



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

Funcionalização bioativa de fibras celulósicas com aminoácidos e péptidos antimicrobianos

Joana Isabel Vaz

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Biotecnologia
(2º ciclo de estudos)

Orientadora: Prof. Doutora Isabel Cristina Aguiar de Sousa e Silva Gouveia

Covilhã, Outubro de 2013

Agradecimentos

Após a conclusão de mais uma etapa da minha vida académica, gostaria de expor o meu agradecimento a todos os que contribuíram de diferentes formas, para que esta se pudesse concluir da melhor forma possível.

Em primeiro lugar, agradeço à minha orientadora Professora Doutora Isabel Cristina Gouveia, pelo contributo ao desenvolvimento deste trabalho, pelo acompanhamento e disponibilidade, pela oportunidade e partilha de conhecimento.

Agradeço ao Centro de Ótica, em especial à Engenheira Ana Paula Gomes por toda a ajuda, disponibilidade e colaboração durante este trabalho.

Ao Departamento de Química e ao Departamento de Ciência e Tecnologia Têxteis, nomeadamente ao Assistente Técnico José António Machado pela ajuda em momentos fundamentais, com equipamentos e outras dúvidas de ordem diversa.

À Professora Doutora Luiza Granadeiro pelo apoio prestado durante os ensaios de citotoxicidade.

Agradeço à minha amiga e parceira de laboratório Cláudia Mouro por toda a ajuda e tempo concedido, por todos estes anos de amizade e companheirismo.

Aos meus colegas de laboratório, Marta Pedrosa o meu agradecimento pela atenção e apoio prestados em todas as dúvidas e também a pronta ajuda da Sílvia Araújo e do Frederico Nogueira em diversas situações.

A todos os meus colegas e amigos de vida académica que me ajudaram a chegar até aqui proporcionando alguns dos melhores momentos da minha vida.

Por fim, mas com especial importância, agradeço à minha família todo o incansável apoio que sempre me deram. Em particular, aos meus pais e às minhas irmãs que sempre vão ser o motor de toda a minha motivação.

Esta dissertação contou ainda com o apoio do projeto: PTDC/EBB-BIO/113671/2009 (FCOMP-01-0124-FEDER-014752), Skin2Tex.

O meu Muito Obrigada a todos!

Resumo

A Indústria têxtil tem vindo a evoluir e a envolver várias áreas que com ela podem progredir em diversos sentidos, focando o desenvolvimento de materiais têxteis multifuncionais com diversas aplicações. Os têxteis antimicrobianos surgem neste sentido, e a eles alia-se a Microbiologia, a Medicina e a Biotecnologia.

Estes tecidos bioativos surgem com o objetivo de incrementar um efeito antibacteriano seguro, duradouro e de largo espectro de ação. Sendo o algodão a fibra natural mais importante no que diz respeito à sua vasta aplicabilidade na área médica, a sua maior contrariedade está ligada à elevada retenção de humidade e consequente promoção do crescimento microbiano.

Os agentes antimicrobianos testados até aqui são vários e de diferentes origens, química ou natural. Com a sua vasta e repetitiva utilização, os microrganismos foram criando mecanismos de resistência, o que torna fundamental o desenvolvimento de novos agentes que inibam o seu crescimento.

Neste sentido e numa primeira fase, este estudo debruçou-se sobre a aplicação da L-Cisteína sobre o algodão, fibra maioritariamente constituída por celulose. A L-Cisteína foi covalentemente imobilizada no algodão, com funcionalização por esgotamento, recorrendo a diferentes condições processuais. A monitorização da imobilização da L-Cisteína foi efetuada recorrendo a análise SEM-EDS e FTIR-ATR. A sua atividade antimicrobiana foi testada contra *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*, a qual apresentou percentagens de redução iguais a 89% e 83%, respetivamente. O processo revelou-se, assim, eficaz e não apresentou citotoxicidade.

Numa segunda fase do estudo, a fibra de algodão foi novamente funcionalizada por esgotamento com um péptido antimicrobiano modificado, o Cys-LC-LL-37. Este péptido foi imobilizado na fibra, previamente ativada por dois métodos distintos (com CDI e com TEMPO). A pertinência da substituição da L-Cisteína pelo péptido deve-se às concentrações necessárias serem muito inferiores às solicitadas pelo aminoácido.

Aqui o objetivo não só era testar a eficácia antibacteriana do Cys-LC-LL-37, como verificar qual o melhor método de imobilização do péptido no algodão. As percentagens de redução bacteriana mais elevadas foram obtidas a 71% e 54%, para o radical TEMPO e para o composto orgânico CDI, respetivamente.

Os ensaios de citotoxicidade realizados para ambos os agentes antimicrobianos revelaram que nenhum implica perda de viabilidade das células em estudo, nas concentrações usadas.

Palavras-Chave

Algodão; Têxteis antimicrobianos; L-Cisteína; Cys-LC-LL-37; Funcionalização covalente; CDI; TEMPO; *Klebsiella pneumoniae*; *Staphylococcus aureus*

Abstract

The textile industry has developed and involves several areas with which it can progress in several directions, focusing on the development of multifunctional textile materials with many applications. The antimicrobial textiles arise in this way, and with them different areas such as Microbiology, Medicine and Biotechnology.

These bioactive textiles arise with the aim of increasing a safe, durable and broad spectrum of action and antibacterial effect. Being cotton the most important natural fibre with regard to its wide applicability in the medical area, its greater weakness is the high retention of moisture and consequent the promotion of microbial growth.

The antimicrobial agents tested so far are various and from different origins, chemical or natural. With its wide and repetitive use, the microorganisms were creating mechanisms of resistance, which amplifies the importance of developing new agents that inhibit their growth.

In this way and in a first phase, this study focused on the application of L-Cysteine on cotton fibre, mainly composed of cellulose. L-Cysteine was covalently immobilized on cotton, by exhaustion functionalization, using different test conditions. The monitoring of the immobilization of L-Cysteine was performed using SEM-EDS and FTIR-ATR analysis. The antimicrobial activity was tested against *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*, which showed reduction percentages of 89% and 83%, respectively. The method was successfully achieved without cytotoxicity.

In a second phase of the study cotton fibre was functionalized again by an exhaustion process with a modified antimicrobial peptide, Cys-LC-LL-37. This peptide was immobilized on the fibre, previously activated by two different methods (with CDI and TEMPO). The relevance of the substitution of L-Cysteine by a peptide is due to the much lower required concentrations than those required by the amino acid.

Here the aim was not only to test the antibacterial efficacy of Cys-LC-LL-37, but also to test what is the best method for immobilizing the peptide on cotton. The highest bacterial reduction percentages were obtained at 71% and 54% for the radical TEMPO and for the organic compound CDI, respectively.

The cytotoxicity assays performed for both antimicrobials, at the concentrations used showed no loss of viability of the cells involved in the studies.

Keywords

Cotton; Antimicrobial textiles; L-Cysteine; Cys-LC-LL-37; Covalent Functionalization; CDI; TEMPO; *Klebsiella pneumoniae*; *Staphylococcus aureus*

Índice

Lista de Figuras.....	viii
Lista de Tabelas	x
Lista de Acrónimos	xi
Contextualização e Estrutura da dissertação	1
Objetivos.....	3
Capítulo I - Revisão da literatura.....	4
1.1. Têxteis antimicrobianos	4
1.2. Agentes antimicrobianos.....	6
1.3. Algodão	10
1.3.1. Estrutura morfológica.....	10
1.3.2. Estrutura molecular.....	11
1.4. Funcionalização antimicrobiana do algodão.....	11
1.5. Aplicação da L-Cisteína como agente antimicrobiano.....	14
1.6. Péptidos antimicrobianos.....	16
1.6.1. Classificação.....	16
1.6.2. Mecanismos de ação	19
1.6.3. Cys-LC-LL-37.....	22
Capítulo II: Funcionalização Covalente do Algodão com L-Cisteína	24
2.1. Materiais e Equipamentos	25
2.2. Métodos.....	26
2.2.1. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC)	26
2.2.2. Ativação da Superfície do Algodão	27
2.2.3. Funcionalização do tecido	27
2.2.4. Avaliação da eficácia de funcionalização	28
2.2.4.1. Energia dispersiva de espectroscopia de raio-X (EDX).....	28
2.2.4.2. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR-ATR)	28
2.2.5. Avaliação da atividade antibacteriana	29
2.2.5.1. Teste de Difusão em Agar - Avaliação qualitativa	29
2.2.5.2. Teste de Suspensão - Avaliação quantitativa	30
2.2.6. Ensaio de Citotoxicidade.....	30
2.2.7. Microscopia eletrónica de varrimento (SEM)	31
2.3. Resultados e Discussão	32
2.3.1. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC)	32
2.3.2. Avaliação da eficácia da funcionalização	32

2.3.2.1.	Energia dispersiva de espectroscopia de raio-X (EDX).....	32
2.3.2.2.	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR-ATR) 33	
2.3.3.	Avaliação da eficácia antimicrobiana.....	35
2.3.3.1.	Teste de Suspensão - Avaliação quantitativa	35
2.3.3.2.	Teste de Difusão em Agar - Avaliação qualitativa	40
2.3.4.	Ensaio de Citotoxicidade.....	41
2.3.5.	Microscopia eletrónica de varrimento (SEM)	42
2.3.6.	Discussão Geral	43
2.4.	Conclusões	44
	Capítulo III - Funcionalização do algodão com Cys-LC-LL-37	45
3.1.	Materiais e Equipamentos	46
3.2.	Métodos	47
3.2.1.	Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC)	47
3.2.2.	Ativação da Superfície do Algodão	48
3.2.2.1.	Ativação da Superfície do algodão CDI - 4% (m/V).....	48
3.2.2.2.	Ativação da superfície do algodão com TEMPO.....	48
3.2.3.	Funcionalização do Algodão	49
3.2.4.	Avaliação da eficácia de Funcionalização.....	49
3.2.4.1.	Ensaio colorimétrico do Reagente de Bradford na superfície têxtil	49
3.2.5.	Avaliação da Atividade Antibacteriana	50
3.2.6.	Ensaio de Citotoxicidade.....	50
3.2.7.	Microscopia eletrónica de varrimento (SEM)	51
3.3.	Resultados e Discussão	52
3.3.1.	Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC)	52
3.3.2.	Avaliação da eficácia de Funcionalização.....	52
3.3.2.1.	Ensaio colorimétrico do Reagente de Bradford.....	53
3.3.3.	Avaliação da Atividade Antibacteriana	54
3.3.3.1.	Teste de Suspensão - Avaliação quantitativa	54
3.3.3.2.	Teste de Difusão em Agar - Avaliação qualitativa	57
3.3.4.	Ensaio de Citotoxicidade.....	60
3.3.5.	Microscopia eletrónica de varrimento (SEM)	62
3.4.	Conclusões	63
	Capítulo IV - Conclusões Finais.....	65
	Capítulo V - Perspetivas Futuras	67
	Capítulo VI - Referências	68
	Capítulo VII - Anexos	75

Lista de Figuras

Capítulo I

Figura 1.1 - Diferentes mecanismos antibacterianos exercidos pelos diversos agentes.....	5
Figura 1.2 - Estrutura hierárquica da celulose no algodão. C - Cutícula; L - Lúmen; P - Parede celular primária; S1 e S2 - Parede celular secundária.	10
Figura 1.3 - Fórmula estrutural da celulose.....	11
Figura 1.4 - Estrutura química da L-Cisteína.....	14
Figura 1.5 - Reação de Oxidação-Redução entre duas moléculas de Cisteína, com formação de Cistina por ligações dissulfureto (S-S).	15
Figura 1.6 - Interação dos péptidos antimicrobianos (cilindros vermelhos) com a membrana celular dos microrganismos. Péptidos associados à superfície membranar (A) Péptidos incorporados abaixo da interface aquosa (B).	20
Figura 1.7 - Modelos de formação de canais transmembranares. Modelo “Barrel-Stave” (A) Modelo Toroidal (B).	20
Figura 1.8 - Modelos de ruptura da membrana celular. Modelo da Carpete, por associação contínua de péptidos aos fosfolípidos que compõem a membrana, com eventual cobertura total da mesma (A) Modelo de desintegração detergente (B).	21

Capítulo II

Figura 2.1 - Esquema representativo da ativação dos grupos hidroxilo (-OH) da celulose por parte do 1,1 - Carbonildiimidazole (CDI).	24
Figura 2.2 - Espectro FTIR-ATR do algodão não modificado.	34
Figura 2.3 - Espectros FTIR-ATR das amostras de algodão modificado, com as diferentes concentrações de ativador a (A) 5 e (B) 7,5% (m/m) de L-Cisteína.	34
Figura 2.4 - Gráficos relativos à % Redução do crescimento microbiano para <i>K. pneumoniae</i> e <i>S. aureus</i> (A e B, respetivamente), às 0h - todos estes valores são obtidos por comparação com o algodão não modificado.	38
Figura 2.5 - Gráficos relativos à % Redução do crescimento microbiano para <i>K. pneumoniae</i> e <i>S. aureus</i> (A e B, respetivamente), às 24h - todos estes valores são obtidos por comparação com o algodão não modificado.	38
Figura 2.6 - Ensaio difusão em agar: efeito inibitório do algodão não funcionalizado, e das amostras funcionalizadas com 5% e 7,5% (m/m) L-Cisteína e ativadas com 4% (m/V) CDI, contra <i>S. aureus</i> e <i>K. pneumoniae</i> , após 18h de incubação.	40
Figura 2.7 - Imagens SEM do algodão, nas respetivas condições, ampliação de 800×.	42

Capítulo III

Figura 3.1 - Estrutura química do radical 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxi (TEMPO).	45
Figura 3.2 - Reações da celulose sob ação do radical TEMPO.	45

Figura 3.3 - Gráficos relativos à % Redução do crescimento microbiano para <i>K. pneumoniae</i> e <i>S. aureus</i> (A e B, respetivamente), às 0h e 24h - todos estes valores são obtidos por comparação com o algodão não modificado.	55
Figura 3.4 - Ensaio de difusão em agar: efeito inibitório do algodão não funcionalizado, da amostra apenas funcionalizada com Cys-LC-LL-37 e das amostras funcionalizadas com Cys-LC-LL-37 e ativadas com 4% (m/V) CDI e TEMPO, contra <i>S.aureus</i> , após 18h de incubação.	58
Figura 3.5 - Ensaio de difusão em agar: efeito inibitório do algodão não funcionalizado, da amostra apenas funcionalizada com Cys-LC-LL-37 e das amostras funcionalizadas com Cys-LC-LL-37 e ativadas com 4% (m/V) CDI e TEMPO, contra <i>K. pneumoniae</i> , após 18h de incubação.	59
Figura 3.6 - Viabilidade dos fibroblastos relativamente ao controlo, expostas a 2,00, 5,00 e 10,00µg/mL de Cys-LC-LL-37.	61
Figura 3.7 - Imagens SEM do algodão, nas respetivas condições, ampliação de 800×.	62

Lista de Tabelas

Capítulo I

Tabela 1.1 - Aplicações antimicrobianas sobre o algodão.....	12
Tabela 1.2 - Características estruturais dos péptidos LL-37 e Cys-LC-LL-37.	22

Capítulo II

Tabela 2.1 - Reagentes utilizados na funcionalização do algodão com L-Cisteína.....	25
Tabela 2.2 - Equipamentos utilizados na funcionalização do algodão com L-Cisteína.	26
Tabela 2.3 - Energia dispersiva de espectroscopia de raio-X (EDX). Percentagem atômica dos diferentes componentes presentes nas amostras têxteis funcionalizadas com 5% (m/m) L-Cisteína.....	32
Tabela 2.4 - Energia dispersiva de espectroscopia de raio-X (EDX). Percentagem atômica dos diferentes componentes presentes nas amostras têxteis funcionalizadas com 7,5% (m/m) L-Cisteína. .	33
Tabelas 2.5 - Teste de Suspensão para <i>S. aureus</i> às 0h, em CFU/mL e respetiva % de Redução.	36
Tabelas 2.6 - Teste de Suspensão para <i>S. aureus</i> às 24h, em CFU/mL e respetiva % de Redução.	36
Tabelas 2.7 - Teste de Suspensão para <i>K. pneumoniae</i> às 0h, em CFU/mL e respetiva % de Redução.	37
Tabelas 2.8 - Teste de Suspensão para <i>K. pneumoniae</i> às 24h, em CFU/mL e respetiva % de Redução.	37
Tabela 2.9 - Resultados do ensaio de citotoxicidade para a amostra de algodão funcionalizada com 5% (m/m) L-Cisteína.....	41

Capítulo III

Tabela 3.1 - Reagentes utilizados na funcionalização do algodão com Cys-LC-LL-37.	46
Tabela 3.2 - Reagentes utilizados na funcionalização do algodão com Cys-LC-LL-37.	47
Tabela 3.3 - Ensaio colorimétrico do Reagente de Bradford aplicado na amostra. Valores correspondentes à % Reflectância e K/S das diferentes condições e respetivo controlos.	53
Tabela 3.4 - Teste de Suspensão para <i>S. aureus</i> às 0h, em CFU/mL e respetiva % de Redução.	54
Tabela 3.5 - Teste de Suspensão para <i>S. aureus</i> às 24h, em CFU/mL e respetiva % de Redução.	55
Tabela 3.6 - Teste de Suspensão para <i>K. pneumoniae</i> às 0h, em CFU/mL e respetiva % de Redução. .	55
Tabela 3.7 - Teste de Suspensão para <i>K. pneumoniae</i> às 24h, em CFU/mL e respetiva % de Redução.	55
Tabela 3.8 - Resultados obtidos na determinação do efeito citotóxico do péptido Cys-LC-LL-37 em contacto com fibroblastos.	60

Lista de Acrónimos

Ag ⁺	Iões prata
AgCl	Cloreto de prata
AgNPs	Nanopartículas de prata
AMPs	Péptidos antimicrobianos
ATP	Adenosina trifosfato
BCA	Ácido bicinconínico
Ca ²⁺	Iões Cálcio
CAMPs	Catelicidinas
CDI	1,1 - Carbonildiimidazole
CDs	Ciclodextrinas
CFU	Unidades Formadoras de Colónias
CO ₂	Dióxido de carbono
Da	Dalton
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDX	Energia dispersiva de espectroscopia de raio-X
FBS	Soro fetal bovino
FTIR-ATR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
% I.C.	Porcentagem de Inibição do Crescimento
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Mg ²⁺	Iões magnésio
MHB	<i>Mueller Hinton Broth</i>
MIC	Concentração Mínima Inibitória
MTT	3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NA	<i>Nutrient Agar</i>
NaBr	Brometo de sódio
NaOCl	Hipóclorito de sódio
NB	<i>Nutrient Broth</i>
NH ₂	Grupo amina
N-halaminas	Compostos aminas halogenadas
NHDF	Fibroblastos dérmicos humanos normais
-OH	Grupos hidroxilo
PHMB	Poliexametileno Biguanida

QACs	Compostos Quaternários de Amônio
% R	Percentagem de Redução Bacteriana
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Derivados reativos do oxigênio
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SEM	Espectroscopia eletrônica de varrimento
-SH	Grupos tiol
TEMPO	Radical 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxi
THF	Tetrahidrofurano Anidro
TiO ₂	Dióxido de titânio

Contextualização e Estrutura da dissertação

A indústria têxtil é uma área de origem ancestral, que tem vindo a progredir gradualmente, por forma a corresponder positivamente às necessidades cada vez mais exigentes dos seus consumidores. Os novos produtos desenvolvidos apresentam características cada vez mais inovadoras, cujo acabamento depende da área na qual o produto será aplicado, quer ao nível da alteração superficial das propriedades dos materiais quer ao nível da modificação química do próprio substrato têxtil.

Reconhecendo a Biotecnologia como uma área multifuncional e de extrema importância futura, nada mais natural do que aliar estes dois importantes campos de conhecimento e conjugar o que cada uma delas tem para oferecer de modo a proporcionar produtos que assegurem serviços e necessidades emergentes.

Foi neste contexto que surgiu um novo campo científico relacionado com os têxteis biofuncionais. Este tem vindo a evoluir através da necessidade de criar materiais biologicamente funcionais adaptados às necessidades e sector de aplicabilidade. Uma porção destes têxteis é hoje tratada com agentes antimicrobianos que previnem ou inibem o crescimento de microrganismos. Estes agentes são concebidos com o objetivo de proteger tanto o têxtil do crescimento microbiano como o utilizador contra microrganismos patogénicos.

A presente investigação surge neste mesmo sentido: testar o efeito antimicrobiano, duradouro, estável e seguro de determinados agentes selecionados aplicados em algodão. A seleção do algodão é justificada tendo em conta a sua vasta utilização e contacto direto com a pele quando aplicado na indústria do vestuário e em dispositivos médicos de base têxtil.

Num primeiro capítulo é apresentada uma revisão da literatura, que inclui parâmetros relevantes em relação ao desenvolvimento do trabalho, tais como a importância e aplicações mais marcantes dos têxteis antimicrobianos, como são testados e o que implica a sua utilização. São apresentadas também diversas aplicações antimicrobianas efetuadas no algodão, bem como a estrutura e principais características químicas e morfológicas desta fibra natural. Além destes parâmetros, são ainda abordados os agentes envolvidos nesta investigação, ou seja a L-Cisteína e péptidos antimicrobianos, com respetiva classificação e mecanismos de ação. Mais concretamente é também mencionado o péptido em estudo, Cys-LC-LL-37.

