma vez que se verificou um decréscimo na atividade antimicrobiana e tendo em conta os resultados obtidos na quantificação de PH para a amostra NPPH3 (por *pad-batch* e esgotamento), onde a concentração de PH foi abaixo da CMB para ambas as bactérias, não se justificou a realização de mais lavagens além das 20 que foram realizadas nas amostras referidas (controlo negativo, controlo positivo e NPPH3).

CAPÍTULO 6. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

O presente trabalho consistiu num estudo comparativo das propriedades antimicrobianas e durabilidade de ação de materiais têxteis funcionalizados com diferentes nanopartículas antimicrobianas.

Numa primeira fase foi feita a produção dos materiais têxteis funcionais com a fixação das nanopartículas funcionalizadas ao algodão com peróxido de hidrogénio (PH) ou ácido paracético (PAA) como agentes antimicrobianos. Estes acabamentos funcionais foram realizados por duas técnicas diferentes: esgotamento e *pad-batch*. Após a produção dos materiais têxteis funcionais foi possível verificar que estes apresentavam atividade antimicrobiana, antes das lavagens, contra bactérias gram-positiva e gram-negativa, *S. aureus* e *K. pneumoniae*, respetivamente, de acordo com a norma JIS L 1902:2008, comprovando a eficiência das nanopartículas com os agentes antimicrobianos. Além da verificação da atividade antimicrobiana, foi possível realizar a caracterização das nanopartículas por TEM e DLS, e dos materiais têxteis funcionalizados por FTIR e SEM. Por TEM e DLS foi possível analisar o tamanho das nanopartículas (≈ 190 nm) e o seu potencial ζ (≈ -40 mV), verificando-se que as mesmas são estáveis. Pelos dados obtidos por FTIR foi possível analisar as diferenças entre os espetros dos materiais têxteis com e sem funcionalização, onde se verificou, principalmente, o aumento de intensidade da banda correspondente aos grupos hidroxilo que se deveu à existência do PH nos mesmos. Por SEM, confirmou-se a presença das nanopartículas no algodão.

A seleção da amostra NPPH3, contendo nanopartículas funcionalizadas com PH, foi feita mediante a apresentação de maior atividade antimicrobiana bem como pela sua caracterização química. Além disso a quantificação do agente ativo comprovou uma maior presença deste.

Foi também possível concluir que ambos os métodos usados na incorporação dos agentes (esgotamento e *pad-batch*) permitiram ligar o agente ativo e as nanopartículas com o mesmo ao algodão. No entanto, constatou-se que os materiais têxteis funcionais preparados por esgotamento retiveram uma maior concentração do agente antimicrobiano.

Através de testes de resistência à lavagem foi possível verificar uma perda de atividade antimicrobiana após 20 lavagens na amostra NPPH3. Concluiu-se assim que as nanopartículas com o agente antimicrobiano iam sendo removidas da fibra a cada lavagem, verificando-se um

decréscimo da taxa de redução de 100 % para ambas as bactérias para aproximadamente 47 % e 0 %, para *K. pneumoniae* e *S. aureus* respectivamente, após o número de lavagens anteriormente referido. Este decréscimo na atividade antimicrobiana foi corroborado pela quantificação do agente ativo antes e depois das lavagens verificando-se uma menor quantidade do mesmo no substrato têxtil funcionalizado final.

Como perspectivas futuras, o trabalho desenvolvido no âmbito desta investigação permitiu antever a necessidade de aprofundar o estudo em vários pontos. Numa primeira etapa, e relacionado diretamente com o estudo, seria importante a realização do método quantitativo e qualitativo segundo a norma JIS L 1902:2008 em todas as lavagens realizadas aos materiais têxteis funcionais, de maneira a acrescentar informação ao trabalho realizado e permitir saber a partir de que lavagem os têxteis funcionalizados começaram a perder a sua função. Além disso, de maneira a perceber de que maneira ocorreu a remoção das nanopartículas com o agente antimicrobiano da fibra de algodão a cada lavagem, existiria a necessidade da realização da quantificação dos banhos finais em todas as lavagens. Ainda relacionado com a remoção das nanopartículas revelar-se-ia interessante utilizar a microscopia eletrónica de varrimento (SEM) de maneira a estudar a superfície do material têxtil funcional após as lavagens de maneira a verificar a libertação do agente antimicrobiano. Devido à dificuldade que se obteve a quantificar o PAA, tornar-se-ia necessária utilizar outro método como alternativa à sua quantificação como um método de microtitulação em placa. De maneira a utilizar um controlo negativo que seria adequado, igual em todos os ensaios e que permitisse validar todos os ensaios, seria recomendável utilizar em trabalhos futuros como base de todos os ensaios um tecido 100% algodão branqueado sem qualquer concentração de PH.