O segundo capítulo envolve então a aplicação covalente da L-Cisteína, um aminoácido não-essencial, ao algodão através de uma técnica por esgotamento e mediante a prévia e oportuna ativação da superfície da mesma com um agente modificador da celulose - 1,1-Carbonildiimidazol (CDI). A L-Cisteína foi aplicada em diferentes condições, testada e comprovada a sua presença e finalmente quantificada a sua atividade antimicrobiana.

Finalmente no terceiro capítulo, mediante as condições mais favoráveis de funcionalização e ação antimicrobiana da L-Cisteína, adveio uma fase seguinte na qual se recorreu ao uso de

um péptido com propriedades antimicrobianas previamente selecionado, o Cys-LC-LL-37. Esta aplicação é perfeitamente adequada, uma vez que uma das grandes vantagens dos péptidos antimicrobianos se prende com o facto de desempenharem efeito inibitório do crescimento de microrganismos em concentrações muito inferiores relativamente a outros agentes. Além disso, a presença do resíduo de Cisteína mostra-se oportuna, uma vez que o processo de ativação e posterior funcionalização do tecido pode seguir o mesmo procedimento. Para além do referido, nesta etapa de trabalho ainda se comparou a ativação do tecido com CDI com outro método que envolve o radical 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxi (TEMPO) como agente ativador. Assim, foi possível verificar não só a eficácia antibacteriana do péptido em uso, mas também qual o método de imobilização mais eficaz. Testou-se e comprovou-se a presença do péptido no tecido e quantificou-se a sua atividade antimicrobiana.

Uma vez que os materiais com propriedades antimicrobianas têm por objetivo a sua implementação em sectores cujos produtos entram em contacto íntimo com o ser humano é fundamental que a sua segurança e total ausência de efeito tóxicos seja comprovada. Desta forma, qualquer um dos agentes em estudo foi submetido na primeira fase de investigação a um estudo acerca da Concentração Mínima Inibitória (MIC) a que o mesmo atua, assim como a ensaios de citotoxicidade, com o objetivo de testar a segurança do agente aplicado. Além disto, foi ainda verificada a possível ação de deterioração de ambos os agentes sobre o tecido, uma vez que manter as propriedades inerentes ao algodão é de elevada importância para o sucesso do procedimento. Todas as etapas de qualquer ensaio antimicrobiano, bem como a escolha dos microrganismos foram realizadas segundo a norma apropriada a aplicações em fibras têxteis - Norma JIS L 1902:2002.

Esta investigação é ainda composta por um capítulo destinado às conclusões finais acerca de todo o trabalho envolvido, bem como um outro composto por perspectivas futuras em relação ao possível desenvolvimento deste estudo.

Integrar diferentes áreas de investigação, cujos objetivos e expectativas continuam em constante desenvolvimento pode ser fulcral para o desenvolvimento destas fibras têxteis bioativas. Muito se tem feito neste sector, porém o desenvolvimento de novas resistências bacterianas e alguns efeitos desfavoráveis à saúde humana, são algumas das razões que têm vindo a impedir a implementação de muitos dos agentes antimicrobianos.

Neste sentido a procura persiste e assim surge também este trabalho investigativo com o objetivo de contribuir com novas soluções de aplicação de matérias promissoras no tratamento antimicrobiano de fibras têxteis, neste caso o algodão.

Objetivos

A presente investigação realizada no âmbito do tema “Funcionalização bioativa de fibras celulósicas com aminoácidos e péptidos antimicrobianos” tem como principal objetivo investigar e testar a eficácia antimicrobiana de agentes de origem natural quando imobilizados covalentemente em fibras têxteis celulósicas, nomeadamente o algodão.

Assim, é objetivo deste estudo testar a aplicação de L-Cisteína e AMPs (Cys-LC-LL-37) a fibras de algodão, por serem constituintes naturais de qualquer organismo vivo que, como já provado em estudos anteriores, desempenham efeito antimicrobiano quando em contacto com determinados microrganismos.

Além disso, para imobilizar a L-Cisteína e o AMP (Cys-LC-LL-37) na superfície do algodão pretende-se testar métodos de ativação da superfície têxtil para tornar o processo viável, e cuja eficácia antimicrobiana seja mais durável.

Como objetivos ainda mais específicos, pretende-se:

- Avaliar a eficácia dos tratamentos de ativação da superfície celulósica do algodão, para posterior imobilização dos agentes, quer com o composto CDI somente para a L-Cisteína, quer para o composto CDI e o radical TEMPO para a imobilização do AMP;
- Avaliar a eficácia antimicrobiana da L-Cisteína e do Cys-LC-LL-37, quando imobilizados no algodão;
- Avaliar os efeitos citotóxicos dos agentes antimicrobianos quando em contacto com células humanas;
- Avaliar o efeito do tratamento sobre a estrutura morfológica do algodão.

Capítulo I - Revisão da literatura

1.1. Têxteis antimicrobianos

As fibras têxteis são, hoje em dia, usadas em todo o mundo com diferentes finalidades. As suas propriedades intrínsecas promovem o crescimento de microrganismos, o que pode acarretar uma série de efeitos indesejáveis no próprio material têxtil como a formação de odores desagradáveis, manchas ou descoloração dos tecidos e ainda a perda das suas propriedades funcionais, mas também no próprio utilizador [1]. Estes microrganismos encontram-se em qualquer lugar e podem multiplicar-se sob requisitos básicos de humidade, nutrientes e temperatura. As proteínas nas fibras queratinóceas e os carboidratos no algodão podem agir como nutrientes e fontes de energia sob certas condições. Assim, a maioria das fibras sintéticas mostra-se mais resistente a ataques de microrganismos relativamente às fibras naturais, devido também à sua elevada hidrofobicidade. Esta realidade tem promovido uma ligação cada vez mais acentuada entre o sector têxtil e a microbiologia, também de forma a conseguir ultrapassar adversidades relativamente às fibras naturais [2].

Desta forma, surgem os têxteis antimicrobianos, cujas funcionalidades melhoradas apresentam uma grande variedade de aplicações em produtos de higiene e saúde, atuando como materiais de controlo e barreira a infeções [3].

O termo "antimicrobiano" abrange uma ampla variedade de tecnologias que proporcionam vários graus de proteção contra microrganismos aos materiais têxteis. Os antimicrobianos diferem na sua natureza química, modo de ação e interação com os microrganismos, impacto sobre as pessoas e o meio ambiente, durabilidade, custos e conformidade regulamentar.

A finalidade de conferir atividade antimicrobiana aos têxteis é a de proteger o material de ataques microbianos, prevenir a transmissão e propagação de microrganismos patogénicos, inibir o desenvolvimento de odores resultantes da degradação microbiana, e finalmente a criação de um material que atue como um tratamento preventivo e/ou curativo. Tratando-se de aplicações de extrema importância, os tratamentos antimicrobianos ideais de um material têxtil devem satisfazer diversos requisitos, tais como [1], [2] e [4]:

- Inibição eficaz contra um largo espectro de espécies bacterianas e fúngicas;
- Não-toxicidade para o consumidor, fabricante e meio ambiente. Por conseguinte, os têxteis tratados devem cumprir determinadas normas em testes de compatibilidade (citotoxicidade, irritação e sensibilidade) antes da sua comercialização;
- Resistência e durabilidade, a qual é fundamental para assegurar que o têxtil tratado mantém a sua performance durante o seu ciclo de vida, uma vez que a perda progressiva do antimicrobiano pode levar a que sua concentração caia até valores nos quais o têxtil deixa de cumprir a sua função de forma fiável;

- Compatibilidade com outros processos de acabamento e com os microrganismos residentes da pele, uma vez que são responsáveis por criar um ambiente desfavorável ao crescimento de bactérias patogênicas;

- Prevenção contra irritações e alergias;
- Aplicabilidade sem efeitos adversos sobre a qualidade ou a aparência do têxtil.

Para além dos requisitos a que estes tratamentos devem obedecer é ainda importante ter em conta os fatores que podem influenciar o desempenho destas substâncias. É o caso da concentração de aplicação, a qual depende ainda do tipo de agente, da finalidade do produto tratado, da construção do tecido, do procedimento de aplicação e da sua estabilidade durante o uso (durabilidade), para exercer o efeito desejado [1].

Desta forma, o acesso à segurança destes produtos é estritamente regulado, de modo a garantir o uso seguro destes produtos, sendo também uma área de investigação em crescente progresso [1] e [4].

Uma vez que a atividade dos agentes antimicrobianos varia, estes podem ter um efeito biostático, ou seja, inibir o crescimento dos microrganismos alvo, ou podem mesmo causar a sua morte apresentando atividade biocida [1], [4] e [5].

Estes agentes têm sido usados há séculos, principalmente como agentes conservantes para a água e produtos alimentares. Existem vários com propriedades antimicrobianas (por exemplo, vinagre, o vinho, o mel e cloreto de mercúrio), que durante muito tempo foram utilizados em pensos para feridas [6].

Compreender os mecanismos de ação de um biocida tornou-se uma questão importante, pois pode auxiliar na projeção de formulações antimicrobianas com uma eficácia melhorada e na garantia da prevenção do surgimento de resistências bacterianas [5].

Os mecanismos através dos quais as substâncias antimicrobianas controlam o crescimento dos microrganismos são extremamente variados e dependem do tipo de agente utilizado. Estes agentes antimicrobianos podem interagir diretamente com as células microbianas, rompendo/penetrando as suas membranas, ou oxidando os componentes celulares, ou indiretamente através da sintetização de produtos secundários (como por exemplo derivados reativos do oxigénio (ROS) ou iões metálicos pesados dissolvidos) que causam a morte da célula, Figura 1.1.

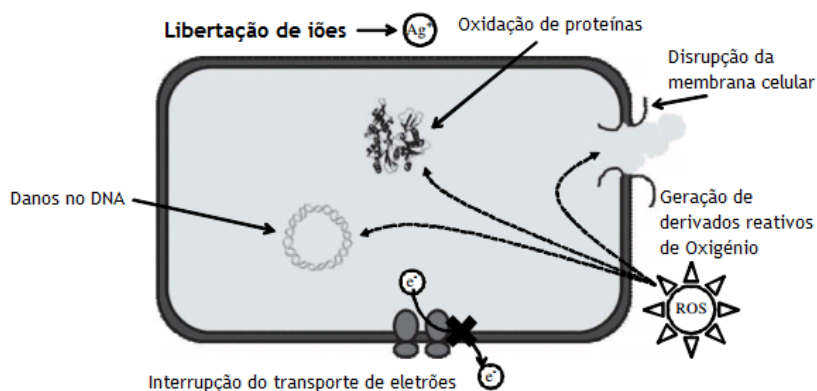


Figura 1.1 - Diferentes mecanismos antibacterianos exercidos pelos diversos agentes (adaptado de [7]).

Quando imobilizados em têxteis estes agentes antimicrobianos podem atuar sob condições diferentes, conforme o processo de ligação à fibra têxtil:

a) Por contacto, onde as substâncias antimicrobianas estão constantemente ligadas à fibra e é aqui que exercem a sua atividade. Estes antimicrobianos encontram-se quimicamente ligados à fibra e tornam a probabilidade de desenvolvimento de resistências menos provável, além de demonstrarem elevada resistência às lavagens, dependendo do material têxtil onde são imobilizados. A principal desvantagem deste tipo de processo é que, ligando os agentes ativos às fibras, as ligações químicas formadas entre os grupos funcionais resulta no bloqueio dos referidos grupos funcionais responsáveis pela eficácia antimicrobiana. Portanto, a atividade antimicrobiana tende a diminuir [4] e [2].

b) Por difusão, onde o agente é libertado gradualmente da superfície da fibra (mecanismo de libertação controlada). A principal vantagem deste mecanismo é que estes agentes antimicrobianos são eficazes sobre microrganismos presentes não só na superfície têxtil, mas também sobre aqueles presentes no ambiente envolvente. No entanto, são agentes mais propícios a permitirem o desenvolvimento de mecanismos de resistência por parte dos microrganismos. Além disso, a libertação do agente pode provocar graves problemas de saúde, uma vez que o agente pode interferir com a microflora residente na pele, causando erupções cutâneas, irritação da pele e alergias, ou mesmo conduzir ao crescimento autónomo de bactérias patogénicas [4] e [2].

1.2. Agentes antimicrobianos

Dentro dos diversos mecanismos de ação, são utilizados diferentes compostos para proporcionar atividade antimicrobiana aos têxteis, desde compostos sintéticos orgânicos, compostos quaternários de amónio (QACs), Poli-biguanidas, N-halaminas, até metais e sais metálicos tais como a prata e antimicrobianos naturais como o quitosano [1]. Alguns deles, juntamente com uma pequena demonstração do seu mecanismo de ação, estão apresentados no seguimento deste capítulo.

Prata e Nanopartículas de Prata

Dentro dos metais pesados tóxicos a prata é, em geral, o metal mais amplamente utilizado na indústria têxtil. Pode ser usada para reduzir infeções no tratamento de queimaduras, e para prevenir a colonização bacteriana em dispositivos médicos, bem como em outros tecidos. Estes eliminam os microrganismos, ligando-se a proteínas intracelulares e inativando-as [2].

A prata como agente biocida inclui diferentes formas que atuam como fontes de íões de prata (Ag^+), os quais proporcionam o efeito antimicrobiano, sendo os sais de prata a forma mais aplicada na indústria têxtil [1].

Atualmente muitos investigadores têm focado as propriedades antimicrobianas e multifuncionais das nanopartículas de prata, tendo sido aplicados diversos processos de produção de nano-prata. As nanopartículas de prata não são tóxicas, dependendo da concentração usada, e a sua utilização permite aumentar o número de partículas por unidade de área e consequentemente maximizar os seus efeitos antibacterianos [8].

Normalmente o mecanismo de ação deste metal está associado à difusão dos íões de prata pela membrana celular e posterior ligação aos grupos tiol (-SH) das enzimas celulares. A resultante redução da atividade enzimática faz com que o metabolismo do microrganismo se altere completamente e o seu crescimento seja inibido, até que ocorra a morte da célula. Quanto às nanopartículas de prata, o seu mecanismo de ação também tem sido associado à formação de radicais livres e consequentes danos induzidos na membrana celular [4] e [8].

Compostos Quaternários de Amónio (QACs)

Os QACs com cadeias alquil longas são utilizados na indústria têxtil como biocidas e também como agentes auxiliares em diferentes fases do processo de fabrico têxtil. A sua função antimicrobiana resulta das interações atrativas entre o grupo de amónio catiónico do QAC e a membrana da célula microbiana carregada negativamente. Esta interação provoca a interrupção de todas as funções essenciais da membrana da célula e, consequentemente, a interrupção da atividade proteica. Estes compostos podem ainda afetar a capacidade de multiplicação do DNA bacteriano [4]. Durante a inativação de células bacterianas, o grupo de amónio quaternário permanece intacto e mantém a sua capacidade antimicrobiana, enquanto o composto está ligado ao material têxtil. No entanto, após lavagem a durabilidade das funções antimicrobianas sobre tecidos de algodão acabados é ainda muito baixa devido à fácil dissociação das interações iónicas em água [1].

Poliexametileno Biguanida (PHMB)

PHMB é um biocida usado em diversas aplicações, composto por uma mistura heterodispersa de biguanidas de poli-hexametileno. Sendo um agente potente e de amplo espectro bactericida, com baixa toxicidade, este tem sido usado na indústria alimentar e em ambiente hospitalar, na forma de agente antisséptico e ainda em produtos de higiene, cosmética e cuidado pessoal, como lentes de contacto [1].

O PHMB atua comprometendo a integridade da membrana celular, e a sua atividade aumenta, com base no aumento do nível de polimerização. Este agente antimicrobiano é já utilizado em pensos para feridas, cuja comercialização já é efetuada [2].

Triclosano

O triclosano (éter 2,4,4'-triclóro-2'-hidroxidifenílico) é um agente antimicrobiano de amplo espectro, que tem sido aplicado numa vasta variedade de produtos de higiene como um agente antimicrobiano e conservante, mas apenas 5% é usado em têxteis [1].

O triclosano atua sobre o crescimento microbiano, principalmente através da inibição da biossíntese de ácidos gordos e bloqueando a biossíntese de lípidos, bem como através da interação com enzimas membranares [4]. Contudo, existem fortes preocupações relativas à resistência bacteriana desenvolvida relativamente a este composto. Além disso, quando exposto à luz solar o triclosano decompõe-se, conduzindo à formação de dioxinas policloradas tóxicas. Portanto, existem hoje em dia crescentes cuidados em relação às consequências nefastas do triclosano para os seres humanos e também para o meio ambiente [2].

Compostos amins halogenadas - N-Halaminas

N-halaminas hetrocíclicas são compostos orgânicos que contêm uma ou mais ligações covalentes de azoto-halogéneo (N-X). A sua capacidade antimicrobiana é atribuída às propriedades oxidativas da ligação halamina (N-Cl). Na desativação de um microrganismo, a ligação N-halamina reage reversivelmente com os grupos N-H [4]. No entanto, o cloro residual adsorvido que permanece à superfície do tecido, provoca um odor desagradável e a descoloração do mesmo, facto que compromete o uso deste promissor sistema antimicrobiano na indústria têxtil. Para superar este problema tem sido introduzida uma etapa de remoção do cloro residual não-ligado ao tecido alvo [2].

Corantes

Alguns corantes sintéticos utilizados na indústria têxtil, como por exemplo corantes metálicos, apresentam atividade antimicrobiana. Portanto, o tingimento e acabamento antimicrobiano podem ser realizados simultaneamente, escolhendo corantes específicos.

Existem diversos corantes obtidos a partir de várias plantas que apresentam propriedades antimicrobianas. O Pomegranato (*Punica granatum*) é um dos muitos corantes naturais comuns relatados como potentes agentes antimicrobianos, devido à presença de uma grande quantidade de taninas, as quais são responsáveis pela atividade antimicrobiana da maioria destes corantes, contra uma vasta variedade de bactérias e fungos. Existem ainda muitas outras fontes vegetais de corantes ricos em naftoquinonas que exibem propriedades antimicrobianas e antifúngicas [3].

Atualmente, alguns corantes sintéticos têm sido projetados especificamente com atividade antimicrobiana. Outra abordagem para alcançar o tingimento e acabamento antimicrobiano simultaneamente é ligar covalentemente um biocida a um corante através de um ligando [2].

Compostos Bioativos Naturais

Os compostos bioativos naturais com propriedades antimicrobianas começam a ganhar especial atenção como alternativa ecológica aos agentes antimicrobianos sintéticos para aplicações têxteis, especialmente em tecidos de cuidados médicos e de saúde, pois são seguros e não-tóxicos. Estes compostos naturalmente ativos, tais como, polissacarídeos e derivados, corantes naturais, assim como alguns extratos de raízes, caules, folhas, flores, frutos e sementes de diversas espécies de plantas que apresentam propriedades antibacterianas, têm sido explorados como agentes de acabamento de têxteis [4].

Os polissacarídeos que desempenham uma fração importante em revestimentos de superfície para os materiais utilizados em aplicações médicas são o dextrano, o ácido hialurônico, carboximetil celulose, heparina, alginato entre outros. Porém, tem sido dada especial atenção aos polissacarídeos amino, especialmente o quitosano [4].

O quitosano é o derivado desacetilado da quitina, que é o componente principal das conchas de crustáceos. O quitosano tem sido associado à inibição do crescimento de microrganismos, podendo a sua atividade ser afetada pela sua massa molecular e grau de desacetilação. As propriedades antifúngicas e antimicrobianas do quitosano são normalmente associadas à sua natureza policatiónica, a qual permite a interação com os resíduos da superfície membrana dos microrganismos carregados negativamente. Esta interação provoca grandes alterações na superfície da célula e na sua permeabilidade, levando à dispersão de substâncias intracelulares. Esta capacidade antimicrobiana, juntamente com a sua não-toxicidade, biodegradabilidade e biocompatibilidade, suscita interesse na sua aplicação em diversas áreas entre as quais a indústria têxtil [2] e [3]. Porém o fraco manuseamento entre outros fatores, podem representar limitações à sua aplicação em têxteis [2].

Os produtos naturais à base de plantas, tais como o *Aloe vera*, óleo de eucalipto, extrato de Neem de folhas Tulsi, sementes de uva, entre outros, representam o principal grupo de agentes antimicrobianos naturais. Estes componentes mostram não só atividade antimicrobiana, como também propriedades antioxidantes, cuja importância é extremamente relevante para o desenvolvimento de biomateriais inovadores para dispositivos médicos. No entanto, a maior limitação associada ao uso destes produtos naturais deve-se à sua fraca durabilidade, uma vez que a maioria destes não está apta a estabelecer ligações químicas com a superfície têxtil [4]. Outro agente natural reconhecido é o mel, cujas propriedades medicinais foram reconhecidas desde os tempos antigos, recuperando recentemente a sua importância como curativo natural no tratamento de feridas infectadas. Tem sido reconhecido como um agente de largo espectro de atividade antimicrobiana, originado pela produção de peróxido de hidrogénio [4].

Dentro destes compostos é ainda de salientar a capacidade antimicrobiana de alguns corantes e pigmentos naturais, derivados de plantas (por exemplo, a curcumina e a berberina), insetos, animais e minerais [2] e [4].

1.3. Algodão

1.3.1. Estrutura morfológica

Usado como fibra têxtil há mais de 7000 anos, pode dizer-se que o algodão está ligado à origem mais remota do vestuário e à evolução da produção de artigos têxteis. O algodão é o material utilizado mais importante, como fibra natural na indústria têxtil [9].

A fibra de algodão é composta maioritariamente por celulose (80-90%), com alguns componentes não-celulósicos localizados em torno do núcleo de celulose. Estas impurezas não celulósicas incluem pectinas (0,4-1,2%), ceras (0,4-1,2%), proteínas (1,0-1,9%), cinzas (0,7-1,6%), e outros compostos de ordem diversa. As pectinas encontradas no algodão não tratado consistem principalmente em hétero-polissacarídeos neutros e ácidos, com diferentes pesos moleculares e graus de esterificação. As ceras consistem em álcoois gordos, ácidos gordos e seus ésteres, e outros hidrocarbonetos, sendo estas e as pectinas as responsáveis pelo comportamento não-molhante do algodão não tratado [10].

As fibras de algodão apresentam uma estrutura monocelular diferenciada em quatro camadas distintas (Figura 1.2). (i) A **cutícula** representa a parte não celulósica mais externa da fibra. É constituída pelas ceras, gorduras, proteínas e pectinas, sendo por isso responsável pelas propriedades hidrófobas das fibras de algodão no seu estado natural. (ii) A **parede primária**, constituída por celulose (>50%) contém também ceras, proteínas e pectinas. (iii) A **parede secundária** é maioritariamente celulósica, sendo a camada mais espessa e cristalina de todas. É constituída por uma camada exterior S_1 e por uma interior S_2 , a qual constitui cerca de 95% do peso da fibra, tem alta cristalinidade e é responsável pela resistência mecânica das fibras. (iv) Finalmente a **parede do lúmen** só se observa em fibras de algodão muito maduras, representando a parte mais interna da fibra. Diz respeito ao que resta da célula inicial que originou a fibra e, por esta razão, contém restos de protoplasma, sais minerais e corantes responsáveis pela cor creme do algodão cru [11] e [12].

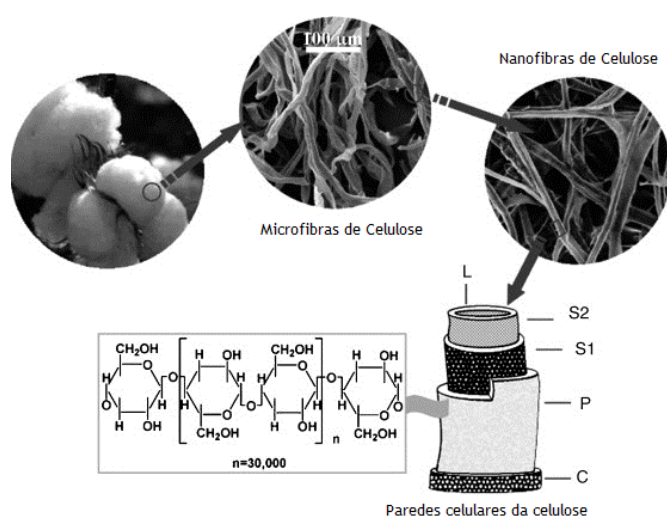


Figura 1.2 - Estrutura hierárquica da celulose no algodão. C - Cutícula; L - Lúmen; P - Parede celular primária; S1 e S2 - Parede celular secundária S2 (adaptado de [13]).

1.3.2. Estrutura molecular

A celulose é um polímero linear composto por unidades de glucose unidas através de ligações glicosídicas β -1 \rightarrow 4; duas unidades de glucose unidas formam uma unidade de celobiose. A sua fórmula empírica é $[C_6H_{10}O_5]_n$, onde o valor de n pode variar entre 4000-5000 [8].

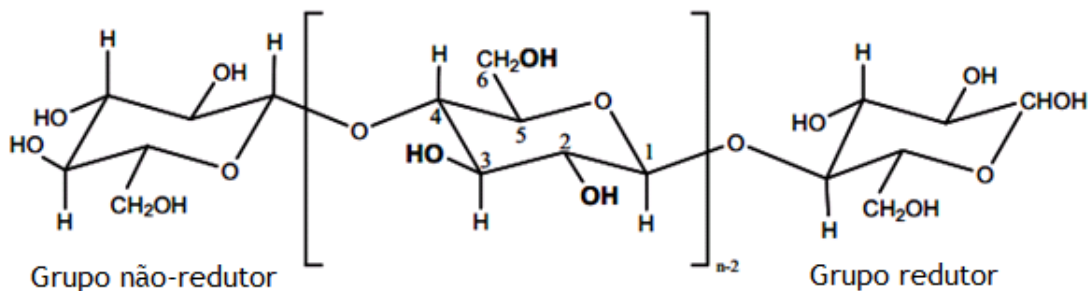


Figura 1.3 - Fórmula estrutural da celulose (adaptado de [12]).

Cada unidade de glucose possui grupos hidroxilo nas posições C2, C3 e C6. No fim da cadeia de celulose existem dois terminais hidroxilo diferentes: uma extremidade não-redutora, a qual representa um grupo álcool e uma extremidade redutora relativa a um grupo aldeído (Figura 1.3).

Os três grupos hidroxilo de cada unidade de glucose da cadeia celulósica podem interagir entre si e formar pontes de hidrogénio: intramoleculares, entre grupos hidroxilo da mesma molécula, ou intermoleculares, entre grupos hidroxilo de moléculas de celulose diferentes [14].

A celulose é um substrato de vasta utilização e um alvo de investigação em atual e constante evolução por apresentar vantagens relacionadas com a sua estrutura regular, elevada densidade de grupos hidroxilo, nos quais podem ocorrer diferentes reações; elevada resistência à maioria dos solventes orgânicos e excelente capacidade de adesão a substratos inorgânicos devido às pontes de hidrogénio [15].

1.4. Funcionalização antimicrobiana do algodão

A funcionalização antimicrobiana de materiais têxteis, nomeadamente o algodão, tem sido abordada mediante diferentes processos, dependendo quer do agente bioativo quer da fibra em questão. Desta forma, os agentes antimicrobianos podem ser incorporados na solução polimérica, a partir da qual terão de migrar para a superfície, libertando-se lentamente durante a sua utilização; ou podem ser aplicados em processos de pós-tratamento.

Como processos de pós-tratamento para o acabamento antimicrobiano de fibras naturais e sintéticas, têm sido utilizados métodos convencionais de exaustão por esgotamento, bem

como métodos de impregnação *pad-dry*. Recentemente surgem outros métodos relativos à funcionalização das superfícies têxteis, tais como o uso de soluções coloidais nanométricas, nanopartículas, modificações químicas favoráveis à formação de ligações covalentes entre o agente e a fibra, e ainda a utilização de um agente de reticulação ou o recurso a processos sol-gel [4].

Relativamente ao algodão, atualmente têm sido lançadas aplicações sobre a sua superfície, anteriores ao emprego do agente antimicrobiano, com o objetivo de os tornar mais aptos a estabelecer ligações com agentes exteriores. Sendo o tratamento plasmático de tecidos de algodão um exemplo, este é caracterizado pela formação de grupos carboxílicos e radicais livres na superfície do tecido, tornando-o mais reativo através da alteração química e morfológica da sua superfície [16].

Outra potencial aplicação surge com a utilização de veículos de transporte de moléculas ativas, cujo emprego em algodão passa essencialmente pela aplicação de ciclodextrinas (CDs). As CDs são uma família de oligossacáridos cíclicos, úteis pela sua capacidade de formar complexos moleculares com uma elevada quantidade de compostos líquidos, sólidos e gasosos. No campo têxtil permitem uma libertação controlada do agente antimicrobiano, ligado nas suas cavidades [8].

Relativamente ao provimento de capacidades antimicrobianas ao tecido de algodão, muito se tem vindo a fazer com o objetivo de melhorar as suas capacidades, tornando-as mais duráveis e seguras. Desta forma, várias têm sido as aplicações feitas neste contexto, algumas delas sumariadas na Tabela 1.1.

Tabela 1.1 - Aplicações antimicrobianas sobre o algodão.

Agente aplicado	Processo de funcionalização	Resultados	Referência
Solução Quitosano-CO₂	Funcionalização por esgotamento	- Inibição eficaz do crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> ; - Promissor na reparação do tecido da pele, reduzindo a densidade da cicatriz e acelerando o processo, mas fraca durabilidade	Sakai <i>et al.</i> (2002) [17] Ristic <i>et al.</i> (2011) [4]
NMA-HTCC (derivado do quitosano)	Ligação covalente a fibras de celulose	- Redução do crescimento microbiano (<i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i>) de ≈100% em todos os tecidos de algodão tratados, mas fraca durabilidade	Lim <i>et al.</i> (2004) [18]
Partículas PBA-Quitosano	- Processo por impregnação <i>Pad-dry</i>	- Atividade antibacteriana contra <i>Staphylococcus aureus</i> , com redução do crescimento superior a 90%, mas fraca durabilidade	Khaled <i>et al.</i> (2005) [19] Ristic <i>et al.</i> (2011) [4]

Compostos quaternários de amônio (CPC e BDHAC)	- Ligação covalente à fibra de algodão	- Atividade antimicrobiana testada contra <i>Staphylococcus aureus</i> , atingindo valores de 99,9% de redução bacteriana; mas podem conferir coloração indesejada aos têxteis	Young-A Son <i>et al.</i> (2006) [8]
Nanopartículas de Prata (AgNPs)	Processo por impregnação <i>PAD-BATCH</i>	- Atividade antibacteriana promissora contra <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Escherichia coli</i> , mas em concentração elevada podem causar toxicidade	Matyjas <i>et al.</i> (2008) [20]
Nanopartículas de Prata (AgNPs)	Processo por esgotamento	- Atividade antibacteriana superior a 90%, para <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> ; após lavagem atinge os 70% de redução bacteriana.	El-Rafie <i>et al.</i> (2012) [21]
Triclosano	Processo por esgotamento	- Redução superior a 90% sobre o crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> ; após lavagem das amostras atinge os 70%.	Mehmet <i>et al.</i> (2007) [22]
Quitosano/ AgCl-TiO₂	- Processo por impregnação <i>pad-dry</i>	- Eficácia antibacteriana de aproximadamente 100% contra <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i>	Rabia <i>et al.</i> (2013) [23]
Ciclodextrinas (CDs) carregadas com Ácido Nalidíxico	Pré-irradiação das gazes de algodão com Glicidil metacrilato, com posterior ligação covalente das CDs	- Aumento da afinidade das gazes para o agente antimicrobiano; - Formação de zonas de inibição significativas, contra <i>Escherichia coli</i> . Mas sem durabilidade após lavagens sucessivas.	Ramírez <i>et al.</i> (2012) [24]
MCT-B-CD (derivado de ciclodextrina) carregadas com triclosano	Ligação covalente à celulose do tecido de algodão	- Fácil libertação do triclosano das cavidades das ciclodextrinas; - Forte atividade antimicrobiana do triclosano contra <i>Staphylococcus aureus</i> . Mas sem durabilidade após lavagens sucessivas.	Cabralez <i>et al.</i> (2012) [25]

Apesar das muitas e diversas aplicações antimicrobianas e dos diferentes agentes embutidos em têxteis, nomeadamente no algodão continuam a persistir problemas relacionados com o seu uso principalmente no que diz respeito à segurança dos mesmos, à sua durabilidade após uso e lavagem e ainda as preocupações ambientais. Por exemplo, as

elevadas concentrações de triclosano necessárias para induzir efeito antimicrobiano durável e com valores adequados já levaram à proibição do uso deste agente em alguns países da Europa [2]. Mesmo os agentes mais recentemente investigados ainda apresentam alguns constrangimentos relativamente ao seu uso, como é o caso dos efeitos inflamatórios da prata e das nanopartículas de TiO₂, cuja inalação pode conduzir a inflamações pulmonares, comportando-se como um agente destruidor de tecidos corporais humanos [8]. Quanto às CDs, cujos resultados também se mostram promissores, as apreensões com elas relacionadas devem-se à dificuldade em imobiliza-las de uma forma durável e por isso se recorre constantemente a agentes de reticulação [8]. Mesmo quando referimos agentes antimicrobianos naturais cujos estudos toxicológicos e ambientais podem ser menos preocupantes, é a sua falta de condições de estabelecer ligações químicas com o tecido e o facto de alterarem o seu manuseamento e aspeto (como por exemplo o quitosano) que os tornam menos viáveis [2] e [4].

1.5. Aplicação da L-Cisteína como agente antimicrobiano

Já aqui foram expostos e descritos diversos agentes antimicrobianos sintéticos, bem como alguns de origem natural, cujas vantagens se prendem com a superação dos riscos e efeitos colaterais associados ao primeiro grupo. No seguimento deste raciocínio foram surgindo perspectivas sobre a utilização de determinados aminoácidos presentes em qualquer organismo vivo como agentes de atividade antimicrobiana aplicados em têxteis.

A investigação tem recaído sobre a aplicação da cisteína como agente antimicrobiano. A L-Cisteína (Figura 1.4) é um aminoácido neutro, não-essencial, presente em diversos alimentos, e possui um grupo enxofre na extremidade do seu grupo variável lateral [26].

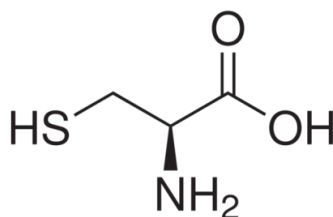


Figura 1.4 - Estrutura química da L-Cisteína (adaptado de [27]).

A cisteína é rapidamente oxidada, formando um aminoácido dimérico ligado covalentemente e designado por cistina. Este aminoácido forma-se por união entre duas moléculas de cisteína através de ligações dissulfureto (S-S), Figura 1.5. Os resíduos dissulfureto que se ligam para dar origem à cistina são altamente hidrofóbicos e não polares [26].

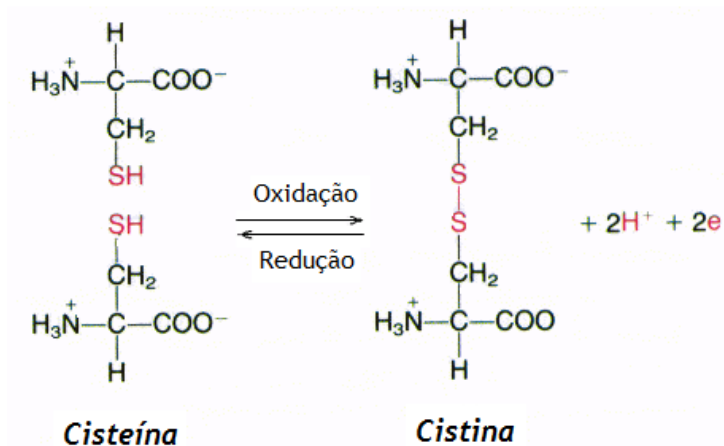


Figura 1.5 - Reação de Oxidação-Redução entre duas moléculas de Cisteína, com formação de Cistina por ligações dissulfureto (S-S) (adaptado de [28]).

É já remota a investigação lançada sobre a possível atividade antimicrobiana deste aminoácido, cujo mecanismo eficaz permanece até hoje algo impreciso. Por exemplo, segundo os resultados obtidos por Kari *et al.* (1971), ocorre inibição do crescimento da *Escherichia coli* à medida que se aumenta a concentração de L-Cisteína, atingindo o máximo a 10mM. Sendo a L-Cisteína um composto extremamente reativo, é de prever que esta possa afetar várias reações enzimáticas *in vitro* e uma série de funções metabólicas desta bactéria, bem como em outros microrganismos [29]. Já estudos anteriores apoiaram a ideia do efeito inibitório da L-Cisteína, nomeadamente Roberts *et al.* (1957) que relataram que a L-Cisteína exógena inibe o crescimento de *E. coli*, enquanto Nagy *et al.* (1968 e 1970) constataram que, contra a *E. coli*, a síntese de RNA e proteínas, era rapidamente inibida pela presença deste aminoácido [29].

Em 1980 Gomez *et al.* abordaram o estudo sobre o efeito tóxico da cisteína sobre a *Salmonella typhimurium*, cujos resultados indicam que o mecanismo de toxicidade pode ser devido à indução de cisões na cadeia de DNA da mesma [30].

Recentemente surgem mais evidências da eficácia antimicrobiana deste agente natural e do possível mecanismo de atuação. É proposto que a L-Cisteína estabeleça efeito antimicrobiano em bactérias gram-positivas e gram-negativas, através de um mecanismo de distúrbio metabólico e despolimerização das membranas celulares.

O efeito antimicrobiano de agentes sulfidril (compostos com grupos tiol) foi anteriormente mencionado por Morris *et al.* (1984), num estudo que estabelece convictamente a sua reação com os grupos sulfidril localizados na membrana celular de bactérias gram-positivas e gram-negativas [31].

Esta elevada reatividade entre os grupos tiol (-SH) da L-cisteína com os grupos sulfidril da membrana celular, causa reduções drásticas na atividade enzimática e no metabolismo bacteriano. Por este motivo, os microrganismos dificilmente conseguirão desenvolver-lhe resistências. Caso contrário, teriam de alterar toda a sua composição membranar e/ou organização, o que é altamente exigente e envolve um gasto de energia colossal. Além disso,

fazendo a L-Cisteína parte de vários organismos vivos não é expectável que estes desenvolvam resistências à sua presença [32].

Estas afirmações provêm também de estudos que envolvem a funcionalização de fibras proteicas, como a lã, com L-Cisteína, nos quais se obtiveram resultados promissores, uma vez que foi alcançado um efeito antimicrobiano durável e sem danos citotóxicos para células humanas [26].

1.6. Péptidos antimicrobianos

Atualmente existe um dilema crescente relacionado com o desenvolvimento de resistências aos antibióticos convencionais por parte dos microrganismos. Desta forma, a prioridade futura deve focar-se no desenvolvimento de fármacos alternativos e/ou a recuperação de moléculas naturais que permitam o controlo adequado e consistente de doenças causadas por agentes patogénicos. Idealmente, estas moléculas devem ser de origem natural, com um vasto espectro de ação sobre vários agentes patogénicos, fáceis de produzir, e não propensos a induzir resistências por parte dos microrganismos alvo [33] e [34]. Os péptidos antimicrobianos (AMPs) parecem ajustar-se a esta descrição, e por isso o seu uso vai ganhando espaço de aplicabilidade. Estas moléculas são polipéptidos sintetizados intracelularmente, produzidos por várias espécies, incluindo bactérias, insetos, plantas, animais vertebrados e que têm sido reconhecidos como moléculas evolutivas, efetivamente preservadas em mamíferos [35]. Representam algumas das substâncias produzidas por muitos organismos de modo a protegerem-se contra microrganismos invasores, [36] e [37], razão pela qual foram apelidados de "antibióticos naturais" [36].

Estão a decorrer esforços para aumentar a potência e especificidade destes péptidos de modo a serem tóxicos apenas para os microrganismos alvo. A fim de alcançar este objetivo de uma maneira eficiente, é importante entender o mecanismo de ação destes agentes, bem como a razão para a sua seletividade contra determinados microrganismos [37].

1.6.1. Classificação

Apesar dos AMPs poderem apresentar uma grande diversidade estrutural, é possível agrupá-los em classes distintas, tendo em conta a sua origem bioquímica, ou seja a carga geral e também as suas características estruturais, lineares e circulares e a sua composição em aminoácidos. Existem diferentes formas de agrupar estas moléculas, podendo ser divididas em duas vastas famílias de péptidos distintas: AMPs obtidos a partir de Eucariotas e AMPs obtidos a partir de Procariotas, que posteriormente se voltam a dividir em subgrupos de características específicas [33] e [38].

Péptidos obtidos a partir de Eucariotas

Dentro da primeira família citada surge um primeiro grupo, os AMPs catiónicos que representa o grupo de péptidos mais abrangente, o qual consoante a sua conformação estrutural se divide pelas seguintes subfamílias [33] e [35]:

(i) **Péptidos lineares com formação de estruturas helicoidais**, dos quais fazem parte as cecropinas. A família destes polipéptidos antimicrobianos constitui uma das mais extensivamente estudadas entre os muitos péptidos sintetizados por insetos como componentes do seu sistema de defesa. Não possuem resíduos de cisteína e formam duas hélices α lineares ligadas através de uma articulação que se integra nas membranas celulares, levando à sua rutura.

(ii) **Péptidos de estrutura aberta, ricos em resíduos de cisteína com uma ou mais pontes dissulfureto**. A esta descrição pertence o grupo das defensinas. As defensinas constituem uma única família de polipeptídeos catiónicos ricos em cisteína, cuja estrutura apresenta três ou quatro pontes dissulfureto. Foram isoladas a partir de mamíferos, insetos e plantas e fazem parte do sistema imunitário inato destes organismos, proporcionando um sistema de defesa inicial eficiente contra agentes patogénicos infecciosos.