Noutro âmbito, poderá ser feito um estudo comparativo entre a durabilidade da atividade antimicrobiana do controlo positivo, onde o agente antimicrobiano estava diretamente presente no banho, e da amostra NPPH3. Para tal deviam ser preparadas as amostras (controlo positivo e amostra NPPH3) com concentrações iniciais iguais de agente antimicrobiano em ambas as amostras e realizarem-se os testes de resistência à lavagem. Além disso seria interessante estudar qual dos métodos de preparação dos materiais têxteis funcionais, esgotamento ou *pad-batch*, resiste melhor à lavagem de maneira também a otimizar as condições e variáveis em que estes foram preparados. Para tal, devem ser preparados materiais têxteis pelos dois métodos

referidos, esgotamento e *pad-batch*, com concentração inicial igual de agente antimicrobiano e fazer a análise dos mesmos por testes de resistência à lavagem.

BIBLIOGRAFIA

- Andrews, J. M. (2006). Determination of Minimum Inhibitory Concentrations Jennifer M Andrews. *Chapter under Review*, (March), 1–19.
- Assessment, E. R. (2005). Human & Environmental Risk Assessment on ingredients of household cleaning products Hydrogen Peroxide CAS No: 7722-84-1, (April), 1–13.
- Association, Japanese Standard. (2008). *JIS L 1902 - Testing for antibacterial activity and efficacy on textile products*.
- Baron, S. (1996). *Medical Microbiology*. Galveston.
- Bedê, P. M. (2010). Produção e caracterização de nanopartículas polimérico-magnéticas para aplicações biomédicas, 73.
- Bykov, I. (2008). Characterization of Natural and Technical Lignins using FTIR Spectroscopy. *Construction*, 43.
- Carvalho, A. de. (2013). Portugal Global, (60).
- Chemistry, Institute of. (2015). Consultado em 24/08/2015, disponível em <http://tera.chem.ut.ee>
- Coates, J. (2000). Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 10815–10837. <http://doi.org/10.1002/9780470027318>
- Davison, J., & Maillard, J. (2010). *Opinion on triclosan - Antimicrobial resistance. Scientific Committee on Consumer Safety SCCS*. <http://doi.org/10.2772/11162>
- Drosou, Anna. (2003). *Antiseptics on Wounds: An Area of Controversy*.
- Fate, E. (2010). HYDROGEN PEROXIDE , PERACETIC ACID AND SODIUM PERCARBONATE Table of Contents. *Environmental Protection*, (October).
- Fouda, M. M. G. (2011). Antibacterial Modification of Textiles Using Nanotechnology.