(iii) **Péptidos ricos em aminoácidos específicos**. Estes péptidos apresentam propriedades antibacterianas e antifúngicas, e as suas características dependem do organismo a partir do qual são isolados [33].

Os péptidos ricos em resíduos de glicina (14-22%) devem a sua capacidade antimicrobiana a esta composição, uma vez que tem uma influência significativa na sua estrutura terciária e no seu modo de ação. A família de péptidos antimicrobianos ricos em glicina normalmente atua contra fungos e bactérias gram-negativas, assim como contra células cancerígenas, destruindo as suas membranas celulares. À semelhança destes, os péptidos ricos em prolina também atuam especialmente contra bactérias gram-negativas. Porém ao contrário de outros tipos de AMPs, o seu modo de ação não envolve a lise das membranas bacterianas, mas implica a penetração em células suscetíveis, atuando posteriormente no meio intracelular. Este carácter torna-os numa classe de potenciais péptidos capazes de internalizar medicamentos impenetráveis na membrana, em bactérias ou células eucariotas [33] e [35].

Existem ainda péptidos catiónicos que têm sido recuperados com sucesso a partir de proteínas precursoras, tais como a hemoglobina e a lactoferrina no caso dos humanos. Uma importante fração destes péptidos é representada pela família das catelicidinas (CAMPs). Os péptidos desta família são identificados através de um domínio amino-terminal altamente conservado, denominado por domínio *cathelin*, presente no péptido precursor inativo. Todos os AMPs ricos em resíduos de prolina, já referidos anteriormente e extraídos a partir de mamíferos, pertencem a esta família [33], [35] e [39]. O conhecimento acerca das

propriedades estruturais e funcionais das CAMPs é na sua maioria baseado em observações sobre a altamente estudada catelicidina humana LL-37 [40].

Quanto aos péptidos aniônicos, estes representam um grupo mais pequeno de AMPs e são obtidos essencialmente a partir de mamíferos. Entre estes surgem pequenos péptidos presentes em surfatantes pulmonares, fluidos bronco-alveolares e nas células epiteliais das vias aéreas. São produzidos em concentrações milimolar (mM) e são ativos contra bactérias gram-positivas e gram-negativas [41]. O zinco pode funcionar como cofator, permitindo ultrapassar a carga negativa da superfície dos microrganismos, de forma a obter a máxima atividade antimicrobiana. Existem várias subfamílias derivadas deste grupo: moléculas derivadas de neuropéptidos, moléculas ricas em ácido aspártico, dipéptidos aromáticos e proteínas ligadas ao oxigénio [33].

Péptidos obtidos a partir de Procariontes

Os péptidos antimicrobianos produzidos por bactérias contribuem para a sobrevivência das próprias células individuais, eliminando outras bactérias que possam competir por nutrientes no mesmo ambiente [38]. Estes são agrupados em diferentes classes com base nos organismos produtores, massa molecular, estrutura química e mecanismo de ação [30]. Os péptidos mais importantes são produzidos por bactérias gram-positivas, taxonomicamente classificados como bacteriocinas, sendo na sua larga maioria extremamente potentes quando comparados com a maioria dos seus homólogos eucariotas e por esta razão têm sido amplamente utilizados como conservantes de alimentos [33].

Os péptidos bacteriocinas mais exaustivamente estudados são os produzidos por bactérias produtoras de ácido láctico e os lantibióticos [33]. Os lantibióticos são caracterizados pela inserção do invulgar aminoácido lantionina e pela necessidade de um processamento pós-tradução de modo a adquirir a sua forma ativa. O lantibiótico mais extensivamente estudado é a nisina, utilizado como um conservante de alimentos sem desenvolvimento significativo de resistências até hoje. Também é extremamente potente, exibindo atividade contra uma ampla variedade de bactérias gram-positivas, atuando em MICs na gama nanomolar [38].

Péptidos obtidos a partir de microrganismos geneticamente manipulados

Atualmente, é necessário um método de produção ativa à escala e de custo-efetivo, de forma a comercializar os péptidos bacterianos. O custo da síntese de péptidos limita esta forma de produção a pequenas quantidades de aplicação (uso laboratorial). Uma solução para este problema é utilizar métodos recombinantes para expressar heterologicamente os péptidos antibacterianos em bactérias na forma inativa, sendo a *E. coli* um dos biorreatores recombinantes mais populares devido à sua taxa de crescimento rápido e sistemas de expressão bem estabelecidos. No entanto, é difícil expressar pequenos péptidos em bactérias

altamente manipuladas, em particular os péptidos tóxicos, para serem posteriormente recuperados [35] e [42].

Outra abordagem interessante seria a indução da produção endógena destes péptidos, o que evitaria a possível toxicidade e reações sistémicas adversas, bem como facultaria a sua libertação na forma integral no local desejado [35].

1.6.2. Mecanismos de ação

A seletividade dos AMPs para células procariotas é normalmente associada ao reconhecimento das propriedades gerais da membrana celular. Os AMPs ligam fortemente às bicamadas lipídicas e esta ligação é reforçada pelo aumento da quantidade de lipídios aniónicos. Sendo as membranas celulares procariotas dotadas de um potencial muito mais negativo do que a superfície membranar das células eucarióticas, são promovidas interações eletrostáticas com os péptidos catiónicos, o que explica parcialmente a sua especificidade. Embora os estudos tenham demonstrado que alguns péptidos antimicrobianos interagem com alvos intracelulares, estes péptidos ainda precisam de atravessar a membrana celular para atingir o seu local de ação [43].

Os mecanismos de atividade antimicrobiana dos AMPs têm sido estudados através de determinados péptidos previamente selecionados. As funções destes péptidos variam desde a permeabilização da membrana resultando na lise das células, até à formação de poros transientes e conseqüentemente ao transporte dos péptidos para o interior da célula, colocando-os em contacto com alvos intracelulares [42].

Capacidade de interação com a membrana

Uma característica clássica dos AMPs é a sua capacidade de interação com membranas, e o recurso à permeabilização das mesmas. Os péptidos são caracterizados por domínios hidrofílicos carregados positivamente, de modo a interagirem com as superfícies microbianas carregadas negativamente, e com a bicamada de fosfolípidos conduzindo à penetração na membrana da célula. Portanto, o potencial de membrana e o gradiente de pH são destruídos, a regulação osmótica é afetada e o mecanismo de respiração é inibido [38] e [42].

Durante a interação com a membrana celular os péptidos inicialmente associam-se paralelamente à superfície da membrana, quer superficialmente ou incorporados imediatamente após a interface aquosa (Figura 1.6 A e B) [43].

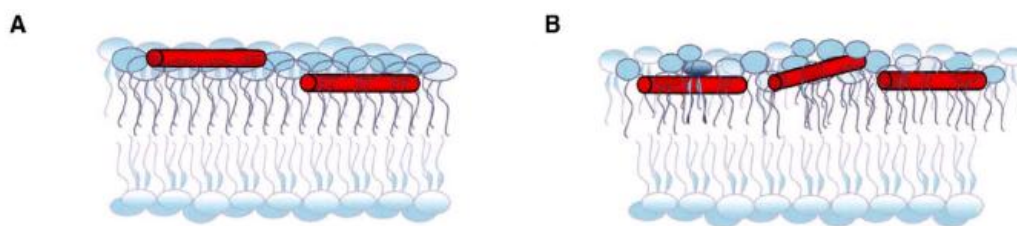


Figura 1.6 - Interação dos péptidos antimicrobianos (cilindros vermelhos) com a membrana celular dos microrganismos. (A) Péptidos associados à superfície membranar; (B) Péptidos incorporados abaixo da interface aquosa (adaptado de [43]).

Atualmente, existem pelo menos quatro modelos diferentes referentes ao modo de ação dos AMPs. Os dois primeiros são modelos de formação de poros transmembranares (Figura 1.7 A e B), enquanto os restantes não envolvem a formação de poros na membrana dos microrganismos (Figura 1.8 A e B).

O primeiro é o Modelo *Barrel-stave* (Figura 1.7 A). Alguns péptidos α -helicais atuam segundo este mecanismo: agregam na superfície da membrana e assumem uma orientação que permita que as superfícies hidrofóbicas interajam com o núcleo lipídico, enquanto as extremidades hidrofílicas se orientam para o interior. Este arranjo cria um canal iônico aquoso. A morte do microrganismo resulta posteriormente da perda de polarização, de conteúdo celular, e de distúrbios na função membranar devido à redistribuição dos lípidos [38] e [42].

O segundo é o Modelo Toroidal (Figura 1.7 B), no qual os péptidos ligados agregam, induzem as monocamadas lipídicas a dobrar-se continuamente, adquirindo uma curvatura positiva. Estudos recentes também demonstraram a influência mútua dos péptidos e lípidos sobre a formação dos poros: enquanto o péptido promove a aquisição da curvatura, a organização lipídica modula a conformação do péptido [38] e [42].

Neste grupo, o primeiro mecanismo trabalha com o núcleo da bicamada lipídica, usando-a como um modelo para a automontagem do próprio péptido, enquanto o segundo trabalha contra esta bicamada, interrompendo a segregação normal dos componentes polares e não polares da membrana [38], [42] e [43].

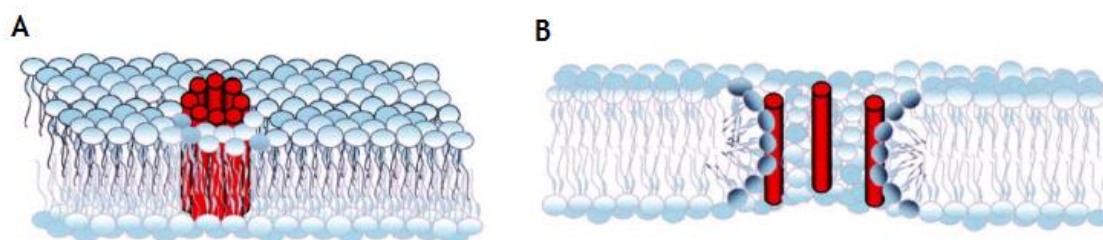


Figura 1.7 - Modelos de formação de canais transmembranares. (A) Modelo “Barrel-Stave”; (B) Modelo Toroidal (adaptado de [43]).

Além dos modelos acima descritos, a atividade dos AMPs pode envolver outros modelos que não requerem a formação de poros e que também têm sido propostos para explicar ou classificar o mecanismo de ação, pelo qual atuam.

No Modelo da Carpete (Figura 1.8 A), os AMPs atuam dissolvendo a membrana, cobrindo a sua superfície até que seja atingida uma concentração suficiente, para a qual é requerida uma elevada razão péptido/lípido. Posteriormente ocorre uma dramática disrupção membranar, levando à morte da célula. Este é o mecanismo de ação mais comum usado por AMPs na eliminação de bactérias gram-negativas e parasitas, resultando no enfraquecimento da bicamada lipídica. Esta alteração leva ao colapso da membrana em pequenas vesículas revestidas pelo AMP. A catelicidina humana LL-37 é um exemplo de AMP que atua sob a influência deste mecanismo [38] e [42].

Mais recentemente, vários estudos proporcionaram evidências consistentes de mecanismos adicionais, uma vez que o aumento da permeabilidade da membrana pode não ser suficiente para causar a morte da célula. Surge um modelo cujo comportamento se assemelha à ação de um detergente (Figura 1.8 B), no qual a ação inicial do péptido envolve um deslocamento competitivo dos cátions divalentes associados à camada lipídica (Mg^{2+} e Ca^{2+}), ganhando acesso às membranas exterior e interior. Estes péptidos têm sido apontados como produtores de perturbações de membranas, através da formação de domínios específicos de ligação lípido-péptido. Os agregados formam canais de dispersão de íons através da membrana [38], [42] e [43].

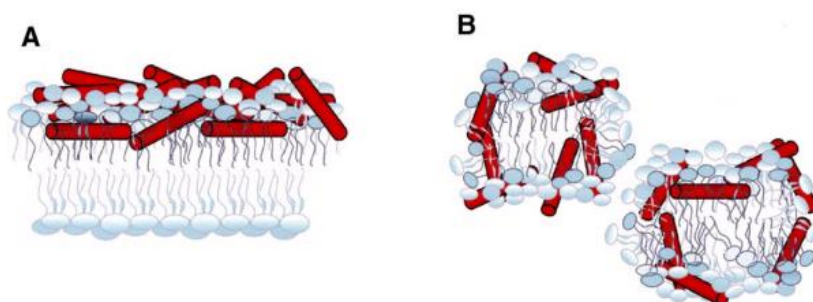


Figura 1.8 - Modelos de disrupção da membrana celular. Modelo da Carpete, por associação contínua de péptidos aos fosfolípidos que compõem a membrana, com eventual cobertura total da mesma (A) Modelo de desintegração detergente (B) (adaptado de [43]).

Capacidade de Inibição ou Distúrbio de alvos intracelulares

Além da habilidade para interagir com a membrana, existem evidências em crescendo que indicam que AMPs têm outros alvos intracelulares. Estes alvos podem ser de origem múltipla, ou seja, estes péptidos podem ligar-se ao DNA, RNA e proteínas, inibir a síntese da parede celular e a síntese proteica, de DNA e RNA. Os péptidos podem ainda interferir com o processo de citocinese [38].

1.6.3. Cys-LC-LL-37

Dentro dos inúmeros péptidos antimicrobianos, pertencentes às diferentes famílias apresentadas, cujas características variam em termos de estrutura e composição esta revisão terá de recair sobre um em específico dada a sua utilização numa fase posterior. Assim sendo, trata-se de um péptido modificado através da adição de um resíduo de Cisteína à cadeia de aminoácidos do péptido antimicrobiano LL-37, ligados entre si por um ligando de seis carbonos (LC).

Tabela 1.2 - Características estruturais dos péptidos LL-37 e Cys-LC-LL-37.

	LL-37	Cys-LC-LL-37
Sequência de aminoácidos	H-Leul-Leu-Gly-Asp-Phe-Phe-Arg-Lys-Ser-Lys-Glu-Lys-Ile-Gly-Lys-Glu-Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-Asn-Leu-Val-Pro-Arg-Thr-Glu-Ser-OH	H-Cys-LC-Leul-Leu-Gly-Asp-Phe-Phe-Arg-Lys-Ser-Lys-Glu-Lys-Ile-Gly-Lys-Glu-Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-Asn-Leu-Val-Pro-Arg-Thr-Glu-Ser-OH
Massa molecular (Da)	4493,3	4709,7

O LL-37 é o único péptido de origem humana pertencente à família das CAMPs [44]. É um péptido catiónico composto por 37 resíduos, o qual forma uma hélice α quando em contacto com membranas bacterianas. Apresenta um vasto espectro de atividade antimicrobiana, contra bactérias gram-positivas e gram-negativas [40]. O modelo de ação deste péptido é normalmente atribuído ao Modelo Carpete, mas com formação de poros toroidais. O LL-37 atinge a membrana externa como oligómero e/ou monómero e cobre toda a superfície membranar. Os péptidos ligam-se paralelamente à superfície, com os aminoácidos carregados positivamente em contacto com os grupos polares dos fosfolípidos. Quando é atingida uma certa concentração limite, a acumulação de péptidos começa a causar uma curvatura positiva da camada lipídica, que leva à formação de pequenos poros toroidais responsáveis por fugas de conteúdo celular. Além da ação de formação de poros pelo LL-37, a interação eletrostática com complexos proteicos responsáveis pelo transporte de eletrões, e produção de ATP, pode levar à rutura do estado de homeostasia da membrana [43] e [44].

Sendo já reconhecidas as competências inibitórias deste AMP relativamente ao crescimento bacteriano, a impregnação do resíduo de Cisteína poderá incrementar as suas capacidades. A aplicabilidade antimicrobiana da Cisteína já mencionada pode ter um efeito positivo sobre a atividade antimicrobiana dos AMPs, até porque existem estudos prévios, onde foi já indicado que a presença de grupos tiol (-SH) livres em AMPs naturais aumenta o seu potencial antimicrobiano [45].

Wiradharma *et al.* (2011) modificaram o(s) terminal(s) da(s) extremidade(s) de péptidos, previamente desenhados, com resíduos de L-Cisteína, a qual transporta a funcionalidade do grupo tiol livre. Após diversos testes foi possível concluir que a simples introdução do grupo tiol nestes AMPs através da incorporação da cisteína na extremidade do terminal amplificou significativamente a sua atividade antimicrobiana perante bactérias gram-positivas e gram-negativas, bem como de leveduras [45].

Em contextualização, uma vez que o péptido antimicrobiano aplicado ao tecido de algodão apresenta Cisteína no seu terminal será possível testar o mesmo método de incorporação covalente testado na fase inicial para a L-Cisteína.

Capítulo II: Funcionalização Covalente do Algodão com L-Cisteína

Este capítulo tem por objetivo testar a eficácia antibacteriana da L-Cisteína covalentemente imobilizada no algodão, bem como avaliar a sua toxicidade sobre células constituintes da pele, uma vez que tecidos bioativos desta natureza implicam normalmente o contacto íntimo com o indivíduo. Numa primeira fase são indicados os métodos de preparação e funcionalização do algodão com L-Cisteína, assim como os procedimentos realizados para a sua deteção e avaliação da eficácia antibacteriana, e ainda os respetivos ensaios de citotoxicidade.

A funcionalização covalente do algodão foi realizada através de uma técnica por esgotamento. Sendo o algodão uma fibra cristalina, os grupos hidroxilo (-OH) presentes na superfície encontram-se ligados entre si através de pontes de hidrogénio, dificultando a sua ligação a novas moléculas. De forma a contornar este obstáculo recorreu-se a uma metodologia de ativação destes grupos hidroxilo, de modo a torná-los aptos a estabelecerem ligações com agentes exteriores.

O 1,1-Carbonildiimidazole (CDI) apresenta um mecanismo característico de ação sobre a celulose, através do qual reage com grupos hidroxilo (-OH), criando intermediários reativos. Tendo os grupos -OH ativados e disponíveis é possível fazê-los reagir com moléculas que contêm grupos amina, como é o caso da L-Cisteína [46]. Sendo assim, a escolha do agente ativador do algodão recaiu sobre o CDI, uma vez que já foi descrito como um potencial modificador da celulose [47].

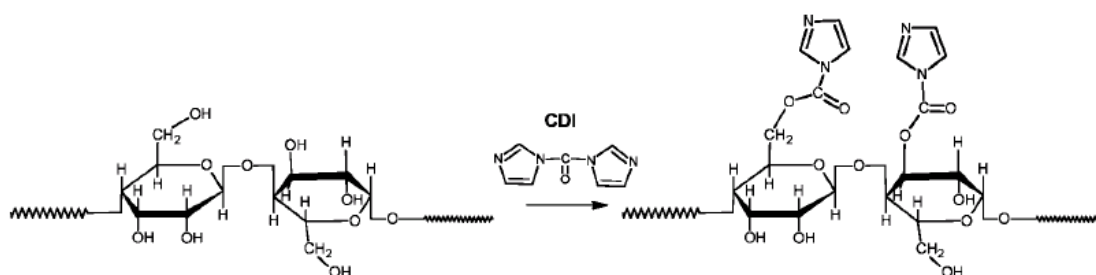


Figura 2.1 - Esquema representativo da ativação dos grupos hidroxilo (-OH) da celulose por parte do 1,1 - Carbonildiimidazole (CDI) (adaptado de [48]).

Este processo de acoplamento tem já sido aplicado na ativação de suportes cromatográficos com grupos -OH, usados na imobilização de ligandos de afinidade com grupos amina [46].

2.1. Materiais e Equipamentos

Os materiais têxteis utilizados, consistiram em tecidos de algodão 100%, e foram submetidos a uma lavagem prévia (adiante descrita) para eliminar contaminações e sujidades.

Os reagentes utilizados ao longo do trabalho experimental são de qualidade pró-análise e encontram-se identificados na tabela 2.1.

Tabela 2.1 - Reagentes utilizados na funcionalização do algodão com L-Cisteína.

Reagentes	Fornecedor
Detergente ECE	Bayer
L-Cisteína	Sigma Aldrich
1,1-Carbonildiimidazole (CDI)	Sigma Aldrich
Tetrahidrofurano Anidro (THF)	Sigma Aldrich
Hidróxido de Sódio (NaOH)	Panreac
Cloreto de Sódio (NaCl)	Sigma Aldrich
Surfatante - Tween-80	Sigma Aldrich
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Sigma Aldrich
Soro Fetal Bovino (FBS)	Sigma Aldrich
Meios de Cultura	Fornecedores
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)</i>	Sigma Aldrich
<i>Mueller Hinton Broth (MHB)</i>	LiofilChem
<i>Nutrient Agar (NA)</i>	Panreac
<i>Nutrient Broth (NB)</i>	Panreac

Na tabela 2.2 estão descritos os equipamentos utilizados nos diferentes processos de funcionalização e análise.

Tabela 2.2 - Equipamentos utilizados na funcionalização do algodão com L-Cisteína.