- Ghotaslou, R. (2012). Antimicrobial Activity of Chlorhexidine, Peracetic acid/ Peroxide hydrogen and Alcohol based compound on Isolated Bacteria in Madani Heart Hospital, Tabriz, Azerbaijan, Iran, *2*(1), 57–59. <http://doi.org/10.5681/apb.2012.008>
- Gordon, S. (2007). *Cotton: Science and Technology*. Inglaterra : WOODHEAD PUBLISHING LIMITED.
- Guerreiro-Tanomaru, J. M., Morgental, R. D., Faria-Junior, N. B., Berbert, F. L. C. V., & Tanomaru-Filho, M. (2011). Antibacterial effectiveness of peracetic acid and conventional endodontic irrigants. *Brazilian Dental Journal*, *22*(4), 285–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21861026>
- Hafner, B., & Hafner, B. (2007). Scanning Electron Microscopy Primer. *Cities*, 1–29.
- Hedetniemi. (2014). Consultado em 14/08/2015, disponível em <http://www.microbeLibrary.org>
- Joshi, M., Bhattacharyya, A., & Ali, S. W. (2008). Characterization techniques for nanotechnology applications in textiles, *33*(September), 304–317.
- Kan, C. W., Lam, Y. L., & Yuen, C. W. M. (2012). Microscopic study of cotton fibre subjected to different functional treatments, 1130–1136.
- Khartasia (2015). *Gossypium arboreum*. <http://khartasia-crcc.mnhn.fr/>. [Online].
- Kingzett, C. T. (1880) *Chem. News*, 41:76.
- Kiron, Mazharul Islam. 2012. *Textile Learner*. Consultado em 28/08/2015, disponível em <http://textilelearner.blogspot.pt/2012/03/what-is-spinning-types-of-spinning-dry.html>
- Kolthoff, I. M. (1920) *Chem Weekblad*, 17:197.
- LaMotte. (2015). Peracetic acid test kit, *1*(0715), 1–2.
- Mahmoud Abbas, A. O. (2010). Chitosan for biomedical applications, 1–329.
- Martins, P. M. A. (2011). Produção e caraterização de nanopartículas magnéticas para aplicação biotecnológica. Tese de Mestrado, Universidade do Minho: Guimarães, 92 pgs

- Matos, J. F. V. (2014). Desenvolvimento de materiais têxteis com propriedades antimicrobianas para revestimento de calçado. Tese de Mestrado, Universidade do Minho: Guimarães, 105 pgs
- Mazzola, P. G., Jozala, A. F., Novaes, L. C. D. L., Moriel, P., & Penna, T. C. V. (2009). Minimal inhibitory concentration (MIC) determination of disinfectant and/or sterilizing agents. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 45(2), 241–248. <http://doi.org/10.1590/S1984-82502009000200008>
- McKillop, A., & Sanderson, W. R. (1995). Sodium perborate and sodium percarbonate: Cheap, safe and versatile oxidising agents for organic synthesis, *51*(22), 6145–6166.
- Melro, L. S. da S. F. P. (2011). Desenvolvimento de nanomagnetogéis para aplicações biomédicas Liliana Sofia da Silva Ferreira Pinto Melro Desenvolvimento de nanomagnetogéis para aplicações biomédicas.
- Patzelt, A., Richter, H., Sterry, W., & Lademann, J. (2008). Safety aspects of skin penetration of nanoparticles in topically applied cosmetics / pharmaceuticals.
- 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>
- Purwar, R. (2004). *Recent Advances in Antimicrobial Treatments of Textiles*.
- Ranganath, A. S. (2011). *A comparative evaluation of antimicrobial properties and durability to laundering of selected antimicrobial agents on a hospital textile*.
- Raoult, Didier. (2013). *Clinical Microbiology and Infection*.
- Sartor, Marta. (2003). *DYNAMIC LIGHT SCATTERING to determine the radius of small beads in Brownian motion in a solution*. California.
- Schindler, W. D., & Hauser, P. J. (2004). *Chemical Finishing of Textiles*. <http://doi.org/10.1533/9781845690373>