Designação	Equipamento/Modelo
Equipamento de tingimento	<i>Mathis BFA12</i>
Microscópio Eletrónico de varrimento /	<i>Rontec Detector / Scanning Electronic</i>
Espectrofotómetro de Raios-X (SEM-EDX)	<i>Microscope Hitachi Model S-2700</i>
Espectrofotómetro FTIR-ATR	<i>FTIR spectrophotometer Thermo-Nicolet is10</i>
Autoclave	<i>Advantage Lab - ALO2-03-100</i>
Medidor de pH	<i>Seven Easy Mettler TOLEDO Inlab®Expert Pro</i>
Micropipetas (2-20µL, 20-200µL, 100-1000µL, 500-5000µL)	<i>Socorex, Pipetman, Eppendorf</i>
Câmara de Fluxo Laminar	<i>TopSafe 1.2 BioAir EuroClone</i>
Vórtex	<i>Heidolph Reax top Vidrolab 2</i>
Densitómetro McFarland	<i>Grant-bio DEN-1</i>
Agitador Orbital	<i>Agitorb 200 Aralab</i>
Estufa de Incubação	<i>Memmert</i>
Leitor de Microplacas	<i>Biochrom Anthos 2020</i>

2.2. Métodos

2.2.1. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC)

A Concentração Mínima Inibitória (MIC) corresponde à concentração mais baixa na qual um determinado agente antimicrobiano inibe o crescimento visível de um microrganismo. Esta é mais frequentemente usada como ferramenta de pesquisa na determinação da atividade *in vitro* de novos agentes antimicrobianos. A sua determinação foi efetuada segundo o protocolo descrito na Norma M7-A6 para as estirpes *S. aureus* (ATCC 6538) e *K. pneumoniae* (ATCC 4352), cuja seleção está de acordo com as estirpes referenciadas na norma JIS L 1902:2002 como as adequadas para a realização de ensaios antimicrobianos em fibras têxteis.

Este ensaio foi efetuado utilizando o **método de macrodiluição**:

(i) Preparou-se o inóculo através de uma suspensão direta das colónias selecionadas a partir de uma placa de agar, previamente incubada durante um período de tempo compreendido entre 18-24h, para crescimento dos microrganismos. Em concordância com a Norma esta suspensão foi ajustada a uma turbidez compreendida entre $1-2 \times 10^8$ CFU/mL, a qual equivale a 0,5 na escala McFarland;

- (ii) Posteriormente, a suspensão bacteriana foi ajustada a uma concentração final compreendida entre $1-2 \times 10^5$ CFU/mL por adição de meio Mueller Hinton Broth (MHB);
- (iii) A concentração de L-Cisteína variou entre $9,7 \times 10^{-2}$ g/mL e $2,3 \times 10^{-5}$ g/mL, sendo efetuadas sucessivas diluições volumétricas na proporção de 1:2 com meio MHB;
- (iv) Em cada tubo de ensaio colocou-se 1mL da solução de L-Cisteína, nas diferentes concentrações, e 1mL da suspensão bacteriana de trabalho (e um tubo controlo positivo contendo apenas meio MHB);
- (v) A incubação foi realizada a 37°C, e após um período de tempo compreendido entre 18 e 24h efetuou-se a leitura visual acerca do crescimento bacteriano.

O procedimento foi efetuado em triplicado para ambas estirpes, realizando-se as réplicas necessárias até atingir três ensaios concordantes no valor MIC, de cada estirpe [49].

2.2.2. Ativação da Superfície do Algodão

Antes de qualquer utilização, o algodão foi previamente tratado, através de uma lavagem apropriada, usando um detergente referência ECE a uma concentração de 1g/L, durante 30 minutos a 40°C. Após a lavagem foi passado por água até remoção completa de qualquer resíduo de detergente, e seco até ser utilizado.

Na perspetiva de funcionalização do algodão, o exemplar têxtil foi cortado em amostras de 0,4g cada, de modo a cumprir regulamentos de testes posteriores.

As soluções de ativação foram preparadas através da diluição de 1,1-Carbonildiimidazole (CDI), como agente ativador em Tetrahidrofurano Anidro (THF), como solvente. Estas foram preparadas a diferentes concentrações: 0, 4, 40 e 60% (m/V), onde posteriormente se submergiram as respetivas amostras de algodão, durante duas horas em agitação moderada. Após agitação, passaram-se as amostras por THF três vezes e posteriormente por água desionizada, pH 9,5. Todo o procedimento foi realizado em ambiente de total ausência de humidade, recorrendo a uma câmara de luvas com atmosfera substituída por azoto.

2.2.3. Funcionalização do tecido

Após o processo de ativação da superfície do algodão, procede-se à funcionalização do mesmo com a L-Cisteína.

Em primeiro lugar, as soluções de L-Cisteína foram preparadas em duas concentrações diferentes, 5 e 7,5% (m/m), sob uma razão de banho de 1:50. Estas concentrações foram selecionadas com base em estudos preliminares. Dissolveu-se a L-Cisteína em água desionizada, cujo pH foi ajustado a 9,5 com hidróxido de sódio (NaOH). Posteriormente, as

amostras foram distribuídas nas respectivas soluções de funcionalização. O processo de funcionalização por esgotamento foi realizado incubando as amostras no equipamento de tingimento a 40°C e 15 rpm, durante 24h. Após as 24h as amostras foram retiradas dos respectivos recipientes, lavadas em três banhos de acordo com a norma EN ISO 105-C06:2010 com uma solução a 1g/L de detergente (*AATCC Standard Reference Detergent WOB*), a 40°C, durante 60 minutos, e enxaguadas novamente em três banhos separados de água desionizada, pH 9,5 e secas a 30°C.

2.2.4. Avaliação da eficácia de funcionalização

Após o processo de funcionalização das amostras de algodão e antes de avaliar a capacidade de induzir atividade antibacteriana ao mesmo é necessário testar e avaliar a eficácia deste processo, ou seja, utilizaram-se métodos que caracterizassem as amostras funcionalizadas. Desta forma, foram realizados ensaios que permitissem determinar a presença de grupos tiol, e conseqüentemente de L-Cisteína, nas amostras funcionalizadas e também a presença de ligações específicas que comprovassem a presença do agente.

2.2.4.1. Energia dispersiva de espectroscopia de raio-X (EDX)

Foi realizada uma análise elementar com o objetivo de demonstrar a presença de L-Cisteína no algodão, através da detecção da presença de enxofre nas amostras funcionalizadas. Sendo o algodão uma fibra celulósica, não apresenta enxofre na sua conformação inicial. Portanto a presença de enxofre nas amostras é atribuída à presença da L-Cisteína e conseqüente eficácia do processo.

Esta análise foi realizada sobre todas as amostras, com as diferentes concentrações de agente ativador de superfície (0, 4, 40 e 60% m/V) e de L-Cisteína (5 e 7,5% m/m). Os diferentes resultados relativos à maior ou menor quantidade de enxofre detectada, também puderam aproximar-nos das melhores condições de funcionalização, embora se tratem de resultados de teor qualitativo.

2.2.4.2. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR-ATR)

A caracterização da composição química das amostras de algodão funcionalizadas, foi realizada recorrendo à Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier. Os espectros foram obtidos usando 16 varrimentos em cada amostra e uma resolução espacial de 4cm⁻¹. Esta análise permite numa primeira fase identificar os picos característicos correspondentes às ligações específicas do algodão comparando-os com a literatura atual.

Posteriormente é possível relacionar este com os espectros das amostras funcionalizadas e identificar alterações que evidenciem a eficácia do processo de funcionalização.

2.2.5. Avaliação da atividade antibacteriana

O comportamento antibacteriano do tecido foi avaliado contra duas estirpes bacterianas, *S. aureus* (ATCC 6538) gram-negativa e *K. pneumoniae* (ATCC 4352) gram-positiva. A seleção destas estirpes bem como todo o restante procedimento foi realizado de acordo com a Norma Japonesa Industrial Standart JIS L 1902:2002. O efeito inibitório do crescimento bacteriano foi avaliado recorrendo a dois métodos distintos, um qualitativo e outro quantitativo: Teste de Difusão em Agar e Teste de Suspensão, respetivamente.

O crescimento de ambas as estirpes, para os dois testes decorreu em meio NA durante 24h, a uma temperatura de 37°C. Posteriormente uma colónia de cada inóculo foi transferida, separadamente, para 20mL de meio líquido NB. A incubação da suspensão bacteriana decorreu a 37°C, durante 24h e 110rpm num agitador orbital. Para ambos os testes, foram testadas amostras funcionalizadas e não funcionalizadas, realizando-se os respetivos controlos bacterianos.

2.2.5.1. Teste de Difusão em Agar - Avaliação qualitativa

- (i) Ajustou-se a concentração da solução bacteriana (de ambas as estirpes) até um valor compreendido entre 1×10^6 - 1×10^7 CFU/mL. Em cada uma das placas de petri, previa e devidamente identificadas, colocaram-se 1mL da solução bacteriana e 15mL de meio NA;
- (ii) Após aproximadamente 3h, foram colocadas as amostras têxteis na placa correspondente, promovendo um contacto íntimo entre a amostra e o inóculo. As placas foram incubadas a 37°C durante 18-24 horas;
- (iii) Por fim, foi examinada a inibição do crescimento bacteriano diretamente debaixo dos tecidos, bem como imediatamente em torno da amostra - presença de halo de inibição. Todas as amostras foram testadas em duplicado, para cada uma das estirpes.

A zona de inibição (halo) não deve ser esperada caso o agente esteja firmemente ligado à fibra (ligação covalente), uma vez que esta impede a sua difusão pelo agar. Se o agente antimicrobiano conseguir difundir-se pelo agar, aparecerá uma zona de inibição (halo), cujo tamanho fornece indicações acerca da potência da atividade antimicrobiana ou sobre a taxa de libertação do agente ativo. Caso não ocorra formação do halo, a ausência de crescimento apenas por baixo da amostra também indica a presença de atividade antimicrobiana [2].

2.2.5.2. Teste de Suspensão - Avaliação quantitativa

Este método, foi realizado de modo a determinar de forma mais precisa a percentagem de inibição do crescimento bacteriano, após 0 e 24h de contacto entre a amostra e o inóculo.

(i) A concentração do inóculo foi ajustada a $1-2 \times 10^8$ cel/mL em NB, equivalente a 0,5 na escala McFarland, e de seguida fizeram-se as diluições necessárias para acertar a concentração bacteriana até $1 \pm 0,3 \times 10^5$ cel/mL usando NB;

(ii) Foram colocados 200µL de cultura bacteriana em contacto direto com cada amostra (com aproximadamente 0,4g, cada uma), dentro de um tubo de *falcon* previamente identificado;

(iii) As amostras das 24h foram transferidas para a estufa de incubação onde permaneceram a 37°C, durante 24h. Às amostras das 0h adicionaram-se imediatamente 20mL de solução salina 8,5g/L com 2mL/L de surfatante. Agitaram-se os tubos no vórtex durante aproximadamente 60 segundos, e posteriormente, retirou-se uma alíquota (100µL) de cada tubo que é diluída sucessivamente. Realizaram-se estas diluições (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}) em *ependorfs* com 100µL de solução salina, devidamente identificados;

(iv) De cada diluição retiraram-se duas gotas, com 10µL cada, para placas de *petri*. Estas foram incubadas durante 24h, a 37°C. Após as 24h efetuou-se a contagem bacteriana e calculou-se a % de Redução Bacteriana (%R) (1):

$$\%Redução = \frac{A - B}{A} \times 100 \quad (1)$$

Onde A corresponde ao valor médio de Unidades Formadoras de Colónias (CFU-ug/mL) do tecido não funcionalizado e B ao número médio de CFU (ug/mL) do tecido funcionalizado [50].O procedimento foi realizado exatamente da mesma forma para as amostras das 24h, quando retiradas da estufa. Todas as amostras foram testadas em duplicado, para cada uma das estirpes.

2.2.6. Ensaio de Citotoxicidade

Este procedimento foi realizado de acordo com a Norma DIN EN ISO 10993-5. Inicialmente, foi preparado um extrato obtido a partir do material bioativo funcionalizado com L-Cisteína a uma concentração de 5% (m/m), a qual representou a melhor condição de funcionalização testada em relação à inibição do crescimento bacteriano. Este extrato foi obtido incubando o material bioativo a 37°C, durante 24h, sob agitação moderada. O pH do extrato resultante foi ajustado até um valor compreendido entre 7,3 e 7,4 com hidróxido de sódio (NaOH) e filtrado em condições estéreis.

Uma cultura de células provenientes do tecido conjuntivo L 929 [ATCC No. CCL1, NCTC clone 929 L(DSMZ)], foi tratada durante um período de tempo compreendido entre 68 e 72h com o extrato diluído nas concentrações entre 33,3%-4,4%. Para confirmar a validade do

sistema de teste utilizado, foram realizados controlos durante todo o procedimento. Os testes de controlo realizados incluíram: Controlo Solvente (solução tampão fosfato diluída em meio de cultura correspondente ao material de teste), Controlo Positivo (5% DMSO em meio de cultura) e Controlo Negativo (meio de cultura).

As concentrações do material em estudo diluídas em meio de cultura foram 4,4%, 6,6%, 9,9%, 14,8%, 22,2% e 33,3%, respetivamente. Após o período de incubação, o conteúdo proteico dos grupos de culturas teste (Meio de Cultura: DMEM com 10% FBS) foi avaliado recorrendo ao Método do Ácido Bicinónico (BCA) e comparado com o conteúdo proteico dos controlos. A partir desta análise, o crescimento celular foi determinado na presença do material teste.

Em caso de presença de substâncias tóxicas às células, ocorre a proliferação e taxas de partição modificadas das células (teste de inibição do crescimento) [51]. Perante esta situação ocorre redução do conteúdo proteico da cultura de células comparativamente com as culturas de controlo, as quais foram analisadas usando um ensaio colorimétrico (método BCA) após 68-72 horas de incubação. Resumidamente, os conteúdos em proteína foram medidos colorimetricamente usando os reagentes BCA (Uptima), a 540nm através de um leitor de microplacas. A absorção média (A_{540nm}) e o desvio padrão de três poços paralelos (culturas) foram calculados e usados para avaliar a percentagem de inibição do crescimento (% I.C.) de acordo com a fórmula seguinte (2) [52]:

$$\% I. C. = 100 - 100 \times \frac{Amostra A_{540} - Branco A_{540nm}}{Controlo A_{540nm} - Branco A_{540nm}} \quad (2)$$

Sendo que,

- Amostra $A_{540 nm}$ corresponde ao valor da absorvância do extrato teste;
- Branco A_{540nm} corresponde ao valor da absorvância das culturas sem células;
- Controlo $A_{540 nm}$ corresponde ao valor da absorvância do solvente controlo.

2.2.7. Microscopia eletrónica de varrimento (SEM)

Esta técnica foi utilizada com o objetivo de visualizar se o tratamento aplicado ao algodão, ativação e posterior imobilização covalente do agente antimicrobiano L-Cisteína, provocaria alguma alteração sobre as fibras de algodão.

A morfologia das amostras de algodão foi visualizada através de um Microscópio eletrónico de Varrimento *Hitachi Model S-2700*. As amostras foram revestidas com ouro durante aproximadamente 15 minutos, a 20mA antes de serem observadas.

2.3. Resultados e Discussão

2.3.1. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC)

A determinação dos valores MIC permitiu estabelecer qual a menor concentração de L-Cisteína que inibe o crescimento visível dos microrganismos testados, nomeadamente *K. pneumoniae* e *S. aureus*.

Para *K. pneumoniae* atingiu-se um valor igual a 48 mg/mL, enquanto para o *S. aureus* a concentração foi bem inferior, 6 mg/mL. Estes valores são significativamente superiores comparativamente com outros compostos, nomeadamente o quitosano (0,05% m/V) contra *S. aureus* e *K. pneumoniae* e triclosano (6% m/V) contra *S. aureus* [53] e [54].

2.3.2. Avaliação da eficácia da funcionalização

2.3.2.1. Energia dispersiva de espectroscopia de raio-X (EDX)

Os resultados relativos ao estudo qualitativo da presença de L-Cisteína nas amostras de algodão são demonstrados através da análise elementar sobre a quantidade de enxofre (S) que existe em cada uma das amostras submetidas a diferentes condições de ativação e funcionalização. Sendo o algodão uma fibra celulósica, não apresenta na sua estrutura química nativa este elemento. Desta forma podemos considerar que a quantidade de enxofre que apareceu nas amostras (Tabelas 2.3 e 2.4) provém da presença da L-Cisteína previamente imobilizada covalentemente no tecido. Embora qualitativa, é uma prova positiva quanto à eficácia do procedimento experimental.

Tabela 2.3 - Energia dispersiva de espectroscopia de raio-X (EDX). Percentagem atômica dos diferentes componentes presentes nas amostras têxteis funcionalizadas com 5% (m/m) L-Cisteína.

Algodão funcionalizado com 5% (m/m) L-Cisteína			
Amostra	Oxigénio (%)	Enxofre (%)	Carbono (%)
Algodão	44,04	-----	54,62
Branco	44,31	0,15	55,54
0% (m/V) CDI	44,85	0,21	54,94
4% (m/V) CDI	49,23	0,32	50,45
40% (m/V) CDI	45,43	0,12	54,44
60% (m/V) CDI	42,34	0,17	57,49

Tabela 2.4 - Energia dispersiva de espectroscopia de raio-X (EDX). Percentagem atômica dos diferentes componentes presentes nas amostras têxteis funcionalizadas com 7,5% (m/m) L-Cisteína.

Algodão funcionalizado com 7,5% (m/m) L-Cisteína			
Amostra	Oxigénio (%)	Enxofre (%)	Carbono (%)
Algodão	44,04	-----	54,62
Branco	46,27	0,22	53,52
0% (m/V) CDI	48,63	0,23	51,14
4% (m/V) CDI	49,70	0,44	49,87
40% (m/V) CDI	45,75	0,30	53,94
60% (m/V) CDI	37,64	0,10	62,26

Através dos resultados obtidos é possível verificar que qualquer amostra colocada em contacto com a L-Cisteína apresenta sinais da sua presença, através da deteção do enxofre. Porém, como expectável a quantidade deste elemento variou perante diferentes condições de imobilização. Ambas as tabelas mostram então que a condição de ativação mais propícia a reter maior quantidade de L-Cisteína será uma concentração de 4% CDI (m/V), uma vez que para ambas as concentrações de solução de funcionalização, 5 e 7,5% (m/m) L-Cisteína, é esta a condição cujas amostras apresentam maior quantidade de enxofre na sua superfície, após lavagem. É ainda de referir que quando a concentração de L-Cisteína é de 7,5% (m/m) este valor (0,44%) é ainda superior ao relativo à funcionalização com 5% L-Cisteína (0,32%), como esperado.

2.3.2.2. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR-ATR)

A análise FTIR-ATR permitiu estabelecer se ocorreram modificações estruturais na superfície têxtil através do surgimento de ligações químicas características do processo de ativação e consequente funcionalização aplicado ao algodão. Os espectros das amostras têxteis modificadas analisados foram comparados com o do algodão nativo, cujo espectro se encontra descrito na literatura e foi também coincidente com o alcançado neste estudo.

O espectro FTIR-ATR do algodão não modificado está apresentado na Figura 2.2. Neste podem identificar-se os picos característicos desta fibra: um pico a 3330 cm^{-1} devido à ligação O-H, e a 1335 cm^{-1} relativamente à ligação O-H deformada. A banda específica relativa à ponte glicosídica $\beta(1-4)$ pode ser identificada aos 1159 e 897 cm^{-1} , assim como a ligação C-O-C do anel piranose a 1030 cm^{-1} [55] e [56].

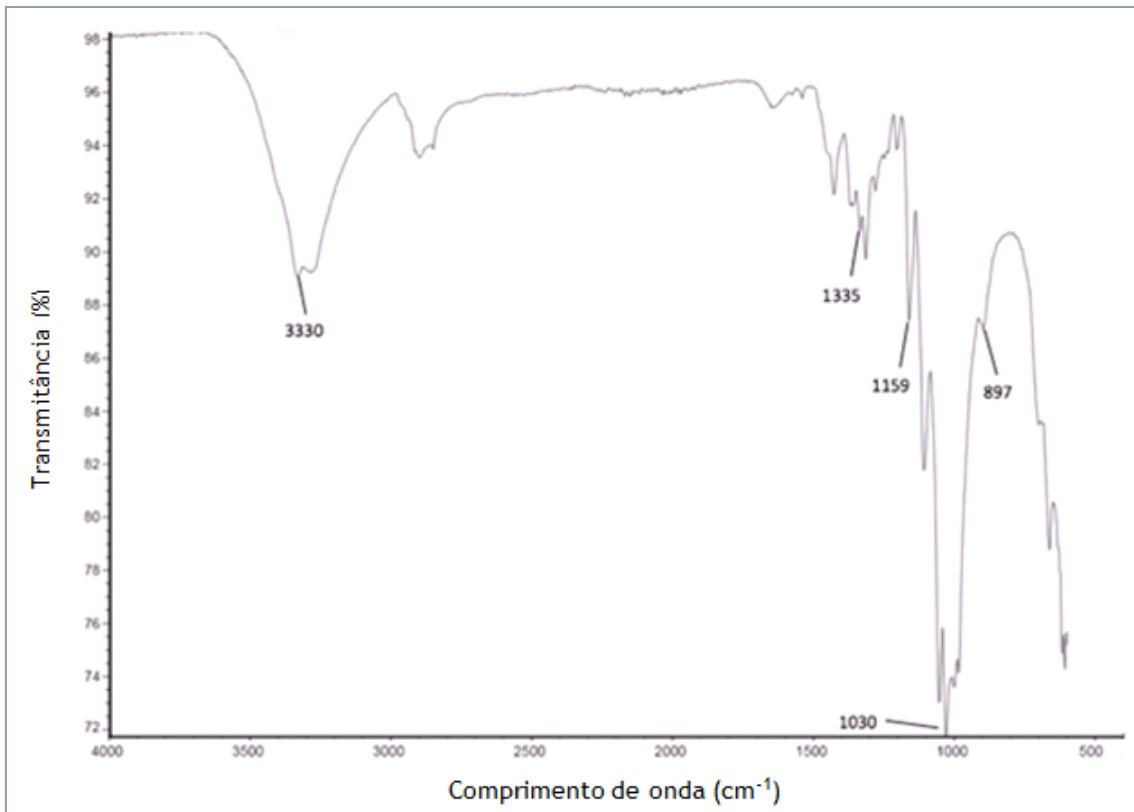


Figura 2.2 - Espectro FTIR-ATR do algodão não modificado.

Posteriormente foi objetivo verificar se o processo de funcionalização das amostras de algodão provocou alguma modificação química na fibra capaz de ser identificada através da análise FTIR-ATR (Figura 2.3).

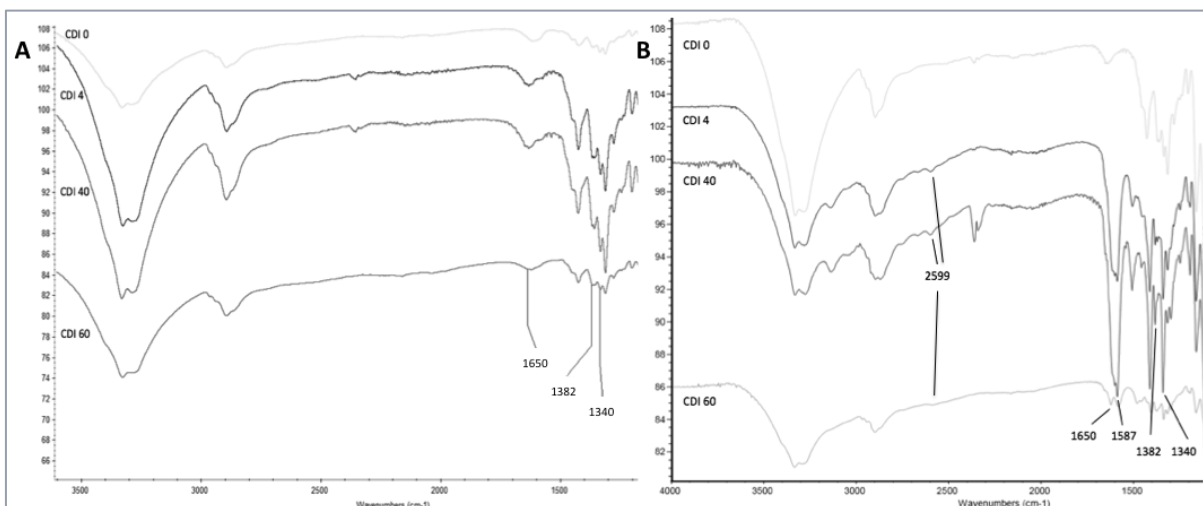


Figura 2.3 - Espectros FTIR-ATR das amostras de algodão modificado, com as diferentes concentrações de ativador a (A) 5 e (B) 7,5% (m/m) de L-Cisteína.

A figura anterior é então relativa às amostras já ativadas e posteriormente funcionalizadas com a L-Cisteína. A uma concentração de 7,5% (m/m), Figura 2.3B, a presença da L-Cisteína foi confirmada através da observação do pico característico das amidas, nomeadamente a banda correspondente a uma amida primária devido à ligação C=O a 1650 cm^{-1} , à dobra N-H das aminas primárias a 1587 cm^{-1} , e à presença da amida terciária a 1340 cm^{-1} (ligações C-N). Além disto pôde observar-se a deformação angular simétrica $-\text{CH}_3$ a 1382 cm^{-1} . É muito importante salientar que este espectro manifestou ainda a presença da ligação S-H correspondente aos grupos funcionais $-\text{CH}_2\text{SH}$ a 2599 cm^{-1} [54].

Estes espectros IR sugeriram ainda um aumento da imobilização de L-Cisteína quando a concentração de ativador de superfície corresponde a 4 e 40% (m/V) de CDI, contrariamente à concentração de 60% (m/V) de CDI, uma vez que se verificou um aumento na intensidade do pico correspondente à ligação C=O, à dobra N-H das aminas primárias, ao pico vibracional da amida terciária e ainda à ligação -SH.

Quando observámos o espectro relativo à funcionalização de 5% (m/m) L-Cisteína (Figura 2.3A) não foi possível detetar o pico característico da ligação -SH, em nenhuma das condições de ativação. Este facto pode não ser conclusivo de que não haja formação de ligação covalente entre a fibra e a L-Cisteína, podendo apenas tratar-se de uma concentração muito baixa do agente antimicrobiano para poder ser detetável através deste método.

É ainda de referir que para a condição relativa a 0% (m/V) de ativador, não existem picos alguns que sugiram a formação da desejada ligação covalente, o que é inequivocamente um fator abonativo da eficácia do processo de ativação aplicado.

2.3.3. Avaliação da eficácia antimicrobiana

2.3.3.1. Teste de Suspensão - Avaliação quantitativa

Relativamente ao teste de avaliação quantitativa da eficácia antibacteriana das amostras têxteis funcionalizadas com L-Cisteína procedeu-se inicialmente à contagem das colónias bacterianas em cada uma das diferentes diluições. Posteriormente estes valores foram convertidos em Unidades Formadoras de Colónias por mililitro (CFU/mL) (3).

$$CFU/mL = \frac{\text{Média número de colónias} \times \text{Factor de Diluição}}{\text{Volume plaqueado}} \quad (3)$$

Estando os ensaios realizados em duplicado, foi aplicado o cálculo de determinação da média de CFU/mL, cujo resultado está presente em todas as tabelas 2.5 a 2.8. Este é o valor que posteriormente foi aplicado para obter os valores relativos à percentagem de redução do crescimento microbiano.

A partir dos valores de CFU/mL foi possível calcular a percentagem de redução do crescimento microbiano de cada uma das amostras funcionalizadas, sempre em relação ao algodão não modificado (4, cálculo exemplo).

$$\%R = \frac{\text{Algodão} - 4\%(m/m) \text{ CDI}}{\text{Algodão}} = \frac{3,67 \times 10^5 - 1,20 \times 10^5}{3,67 \times 10^5} \times 100 = 67,27\% \quad (4)$$

Tabelas 2.5 - Teste de Suspensão para *S. aureus* às 0h, em CFU/mL e respetiva % de Redução.

5% (m/m) L-Cisteína		
Amostra	Média CFU/mL	% Redução
Controlo	$3,75 \times 10^5$	-----
Algodão	$3,67 \times 10^5$	-----
0% (m/V) CDI	$1,60 \times 10^4$	56,36
4% (m/V) CDI	$1,20 \times 10^5$	67,27
40% (m/V) CDI	$1,43 \times 10^5$	61,14
60% (m/V) CDI	$1,20 \times 10^5$	67,27

7,5% (m/m) L-Cisteína		
Amostra	Média CFU/mL	% Redução
Controlo	$3,75 \times 10^5$	-----
Algodão	$3,67 \times 10^5$	-----
0% (m/V) CDI	$2,15 \times 10^5$	41,36
4% (m/V) CDI	$1,28 \times 10^5$	65,23
40% (m/V) CDI	$2,18 \times 10^5$	40,68
60% (m/V) CDI	$2,68 \times 10^5$	27,05

Tabelas 2.6 - Teste de Suspensão para *S. aureus* às 24h, em CFU/mL e respetiva % de Redução.

5% (m/m) L-Cisteína		
Amostra	Média CFU/mL	% Redução
Controlo	$2,11 \times 10^8$	-----
Algodão	$7,55 \times 10^8$	-----
0% (m/V) CDI	$3,65 \times 10^8$	51,66
4% (m/V) CDI	$1,27 \times 10^8$	83,21
40% (m/V) CDI	$3,05 \times 10^8$	59,60
60% (m/V) CDI	$3,65 \times 10^8$	51,66

7,5% (m/m) L-Cisteína		
Amostra	Média CFU/mL	% Redução
Controlo	$2,11 \times 10^8$	-----
Algodão	$7,55 \times 10^8$	-----
0% (m/V) CDI	$4,20 \times 10^8$	44,37
4% (m/V) CDI	$1,27 \times 10^8$	83,18
40% (m/V) CDI	$4,20 \times 10^8$	44,37
60% (m/V) CDI	$2,05 \times 10^8$	72,85

Tabelas 2.7 - Teste de Suspensão para *K. pneumoniae* às 0h, em CFU/mL e respetiva % de Redução.

5% (m/m) L-Cisteína		
Amostra	CFU/mL	% Redução
Controlo	$2,68 \times 10^5$	-----
Algodão	$1,18 \times 10^5$	-----
0% (m/V) CDI	$5,25 \times 10^4$	55,32
4% (m/V) CDI	$3,78 \times 10^4$	67,87
40% (m/V) CDI	$5,33 \times 10^4$	54,61
60% (m/V) CDI	$5,59 \times 10^4$	52,45

7,5% (m/m) L-Cisteína		
Amostra	CFU/mL	% Redução
Controlo	$2,68 \times 10^5$	-----
Algodão	$1,18 \times 10^5$	-----
0% (m/V) CDI	$4,39 \times 10^4$	62,66
4% (m/V) CDI	$2,40 \times 10^4$	79,57
40% (m/V) CDI	$9,00 \times 10^4$	23,40
60% (m/V) CDI	$1,00 \times 10^4$	14,89

Tabelas 2.8 - Teste de Suspensão para *K. pneumoniae* às 24h, em CFU/mL e respetiva % de Redução.

5% (m/m) L-Cisteína		
Amostra	CFU/mL	% Redução
Controlo	$6,48 \times 10^7$	-----
Algodão	$2,45 \times 10^8$	-----
0% (m/V) CDI	$1,50 \times 10^8$	38,78
4% (m/V) CDI	$2,60 \times 10^7$	89,39
40% (m/V) CDI	$8,95 \times 10^7$	63,47
60% (m/V) CDI	$9,70 \times 10^7$	60,41

7,5% (m/m) L-Cisteína		
Amostra	CFU/mL	% Redução
Controlo	$6,48 \times 10^7$	-----
Algodão	$2,45 \times 10^8$	-----
0% (m/V) CDI	$1,34 \times 10^8$	45,51
4% (m/V) CDI	$3,05 \times 10^7$	87,55
40% (m/V) CDI	$1,60 \times 10^8$	34,69
60% (m/V) CDI	$6,60 \times 10^7$	73,06

Os resultados relativos à inibição do crescimento microbiano de ambas as estirpes estão representados graficamente (Figuras 2.4 e 2.5). Tal como referido anteriormente estas percentagens de redução foram obtidas após 0 e 24h de incubação do tecido em contacto com o respetivo inóculo bacteriano.

A inibição do crescimento microbiano para ambas as estirpes é apresentada relativamente à concentração de agente ativador aplicado ao tecido, para as duas concentrações de L-Cisteína, 5 e 7,5% (m/m).

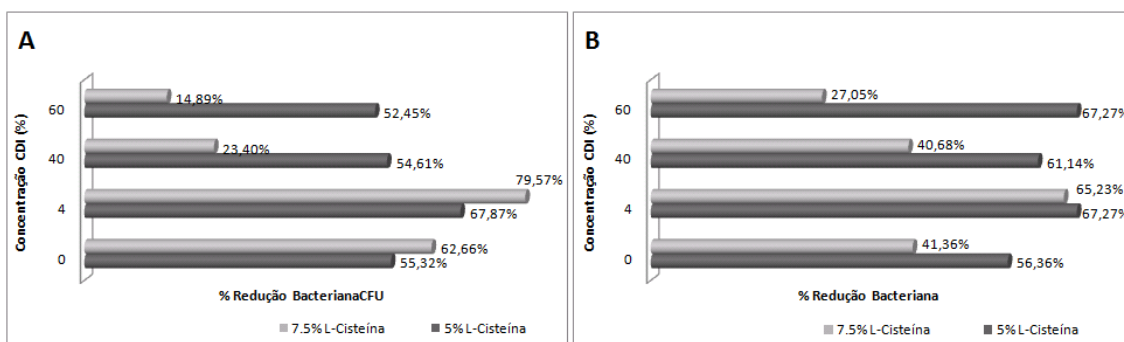


Figura 2.4 - Gráficos relativos à % Redução do crescimento microbiano para *K. pneumoniae* e *S. aureus* (A e B, respetivamente), às 0h - todos estes valores são obtidos por comparação com o algodão não modificado.

Tal como é observável (Figura 2.4 A e B), e à semelhança de outros testes realizados anteriormente a condição de ativação mais propícia a imobilizar maior quantidade de L-Cisteína e conseqüentemente maior efeito inibitório sobre o crescimento dos microrganismos é a de 4% (m/V), cujos valores de redução rondam sempre os 70%. O valor mais elevado para *K. pneumoniae* é de 79,57% relativamente a uma concentração de 7,5% (m/m) L-Cisteína, e de 67,27% para *S. aureus* relativamente à concentração de 5% (m/m) L-Cisteína, sendo que neste caso a diferença de inibição em relação à concentração de 7,5% (m/m) não é significativa, sendo ambos referentes à solução de ativação a 4% (m/V).

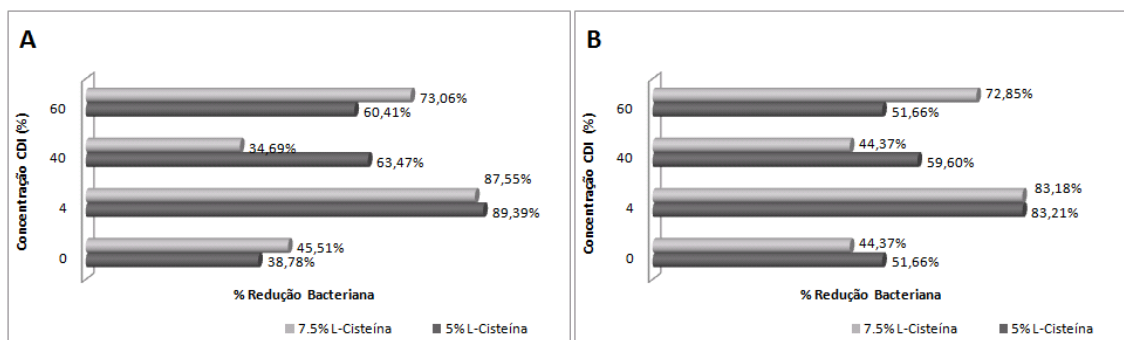


Figura 2.5 - Gráficos relativos à % Redução do crescimento microbiano para *K. pneumoniae* e *S. aureus* (A e B, respetivamente), às 24h - todos estes valores são obtidos por comparação com o algodão não modificado.

Quanto às amostras incubadas durante 24h (Figura 2.5 A e B), os resultados demonstram que as percentagens de redução do crescimento microbiano continuam a ser favoráveis para a concentração de L-Cisteína igual a 5% (m/m). Aliada a esta concentração, mais uma vez, a condição de ativação da superfície têxtil relativa a 4% (m/V) CDI é a mais propícia na demonstração da eficácia antimicrobiana do tecido. Os valores mais elevados são bastante promissores e reveladores do favoritismo destas condições, nomeadamente os 89,39% para *K. pneumoniae* e 83,21% para *S. aureus*.

É perceptível o aumento considerável da atuação inibitória do tecido bioativo após as 24h, principalmente no que diz respeito à melhor condição de ativação do mesmo, 4% (m/V) CDI.

A inibição no crescimento microbiano demonstrada pelas amostras de 0% (m/V) CDI pode ser explicada, uma vez que pode ocorrer que tenha ficado alguma L-Cisteína retida fisicamente na superfície do algodão.

Este processo de ativação não só se mostra útil em estabelecer a ligação covalente entre a L-Cisteína e a fibra, como verificámos em testes anteriores, como é agora possível verificar que a concentração de ativador mais baixa, 4% (m/V) CDI, é suficiente para obter os melhores resultados relativos à atividade antimicrobiana, em ambas as estirpes. Aliás, no geral, à medida que aumentamos esta concentração, menor vai ficando o valor da % de redução do crescimento bacteriano. Por exemplo, para a *K. pneumoniae* às 24h (Figura 2.5 A) registou-se uma redução do crescimento de 89,39% para uma ativação de 4% (m/V) e funcionalização de 5% (m/m) L-Cisteína, enquanto se aumentarmos a concentração de CDI para os 40% (m/V) esta percentagem decresce até aos 63,47%.

Quanto à concentração de L-Cisteína verificámos que esta é perfeitamente apta a atuar à concentração experimental mais baixa, ou seja, 5% (m/m). Por exemplo, para a estirpe gram-positiva *S. aureus* às 24 horas (Figura 2.5 B), as amostras ativadas com 4% (m/V) CDI e funcionalizadas com 5 e 7,5% (m/m) L-Cisteína apresentam uma diferença na % de Redução de apenas 0,03% (85,60% e 85,57%, respetivamente).

Estes resultados, revelaram-se muito positivos e promissores, embora em comparação com estudos anteriores que envolvem outros métodos, possam apresentar percentagens de redução ligeiramente inferiores, comparativamente ao método de funcionalização do algodão com L-Cisteína mediada por outro processo de ativação de superfície [57]. Este processo consistiu na impregnação da L-Cisteína no tecido por esgotamento, previamente tratado e ativado com um radical estável catalisador de reações de oxidação denominado por TEMPO. Através deste procedimento obtiveram-se percentagens de redução iguais a 85,83% para *S. aureus* e 96,67% para *K. pneumoniae*, para uma concentração de 5% (m/m) L-Cisteína [57]. Enquanto os nossos melhores resultados foram obtidos após as 24h de incubação para a concentração de 5% (m/m) L-Cisteína, relativamente à *K. pneumoniae* a 89,39% e ao *S. aureus* a 83,21%.

Por outro lado, segundo Cabrales *et al.* (2012) num estudo que envolve a funcionalização do algodão com ciclodextrinas (CDs) carregadas com triclosano atingiram-se valores de redução microbiana de aproximadamente 100%, porém quando as amostras são lavadas o triclosano é facilmente removido das CDs promovendo um efeito antibacteriano pouco durável [25], além de ser de salientar os efeitos nefastos já registados do triclosano para a saúde humana.

2.3.3.2. Teste de Difusão em Agar - Avaliação qualitativa

Complementarmente à avaliação quantitativa foram realizados testes de difusão em agar, acerca dos resultados inibitórios sobre o crescimento dos microrganismos referidos, *S. aureus* e *K. pneumoniae*. Estes dados apesar de usufruírem apenas de um caráter qualitativo proporcionam uma percepção visual acerca da atividade antimicrobiana das amostras funcionalizadas, de modo que apenas são apresentados os resultados relativos à melhor condição de ativação do tecido - 4% (m/V) CDI.

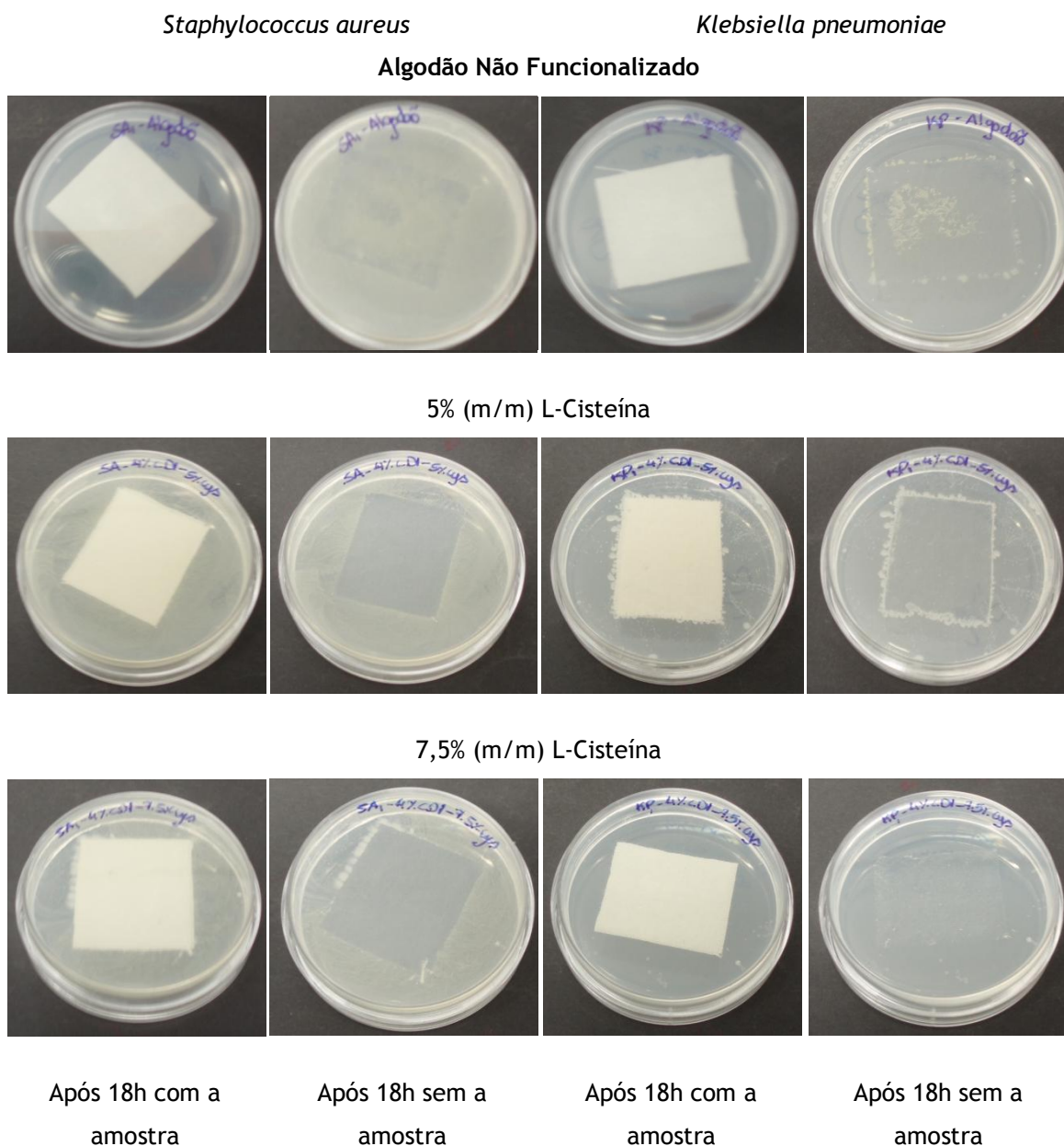


Figura 2.6 - Ensaio difusão em agar: efeito inibitório do algodão não funcionalizado, e das amostras funcionalizadas com 5% e 7,5% (m/m) L-Cisteína e ativadas com 4% (m/V) CDI, contra *S. aureus* e *K. pneumoniae*, após 18h de incubação.