- Schneider, R. (2008). Scanning Electron Microscopy Studies of Nafion Deformation into Silicon Micro- Trenches for Fuel Cell Applications.
- Schurman, J. J., Sumner, S. S., & Marcy, J. E. (2001). Antibacterial Activity of Hydrogen Peroxide Against Escherichia Coli O157:H7 and Salmonella spp. in Fruit Juices, Both Alone and in Combination with Organic Acids, 62.
- Service, P. H. (2002). Hydrogen Peroxide, (April), 1–2.
- Shahidi, S., & Wiener, J. (2012). Antibacterial Agents in Textile Industry. *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology* » “Antimicrobial Agents,” 387–406. <http://doi.org/10.5772/46246>
- Shaikh, T. N., & Agrawal, S. A. (2014). Qualitative and Quantitative Characterization of Textile Material by Fourier Transform. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology, Vol. 3, Issue 1, January 2014, Pp 8496- 8502, 3(1)*, 8496–8502.
- Silva, Priscilla L., Rodrigues, Fábio e A. El Seoud , Omar. (2015). *Why does cotton feel 'cool'?* .
- Silver, Daufon Nano. (2009). *Silver Nano Technology*.
- Soares, G., Vieira, R., Cardoso, I., Santos, J., Gomes, J. R., Lança, A., & Pereira, P. (2004). Studies of Durability and Effect on Material Properties of Different Antibacterial Products. *ATC'04 – 31st Aachen Textile Conference, November 24-25, 2004, (Mc)*.
- Vieira, R. (2006). Estudo da Eficiência e Durabilidade de Diversos Métodos de Fixação de Produtos Antimicrobianos em Fibras Celulósicas.
- Vital, T. M., Reis, C., García-Zapata, M. T. A., & Cunha, L. C. Da. (2004). Estudo comparativo de duas técnicas farmacopéicas de avaliação da atividade antimicrobiana dos fármacos: nistatina, eritromicina, neomicina e gentamicina. *RBCF, Rev. Bras. Ciênc. Farm. (Impr.)*, 40(2), 219–227. Retrieved from http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322004000200011&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt

- Vollath, D. (2013). Introduction to Nanoparticles and Nanomaterials. *Microwaves in Nanoparticle Synthesis, First Edition*, 1–24. Retrieved from <http://books.google.com.bd/books?id=4xoglwEACAAJ>
- Wakelyn, P. J. (1967). Quaternary ammonium salts as antistatic agents on polyacrylonitrile fibers, (June).
- Weiner, B. B., Tscharnuter, W. W., & Fairhurst, D. (1993). Zeta Potential: a new approach. *Canadian Mineral Analysts Meeting*, 12.
- Wiegand, Irith, Hilpert, Kai e Hancock, Robert. (2008). *Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances*. Canada
- 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>
- Xue-bing, Z., Ting, Z., Yu-jie, Z., & De-hua, L. I. U. (2008). Preparation of Peracetic Acid from Acetic Acid and Hydrogen Peroxide : Experimentation and Modeling. *The Chinese Journal of Process Engineering*, 8(1), 35–41. Retrieved from <http://www.jproeng.com/qikan/manage/wenzhang/207239.pdf>
- Yazdankhah, Siamak, et al. (2006). *Triclosan and Antimicrobial Resistance in Bacteria: An Overview*. Noruega.
- Yu, Wen-Liang. (2015). Microbiology and pathogenesis of Klebsiella pneumoniae infection. www.uptodate.com/.

ANEXOS

Anexo A – Composição dos meios de cultura e reagentes

Anexo B – Curvas de crescimento

Anexo A – Composição dos meios de cultura e reagentes

A1. Meio TSB

Tabela A1. Composição do meio TSB

Volume (mL)	TSB (g)	Água destilada (mL)
1000	30	1000

Esterilização em autoclave (121 °C, 20 min)

A2. Meio TSA

Tabela A2. Composição do meio TSA

Volume (mL)	TSA (g)	Agar (1,5 %) (g)	Água destilada (mL)
1000	30	15	1000

Esterilização em autoclave (121 °C, 20 min)

A3. Meio MHB

Tabela A3. Composição do meio MHB

Volume (mL)	MHB (g)			Água destilada (mL)
	Infusão de carne (g/L)	Caseína hidrolisada (g/L)	Amido (g/L)	
1000	2	1.5	7.5	1000
		23		

Esterilização em autoclave (121 °C, 20 min)

A4. Solução Soro fisiológico (*physiological saline*) – NaCl 0.85 % (w/v)

Tabela A4. Composição da solução soro fisiológico

Volume (mL)	NaCl (g)	Água destilada (mL)
1000	8.5	1000

Esterilização em autoclave (121 °C, 20 min)

A5. Solução Soro fisiológico para agitação (*Physiological saline for shake out*) – NaCl 0.85 % (w/v)