Em primeiro lugar testou-se o algodão não funcionalizado, de maneira a poder comparar-se com as amostras que estão sob o efeito antimicrobiano da L-Cisteína imobilizada no tecido. As amostras relativas ao algodão não funcionalizado demonstram um pequeno efeito visível, que dada a sua falta de perceptibilidade pode ser apenas consequência do comprimir do tecido sobre o agar. Além disto, estes ensaios relativos às amostras modificadas (Figura 2.6), revelaram que existe atividade antimicrobiana contra ambas as estirpes por parte do algodão funcionalizado com L-Cisteína.

No entanto, o efeito antimicrobiano pode ser visualizado na zona de inibição do crescimento bacteriano por baixo da amostra têxtil. Este tipo de inibição (por baixo das amostras) ocorre normalmente quando o agente não possui a capacidade de migrar. Desta forma, a zona de inibição irá restringir-se ao têxtil antimicrobiano e às zonas que estão em contacto direto com o mesmo [51]. Estes resultados vêm então comprovar que as amostras funcionalizadas covalentemente com L-Cisteína apresentam atividade antimicrobiana, inibindo o crescimento dos microrganismos, nomeadamente *S. aureus* e *K. pneumoniae*. Contudo, em face da possibilidade de interpretação duvidosa dos resultados, os ensaios de Suspensão, acima descritos, são fundamentais e necessários para efeitos conclusivos.

2.3.4. Ensaio de Citotoxicidade

Os resultados obtidos durante o ensaio de citotoxicidade relativos à L-Cisteína quando em contacto com as células L929 estão apresentados na Tabela 2.9.

Tabela 2.9 - Resultados do ensaio de citotoxicidade para a amostra de algodão funcionalizada com 5% (m/m) L-Cisteína.

Relação Conteúdo Proteico (A_{540nm} de 3 culturas paralelas)	Média (μ)	Desvio Padrão (η)	I.C. (%)
Branco	0,221	$\pm 0,003$	
Controlo Positivo	0,185	$\pm 0,070$	100
Controlo Negativo	1,180	$\pm 0,020$	0
Controlo Solvente			
33,30%	1,118	$\pm 0,021$	0
22,20%	1,127	$\pm 0,065$	0
14,80%	1,164	$\pm 0,074$	0
9,90%	1,118	$\pm 0,031$	0
6,60%	1,179	$\pm 0,025$	0
4,40%	1,180	$\pm 0,073$	0
Extrato Teste			
33,30%	0,890	$\pm 0,059$	25
22,20%	1,074	$\pm 0,031$	6
14,80%	1,160	$\pm 0,033$	0
9,90%	1,123	$\pm 0,090$	0
6,60%	1,189	$\pm 0,070$	0
4,40%	1,206	$\pm 0,071$	0

As alterações na proliferação celular, devidas à presença de substâncias citotóxicas, foram analisadas através deste teste de inibição do crescimento. Este envolveu o estudo comparativo entre o conteúdo proteico das culturas celulares tratadas com extrato obtido a partir do material em teste com o das culturas controlo não tratadas. No teste de citotoxicidade realizado sob as condições já mencionadas, o extrato obtido a partir do material teste (funcionalizado com 5% (m/m) L-Cisteína) mostrou conferir uma inibição no crescimento (% I.C.) de 25%. Desta forma, a presença do extrato teste em contacto com as células L929 mostrou não ser relevante, no que diz respeito à imposição de perda de viabilidade das mesmas.

É ainda de referir que os controlos efetuados confirmaram a validade do estudo realizado. O crescimento celular das culturas correspondentes ao Controlo Positivo foi inibido a 100%, ao contrário do controlo negativo que não demonstrou qualquer inibição do crescimento celular (0% I.C.), Tabela 2.9.

Estas afirmações podem ainda ser validadas uma vez que, uma substância cuja inibição no crescimento celular seja maior que 30% comparativamente com o controlo solvente, é tida como tendo um evidente efeito tóxico sobre as células [58]. Portanto, uma vez que o ensaio de citotoxicidade para o extrato equivalente à funcionalização de 5% (m/m) L-Cisteína revelou menos de 30% de redução da viabilidade celular (%I.C. igual a 25%), é possível viabilizar a L-Cisteína como um agente antimicrobiano seguro.

2.3.5. Microscopia eletrónica de varrimento (SEM)

A Figura 2.7 representa imagens SEM das fibras de algodão, relativamente à amostra do tecido não tratado e tratado com 4% (m/V) CDI e funcionalizado com 5% (m/m) L-Cisteína. Estas imagens foram obtidas com a finalidade de uma perceção visual sobre a fibra de algodão e perceber se a imobilização do agente antimicrobiano alterava de alguma forma a sua estrutura morfológica. As imagens apresentadas foram obtidas através de uma ampliação de 800x.

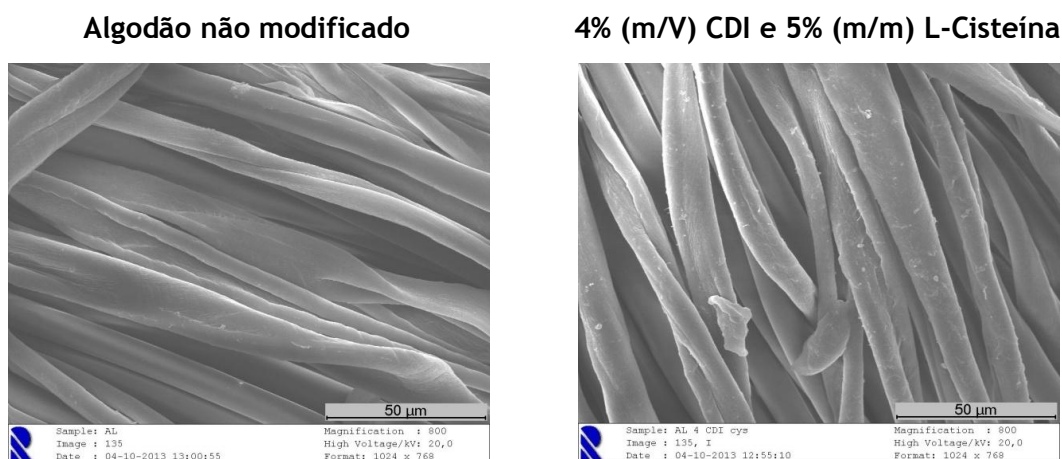


Figura 2.7 - Imagens SEM do algodão, nas respetivas condições.

As imagens presentes na Figura 2.7 são comprovativas de que o tratamento de funcionalização antimicrobiana aplicado ao algodão não afeta significativamente a estrutura morfológica desta fibra. A imagem relativa ao algodão modificado apresenta um ligeiro aumento da rugosidade na sua superfície quando comparada com a do algodão não modificado. No entanto, é visível que apesar do tratamento a que o tecido foi submetido durante a imobilização da L-Cisteína, as propriedades estruturais do algodão são mantidas sem danificar e prejudicar significativamente o uso posterior destas amostras têxteis.

2.3.6. Discussão Geral

As amostras de algodão ativadas com diferentes concentrações de CDI, 0, 4, 40 e 60% (m/V) com 5 e 7,5% (m/m) L-cisteína foram testadas, de modo a comprovar a presença da L-Cisteína imobilizada e posteriormente a sua capacidade antibacteriana.

Resultados da análise por EDX mostraram que a melhor condição de imobilização da L-Cisteína foi satisfeita com 4% (m/V) de ativador CDI em ambas as concentrações de funcionalização, 5 ou 7,5% (m/m). Além disso, com a concentração de 7,5% (m/m) foi detetada mais L-cisteína adsorvida. Os espectros de FTIR-ATR confirmaram a L-Cisteína ligada à superfície do algodão, especialmente para a concentração de ativador de 4 e 40% (m/V) na funcionalização de L-Cisteína a 7,5% (m/m). Com uma concentração de 60% (m/V) CDI, um pico de enxofre menor também foi detetado. Surpreendentemente, nenhuma L-cisteína foi detetada perante a funcionalização de 5% (m/m).

Embora este mecanismo químico tenha provado ser adequado na introdução das desejadas modificações na celulose a 7,5% (m/m) L-Cisteína, a percentagem de redução do crescimento bacteriano quando em contacto com as amostras depois de 24h mostrou que a menor concentração de ativador testada, 4% (m/V) CDI (para 5 e 7,5% L-Cisteína), é suficiente para promover a melhor atividade antimicrobiana para ambas as estirpes. Já em 2009, Martins *et al.* também afirmou que, quanto menor a concentração de pKL imobilizado (Polipéptido de ligação à heparina, composto por L-Lisina e L-leucina e seletivo para heparina), maior era a eficácia de ligação com a heparina. Contrariamente, quantidades elevadas de pKL na superfície, conduziam à perda de seletividade da ligação à heparina [59].

Os resultados FTIR-ATR relativos à concentração de 5% (m/m) L-Cisteína podem dever-se a esta concentração ser demasiado baixa para ser detetada no espectro, uma vez que quanto à atividade antimicrobiana obteve-se o efeito mais proeminente. Esta divergência de resultados pode ser entendida como uma proporção muito baixa de L-Cisteína 5% (m/m) quando comparada com a profundidade de espessura da estrutura nativa do algodão das nossas amostras. Cardenas e Miranda, ao procederem à verificação da incorporação do emulsionante e do ácido em estudo em quitosano também apuraram que estas concentrações eram demasiado baixas para poderem ser detetadas através deste método [60].

Ambas as concentrações de funcionalização provaram inibir estas duas estirpes de referência em todos os ensaios antimicrobianos, embora a de 5% (m/m) evidenciar ser a quantidade de L-cisteína mais eficaz a ser utilizada, sendo claramente precedida por uma ativação da superfície do algodão de 4% (m/V) de CDI.

Quanto ao ensaio de citotoxicidade realizado sobre o extrato resultante da amostra de algodão funcionalizada com 5% (m/m) L-Cisteína, foi claro que este não representou qualquer efeito tóxico que constrangesse a viabilidade celular, uma vez que o valor de % I.C. foi de apenas 25%. A veracidade destes resultados foi comprovada pela realização de controlos solvente.

A análise SEM efetuada sobre a amostra cujas condições de funcionalização foram mais favoráveis ao efeito antimicrobiano pretendido, demonstrou que o tratamento aplicado sobre a fibra de algodão não apresenta alterações significativas da estrutura morfológica da fibra têxtil em estudo.

2.4. Conclusões

Este trabalho teve como objetivo investigar o potencial da L-Cisteína como agente antibacteriano para fibras celulósicas. As estratégias de funcionalização testadas, claramente resultaram no efeito antibacteriano pretendido. As modificações sobre a fibra foram realizadas de forma a imobilizar a L-Cisteína no tecido através da sua amina primária, a qual não é importante no desempenho da sua atividade antibacteriana neste trabalho, uma vez que o objetivo é testar o efeito dos grupos tiol livres da L-Cisteína covalentemente imobilizada sobre o algodão. Foi promovida a ligação entre a amina primária da L-Cisteína e os grupos hidroxilo livres (-OH) da fibra de algodão por ligação química covalente, através de um processo de esgotamento. O agente ativador CDI converteu os grupos -OH livres do algodão em intermediários carbamato-imidazol, que numa fase final reagiram com N-nucleófilo da amina livre da L-cisteína [15].

Por outro lado, os valores MIC para a L-Cisteína mostraram tratar-se de concentrações relativamente elevadas, 48 mg/mL *contra K. pneumoniae* e 6 mg/mL *contra S. aureus*. No entanto, o mecanismo de imobilização de L-Cisteína na superfície do algodão provou exigir concentrações muito menores de L-Cisteína na inibição do crescimento bacteriano 5% (m/m) L-Cisteína. Este valor é muito inferior quando comparado com o efeito antibacteriano da L-Cisteína em solução aquosa. Esta discrepância de valores pode ser atribuída ao facto das moléculas de L-Cisteína dissolvidas em solução aquosa poderem aglomerar entre si, perdendo, assim, grupos reativos. Por esta razão, esta estratégia de imobilização provou ser mais eficiente requerendo soluções menos concentradas de L-Cisteína para originar fibras de algodão com a atividade antibacteriana pretendida.

Capítulo III - Funcionalização do algodão com Cys-LC-LL-37

O presente capítulo constitui uma continuação do estudo acerca da funcionalização bioativa do algodão. A partir dos resultados obtidos anteriormente e relativamente à imobilização da L-Cisteína na referida superfície têxtil, testou-se o mesmo procedimento mas recorrendo a um péptido antimicrobiano modificado, denominado por Cys-LC-LL-37. Além disso também se testou a ativação do algodão com TEMPO e respetiva funcionalização com o péptido citado, para além da ativação via CDI. Desta forma esta fase de investigação não só se propõe a avaliar a eficácia antimicrobiana do Cys-LC-LL-37, como também a testar qual o método mais eficaz na imobilização do mesmo à superfície têxtil.

A oxidação catalítica usando radicais nitróxido estáveis e solúveis em água, tais como o radical 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxi (TEMPO) (Figura 3.1), em meio aquoso revelou ser uma possibilidade interessante na introdução de grupos aldeído e carboxilo em cadeias polissacarídeas.

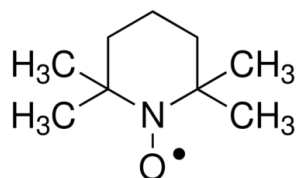


Figura 3.1 - Estrutura química do radical 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxi (TEMPO) (adaptado de [61]).

A reação de oxidação mediada pelo radical TEMPO demonstra uma potencial regioseletividade por grupos hidroxilo primários em polissacáridos, podendo desta forma representar um interessante método de modificação da superfície de celuloses nativas. Os grupos funcionais aldeído e posteriormente carboxilato podem ser eficazmente introduzidos nas fibras de celulose sob condições aquosas suaves a uma temperatura ambiente e pH compreendido entre 10-11 [62].

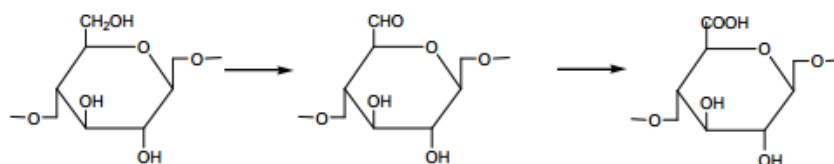


Figura 3.2 - Reações da celulose sob ação do radical TEMPO (adaptado de [63]).

Neste capítulo são descritos os processos utilizados na funcionalização e deteção da presença do péptido antimicrobiano na superfície do algodão perante ambos os processos de ativação da superfície têxtil, recorrendo a um Ensaio colorimétrico do Reagente de Bradford modificado e aplicado a têxteis. Finalmente é apresentada a metodologia de avaliação da eficácia antimicrobiana das amostras têxteis e o respetivo ensaio de Citotoxicidade do Cys-LC-LL-37.

3.1. Materiais e Equipamentos

Os materiais têxteis utilizados, consistiram em tecidos de algodão 100%, e foram submetidos a uma lavagem prévia (adiante descrita) para eliminar contaminações e sujidades.

Os reagentes utilizados ao longo do trabalho experimental são de qualidade pró-análise e encontram-se identificados na tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Reagentes utilizados na funcionalização do algodão com Cys-LC-LL-37.

Reagentes	Fornecedor
Detergente ECE	Bayer
Cys-LC-LL-37	AnaSpec
1,1-Carbonildiimidazole (CDI)	Sigma Aldrich
Tetrahidrofurano Anidro (THF)	Sigma Aldrich
Radical 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil (TEMPO)	Sigma Aldrich
Cloreto de Sódio (NaCl)	Sigma Aldrich
Surfatante - Tween-80	Sigma Aldrich
Brometo de Sódio (NaBr)	Sigma Aldrich
Hipoclorito de Sódio (NaOCl)	Panreac
(3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) - MTT	Sigma Aldrich
Tampão Fosfato-Salino (PBS)	Sigma Aldrich
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Sigma Aldrich
Coomassie Brilliant Blue G-250	Sigma Aldrich
Ácido ortofosfórico	Bhd
Etanol 95%	Sigma Aldrich
Tampão Glicil-Glicina	Sigma Aldrich
Meios de Cultura	
Mueller Hinton Broth (MHB)	LiofilChem
Nutrient Agar (NA)	Panreac
Nutrient Broth (NB)	Panreac

Na tabela 3.2 estão descritos os equipamentos utilizados nos diferentes processos de funcionalização e análise.

Tabela 3.2 - Reagentes utilizados na funcionalização do algodão com Cys-LC-LL-37.

Designação	Equipamento/Modelo
Equipamentos de tingimento	Datacolor AHIBA IR
Microscópio Eletrónico de varrimento /	Rontec Detector / Scanning Electronic
Espectrofotómetro de Raios-X (SEM-EDX)	Microscope Hitachi Model S-2700
Espectrofotómetro (FTIR-ATR)	FTIR-ATR spectrophotometer Thermo-Nicolet is10
Leitor de Microplacas	Biochrom Anthos 2020
Autoclave	Advantage Lab - ALO2-03-100
Medidor de pH	Seven Easy Mettler TOLEDO Inlab®Expert Pro
Micropipetas (20-200µL, 100-1000µL, 500- 5000µL)	Socorex, Pipetman, Eppendorf
Vórtex	Heidolph Reax top Vidrolab 2
Densitómetro McFarland	DEN-1 Grant-bio
Agitador Orbital	Agitorb 200 Aralab
Câmara de Fluxo Laminar	TopSafe 1.2 BioAir EuroClone
Leitor de Microplacas	Biochrom Anthos 2020
Estufa de Incubação	Memmert

3.2. Métodos

3.2.1. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC)

A Concentração Mínima Inibitória (MIC) corresponde à concentração mais baixa, na qual um determinado agente antimicrobiano inibe o crescimento visível de um microrganismo. Esta é mais frequentemente usada como ferramenta de pesquisa na determinação da atividade *in vitro* de novos agentes antimicrobianos. A sua determinação foi efetuada segundo o protocolo descrito na Norma M7-A6 para as estirpes *S. aureus* (ATCC 6538) e *K. pneumoniae* (ATCC 4352), cuja seleção está de acordo com as estirpes referenciadas na norma JIS L 1902:2002 como as adequadas para a realização de ensaios antimicrobianos em fibras têxteis.

Este ensaio foi efetuado utilizando o método de **microdiluição**, em placas de 96 poços.
(vi) Preparou-se o inóculo através de uma suspensão direta das colónias selecionadas a partir de uma placa de agar, previamente incubada durante um período de tempo compreendido entre 18-24h para crescimento dos microrganismos. Em concordância com a Norma esta suspensão foi ajustada a uma turbidez compreendida entre $1-2 \times 10^8$ CFU/mL, a qual equivale a 0,5 na escala McFarland;

- (vii) Posteriormente, adicionaram-se 10 μL da suspensão bacteriana a 990 μL de meio Mueller Hinton Broth (MHB), de modo a atingir uma concentração final compreendida entre $1\text{-}2 \times 10^5$ CFU/mL;
- (viii) A partir de uma solução inicial de péptido de concentração igual a 10 $\mu\text{g/mL}$, fizeram-se sucessivas diluições volumétricas na proporção de 1:2;
- (ix) Em cada um dos poços da placa colocaram-se 50 μL da solução de péptido, nas diferentes concentrações, e 50 μL da suspensão bacteriana de trabalho;
- (x) A incubação foi realizada a 37°C, e após 18-24h efetuou-se a leitura visual acerca do crescimento bacteriano.