Tabela A5. Composição da solução Soro fisiológico para agitação

Volume (mL)	NaCl (g)	Tween 80 (g)	Água ultra pura(mL)
1000	8.5	2	1000

Esterilização em autoclave (121 °C, 20 min)

A6. Tampão fosfato-salino (*Phospate-buffered saline*) 0.1M pH 7,5 (PBS 1X)

Tabela A6. Composição da solução PBS

Volume (mL)	NaCl (g)	KCl (g)	K ₂ HPO ₄ (g)	NaHPO ₄ ·12H ₂ O	Água ultra pura (mL)
1000	8	0.2	0.2	2.85	1000

Ajuste do pH a 7.5 com HCl 37 %. Esterilização em autoclave (121 °C, 20 min)

Anexo B – Curvas de calibração

B1. Curva de calibração de *S. aureus*

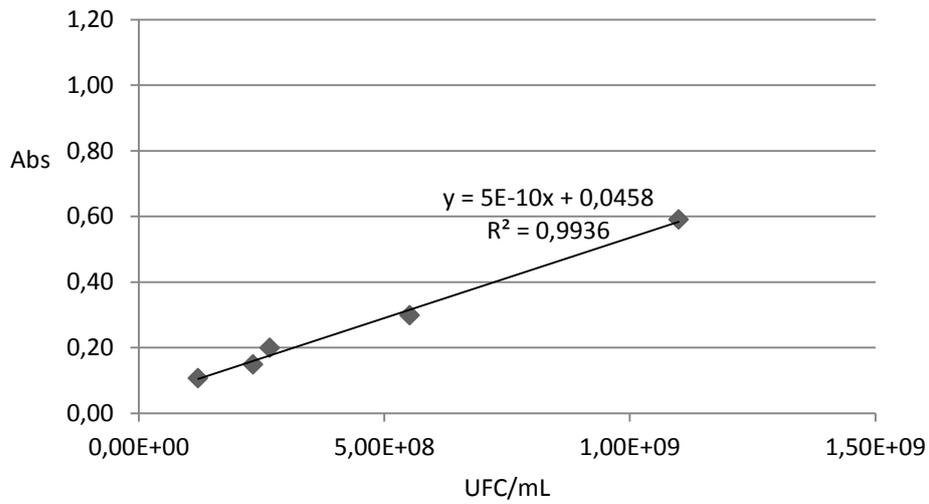


Figura B1. Curva de calibração de *S. aureus*.

B2. Curva de calibração de *K. pneumoniae*

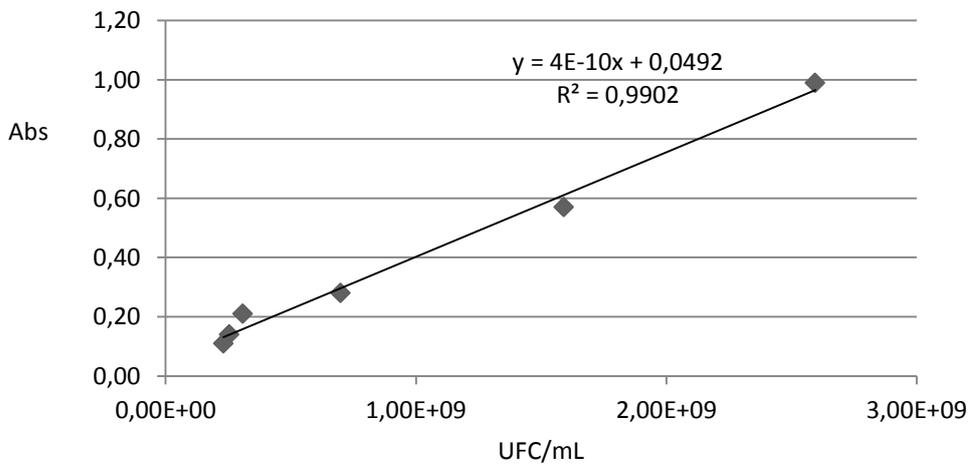


Figura B2. Curva de calibração de *K. pneumoniae*.