3.2.2. Ativação da Superfície do Algodão

Em primeiro lugar e antes de ser utilizado, o algodão foi lavado e tratado como descrito anteriormente, ou seja, usando um detergente referência ECE a uma concentração de 1g/L, durante 30 minutos a 40°C, de forma a eliminar contaminações. Após a lavagem foi passado por água até remoção completa de qualquer resíduo de detergente e seco até ser utilizado. As amostras foram cortadas de igual forma, mais uma vez com 0,4g cada, respeitando normas utilizadas em testes relativos à avaliação da atividade antimicrobiana.

3.2.2.1. Ativação da Superfície do algodão CDI - 4% (m/V)

Através de resultados encontrados no capítulo II, verificou-se que a condição de ativação relativa a uma concentração de 4% (m/V) de CDI, foi a que reuniu melhor aptidão para um acabamento antimicrobiano do algodão. Desta forma, é esta a única condição utilizada nesta etapa do trabalho, sendo executada seguindo o mesmo processo exposto no capítulo anterior: diluiu-se o CDI no mesmo solvente, THF, na concentração pretendida 4% (m/V). Posteriormente as amostras de algodão foram submersas nesta solução, durante duas horas em agitação moderada. Após agitação passaram-se as amostras por THF três vezes e posteriormente por água desionizada, pH 9,5. Todo o procedimento foi realizado em ambiente de total ausência de humidade, recorrendo a uma câmara de luvas com atmosfera substituída por azoto.

3.2.2.2. Ativação da superfície do algodão com TEMPO

Relativamente ao processo de ativação do têxtil com o radical TEMPO, o procedimento é realizado tendo como primeiro passo a preparação da solução de ativação com 0,0125g de TEMPO, 0,125g de Brometo de Sódio (NaBr) em 32 mL de Hipoclorito de Sódio (NaOCl). A solução foi submetida a um acerto de pH final igual a 10.

Posteriormente, as amostras (previamente lavadas, secas e cortadas com 0,4g cada) foram mergulhadas na solução de ativação sob a razão de banho equivalente a 1:25, ou seja, 1g de

tecido para 25mL de solução TEMPO. Permaneceram sob ativação durante 60 minutos, à temperatura ambiente e agitação moderada.

Concluído o período de ativação da superfície do algodão, e antes das amostras terem sido retiradas do banho, mediu-se e acertou-se novamente o pH do banho até um valor de 7. As amostras foram lavadas com água destilada e sob agitação, por um período de 15 minutos, de acordo com o procedimento descrito por Gomes *et al* (2010) e Fukuzumi *et al* (2010) [64] e [65].

3.2.3. Funcionalização do Algodão

Após o processo de ativação da superfície do algodão, por ambos os métodos, procede-se à funcionalização do mesmo com o péptido Cys-LC-LL-37.

Em primeiro lugar, prepararam-se as soluções de péptido a uma concentração de 2,00µg/mL sob uma razão de banho de 1:25. Dissolveu-se o péptido em água desionizada e posteriormente, as amostras foram distribuídas pelas três soluções de funcionalização iguais e preparadas em separado - amostras ativadas com CDI, TEMPO e não ativadas. O processo de funcionalização por esgotamento foi realizado incubando as amostras no equipamento de tingimento a 40°C e 15 rpm, durante 1h. Após o tempo de incubação, as amostras foram retiradas dos respectivos recipientes, lavadas em três banhos de acordo com a norma EN ISSO 105-C06:2010 com uma solução a 1g/L de detergente (AATCC 1993 *Standard Reference Detergent Wob*), a 40°C, durante 60 minutos, e enxaguadas novamente em três banhos separados de água desionizada e secas à temperatura ambiente.

3.2.4. Avaliação da eficácia de Funcionalização

3.2.4.1. Ensaio colorimétrico do Reagente de Bradford na superfície têxtil

Um teste de coloração derivado do ensaio de proteína *Coomassie* (método de Bradford) foi utilizado na determinação de proteínas em fibras neste trabalho. Este método de Bradford modificado baseia-se no facto do complexo proteína-corante que apresenta um azul característico estar presente devido ao contacto entre o corante aniónico *Coomassie Brilliant Blue G-250* numa solução ácida com as proteínas das fibras [66]. As diferentes condições de ativação das amostras irão exibir diferentes intensidades de azul, dependendo da intensidade da absorção.

Em primeiro lugar, a solução de corante foi preparada dissolvendo 100 mg de *Coomassie Brilliant Blue G-250* em 50 mL de etanol a 95% (m/V) e 100 mL de ácido fosfórico, 85% (m/V). Em seguida, a solução anterior foi diluída em 1000 mL de água destilada. Esta solução, antes de ser utilizada foi ainda filtrada [66].

Em segundo lugar, as amostras funcionalizadas e não funcionalizadas foram colocadas em 10mL do reagente preparado anteriormente, à temperatura ambiente, sob agitação moderada durante 5 minutos. Posteriormente, lavaram-se as amostras com água destilada, de modo a remover da fibra o reagente não ligado. A medição da cor das amostras foi realizada através de um espectrofotómetro *Datacolor Spectraflash SF300*, em termos de reflectância (R) em todos os comprimentos de onda do espectro do visível. A reflectância pode ser relacionada com a concentração através da equação *Kubleka-Munk* (1).

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

Onde R representa a reflectância, K diz respeito ao coeficiente de absorção do meio e S ao de difusão. Sendo assim, é de salientar que $K/S = \alpha C$, sendo C a concentração de corante na fibra e α uma constante.

3.2.5. Avaliação da Atividade Antibacteriana

A atividade antimicrobiana das amostras funcionalizadas e não funcionalizadas foi avaliada seguindo o procedimento descrito no capítulo anterior, relativamente aos dois métodos qualitativo e quantitativo. Ambos os métodos, Teste de Suspensão e Teste da Difusão em Agar foram, mais uma vez, realizados adotando a Norma Japonesa Industrial Standart JIS L 1902:2002, recorrendo aos mesmos microrganismos, *S. aureus* (ATCC 6538) gram-positiva e *K. pneumoniae* (ATCC 4352) gram-negativa [50].

3.2.6. Ensaio de Citotoxicidade

Este estudo foi realizado sobre o péptido antimicrobiano aplicado na superfície do algodão, uma vez que a grande aplicação destes tecidos bioativos se prende com o uso médico. Deste modo, foi bastante adequada a realização deste ensaio para que se pudesse apurar se a concentração de Cys-LC-LL-37 aplicada ao tecido apresentaria propriedades citotóxicas quando em contacto com as células, neste caso fibroblastos dérmicos humanos normais (NHDF).

Na determinação da citotoxicidade do péptido Cys-LC-LL-37 recorreu-se ao método do MTT. Este é um método colorimétrico, no qual o MTT é acumulado pelas células por endocitose e a redução do anel tetrazólico deste sal resulta na formação de cristais de formazano de cor azul que se acumulam intracelularmente, e que posteriormente são solubilizados e medidos espectrofotometricamente.

Inicialmente as células foram semeadas em placas de 24 poços (2×10^4 células/poço) em meio de cultura com suplemento de Soro Fetal de Bovino (FBS). Após 48h de aderência, alguns dos poços foram tratados com as diferentes concentrações do péptido Cys-LC-LL-37 (2,00 µg/ml, 5,00 µg/ml e 10,00 µg/ml) e incubou-se a 37°C, numa atmosfera de dióxido de carbono (CO₂) a 5%, durante 48h. As concentrações escolhidas correspondem aos valores MIC para *K. pneumoniae* e *S. aureus*, à concentração de péptido utilizada durante o estudo a ainda à concentração duas vezes superior ao valor MIC, respetivamente. Como controlo foram utilizadas células não tratadas.

Posteriormente, o conteúdo líquido dos poços foi removido e substituído por 200 µL de solução de MTT a uma concentração de 1mg/mL, em Tampão Fosfato-Salino (PBS). As placas foram incubadas durante 4h, a 37°C, com uma atmosfera de CO₂ a 5%, em total ausência de luz. Em seguida, o conteúdo dos poços foi novamente removido, adicionaram-se 200µL de Dimetilsulfóxido (DMSO) e 20µL de tampão Glicil-Glicina, de modo a dissolver os cristais de formazano e a estabilizar a cor, respetivamente.

A absorvância de cada poço foi medida a 570nm através do Leitor de Microplacas *Biochrom Anthos 2020*. A amplitude da viabilidade celular foi expressa através da percentagem de células tratadas viáveis comparativamente com as células do controlo.

Os resultados do ensaio de citotoxicidade foram submetidos a um teste *T-Student*, com um intervalo de confiança de 95%, através da utilização do *software* de estatística IBM SPSS (versão 19.0). Os valores-p inferiores a 0.05 foram considerados estatisticamente insignificantes.

3.2.7. Microscopia eletrónica de varrimento (SEM)

A morfologia e a superfície das fibras de algodão foram visualizadas através de um Microscópio eletrónico de Varrimento *Hitachi Model S-2700*. As amostras foram revestidas com ouro durante aproximadamente 15 minutos, a 20mA antes de serem observadas. As imagens obtidas permitiram observar se as fibras de algodão foram morfológicamente alteradas, quando submetidas ao processo de funcionalização antimicrobiano, precedido dos diferentes métodos de ativação da sua superfície.

3.3. Resultados e Discussão

3.3.1. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC)

Relativamente aos valores MIC para o péptido antimicrobiano selecionado, Cys-LC-LL-37, estes mostraram-se coincidentes no que diz respeito aos dois microrganismos em estudo. Ou seja, quer para a *K. pneumoniae* quer para *S. aureus* o valor MIC obtido foi igual a 5,00 µg/mL.

O Cys-LC-LL-37 é um péptido modificado, o que leva a que não exista ainda informação suficiente relativamente às suas propriedades antimicrobianas incluindo as concentrações mínimas a que este pode ser efetivo. Desta forma, sendo este péptido resultado do incremento de um resíduo de Cisteína à catelicidina humana LL-37, os valores MIC relativos a este último podem fornecer uma informação aproximada sobre a concentração mínima a que pode atuar. Segundo a literatura pode encontrar-se um MIC de 4,2 µg/mL contra *K. pneumoniae* [67] e 3,4 µg/mL contra *S. aureus* [68], relativamente ao LL-37.

É possível observar que estes valores são semelhantes embora ligeiramente inferiores aos obtidos neste estudo, porém é necessário ter em conta que o péptido não é exatamente o mesmo e portanto as suas propriedades de bioatividade podem diferir. No entanto, tal como com a L-Cisteína quando imobilizada no tecido atuou em concentrações bastante inferiores aos respetivos valores MIC, também aqui testámos uma concentração inferior à auferida neste teste para o Cys-LC-LL-37, nomeadamente 2,00µg/mL.

3.3.2. Avaliação da eficácia de Funcionalização

Inicialmente para avaliar a eficácia dos métodos de funcionalização das amostras de algodão recorreu-se novamente a uma análise espectrofotométrica qualitativa de espectroscopia de Raios-X, EDS. A análise elementar sobre a quantidade de enxofre (S) que existe em cada uma das amostras de algodão, o qual não contém este elemento na sua estrutura nativa, iria permitir saber se o péptido Cys-LC-LL-37 teria ficado ligado à fibra, uma vez que possui um resíduo de Cisteína na sua cadeia de aminoácidos.

No entanto, tal procedimento não foi bem-sucedido uma vez que nenhuma das amostras apresentou qualquer vestígio de enxofre (S) na sua superfície. Este resultado pode dever-se à baixa concentração de péptido utilizada e principalmente ao facto do péptido não ser propriamente rico em Cisteína. Assim, estando vastamente disperso por toda a amostra é difícil comprovar a sua imobilização através de espectroscopia de Raios-X, o que não inviabiliza a sua presença. Desta forma, procedeu-se a outro método de deteção do péptido quando imobilizado no algodão, através de um ensaio colorimétrico adaptado a têxteis.

3.3.2.1. Ensaio colorimétrico do Reagente de Bradford

Este método colorimétrico, adaptado ao manuseamento e tratamento de têxteis, ajudou na determinação da presença de proteínas no algodão modificado. Utilizou-se o corante aniônico *Coomassie Brilliant Blue G-250* em solução ácida, que quando em contacto com proteínas forma um complexo proteína-corante de cor azul. Foi a intensidade desta cor azul que forneceu informações acerca da possível imobilização do péptido nas diferentes amostras funcionalizadas, obtida em termos de Reflectância (% Reflectância) e K/S - Tabela 3.3. Todas as leituras foram realizadas a 620nm.

Tabela 3.3 - Ensaio colorimétrico do Reagente de Bradford aplicado na amostra. Valores correspondentes à % Reflectância e K/S das diferentes condições e respetivo controlos.

Amostra	% Reflectância	K/S
Algodão não modificado	18,58	1,78
Branco	18,67	1,77
4% (m/V) CDI	16,42	2,13
TEMPO	16,96	2,06

Contextualizando é possível entender que quanto mais intensa for a cor azul no tecido, maior quantidade de péptido está imobilizada na superfície do algodão. Ou seja, as amostras funcionalizadas serão mais escuras e irão refletir menos luz, o que corresponde a valores de % Reflectância menores e consequentemente valores superiores de K/S, em relação ao algodão não modificado, ou seja, amostras de algodão nativo (não submetidas a qualquer tipo de tratamento).

Numa primeira análise dos resultados apresentados na Tabela 3.3 é notória a diferença entre % Reflectância e respetivo K/S das amostras ativadas e funcionalizadas comparativamente com o algodão não modificado, ou seja amostras de algodão nativo não submetidas a qualquer tratamento.

Do algodão não modificado para as amostras não ativadas mas colocadas em solução com o péptido (Branco), é possível verificar um ligeiro aumento na % de Reflectância, ou seja esta segunda é mais escura mas a diferença é muito insignificante (18,58% e 18,67%, respetivamente), para afirmar que haja proteína no tecido.

Contrariamente, as amostras ativadas e funcionalizadas já demonstram diferenças significativas, quando comparadas com o controlo. A amostra ativada covalentemente com CDI apresenta uma % Reflectância igual a 16,42% e K/S de 2,13, valores bem distintos dos equivalentes ao algodão não modificado: 18,58% e 1,78, respetivamente. Esta diferença demonstra que a amostra onde o péptido foi imobilizado é mais escura, com uma cor mais intensa e consequentemente existe Cys-LC-LL-37 imobilizado na sua superfície. Os valores correspondentes à amostra cuja superfície foi tratada com TEMPO seguem o mesmo

raciocínio, uma vez que os valores da Reflectância e K/S são iguais a 16,96% e 2,06, respetivamente.

Embora a divergência entre os resultados obtidos para os dois métodos de ativação do tecido seja pequena, o processo mais efetivo parece pertencer à imobilização do péptido Cys-LC-LL-37 recorrendo ao CDI a 4% (m/V).

Já recentemente Monier *et al.* (2012) recorreram a este método de determinação de proteínas em têxteis, aquando da imobilização da urease em fibras celulósicas de algodão. Este estudo seguiu o mesmo critério proposto, ou seja, a cor azul indicou a formação do complexo proteína/corante e conseqüentemente sugeriu a imobilização da urease na superfície do algodão [66].

3.3.3. Avaliação da Atividade Antibacteriana

3.3.3.1. Teste de Suspensão - Avaliação quantitativa

Os resultados relativos à eficácia antimicrobiana do procedimento de funcionalização aplicado ao algodão apresentam-se tabelados, e dizem respeito às três condições testadas: amostras “Branco” que não sofreram qualquer processo de ativação da superfície, amostras previamente ativadas com CDI a 4% (m/V) e amostras ativadas com TEMPO.

Em primeiro lugar contaram-se as colónias, que foram convertidas em Unidades Formadoras de Colónias por mililitro (CFU/mL). As percentagens de redução do crescimento microbiano motivado pelas amostras funcionalizadas com o péptido Cys-LC-LL-37 foram sempre calculadas em relação ao algodão não modificado (2, cálculo exemplo).

$$\%R = \frac{\text{Algodão} - 4\%(m/m) \text{ CDI}}{\text{Algodão}} = \frac{5,13 \times 10^4 - 3,08 \times 10^4}{5,13 \times 10^4} \times 100 = 40,00\% \quad (2)$$

Tabela 3.4 - Teste de Suspensão para *S. aureus* às 0h, em CFU/mL e respetiva % de Redução.

Amostra	Média de CFU/mL	% Redução
Controlo	1,43×10 ⁵	-----
Algodão	5,13×10 ⁴	-----
Branco	4,83×10 ⁴	5,85
4% (m/V) CDI	3,08×10 ⁴	40,00
TEMPO	3,40×10 ⁴	29,53

Tabela 3.5 - Teste de Suspensão para *S. aureus* às 24h, em CFU/mL e respetiva % de Redução.

Amostra	Média de CFU/mL	% Redução
Controlo	4,05×10 ⁸	-----
Algodão	3,70×10 ⁸	-----
Branco	3,13×10 ⁸	15,32
4% (m/V) CDI	2,20×10 ⁸	40,54
TEMPO	1,07×10 ⁸	71,18

Tabela 3.6 - Teste de Suspensão para *K. pneumoniae* às 0h, em CFU/mL e respetiva % de Redução.

Amostra	Média de CFU/mL	% Redução
Controlo	2,71×10 ⁴	-----
Algodão	1,00×10 ⁴	-----
Branco	9,25×10 ³	7,50
4% (m/V) CDI	7,75×10 ³	22,50
TEMPO	9,00×10 ³	10,00

Tabela 3.7 - Teste de Suspensão para *K. pneumoniae* às 24h, em CFU/mL e respetiva % de Redução.

Amostra	Média de CFU/mL	% Redução
Controlo	4,60×10 ⁷	-----
Algodão	1,98×10 ⁸	-----
Branco	1,62×10 ⁸	18,10
4% (m/V) CDI	1,15×10 ⁸	41,69
TEMPO	9,00×10 ⁷	54,43

De uma forma mais perceptível apresentam-se os resultados relativos às % Redução na Figura 3.3 A e B, sob a forma gráfica.

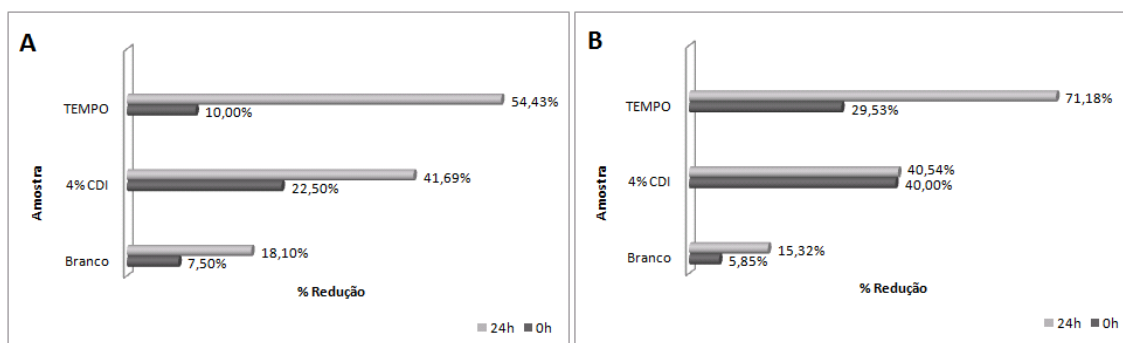


Figura 3.3 - Gráficos relativos à % Redução do crescimento microbiano para *K. pneumoniae* e *S. aureus* (A e B, respetivamente), às 0h e 24h - todos estes valores são obtidos por comparação com o algodão não modificado.

É absolutamente imperial que os resultados relativos à incubação das amostras durante 24h em contacto com o inóculo bacteriano apresentam valores superiores aos registados às 0h, para ambas as estirpes. Aliás existem alguns que não apresentam significância capaz de ser considerada como um efeito inibitório do crescimento bacteriano, nomeadamente os resultados obtidos para o Branco que foram sempre inferiores a 20%. Este é um ponto positivo, uma vez que demonstra a importância do prévio procedimento de ativação da superfície celulósica do algodão antes da funcionalização com péptido Cys-LC-LL-37.

Por outro lado, para amostras ativadas, às 0h existem valores bastante baixos nomeadamente os 10% de redução para amostras ativadas com TEMPO, e os 22,50% de redução para amostras ativadas com CDI, ambas testadas contra *K. pneumoniae*. É ainda perceptível que os resultados mais promissores e potencialmente positivos são obtidos aquando da ativação do algodão com o radical estável TEMPO, obtendo-se valores de 54,34% e 71,18% após 24 horas contra *K. pneumoniae* e *S. aureus*, respetivamente. O melhor resultado relativo à ativação com 4% (m/V) CDI não ultrapassou os 41,69% contra a estirpe gram-negativa e os 40,54% para a estirpe gram-negativa.

Estes resultados demonstram a importância relevante do procedimento de ativação da superfície do algodão para a consequente ligação do péptido Cys-LC-LL-37, uma vez que amostras relativas ao Branco não apresentam resultados apropriados a uma análise de capacidade antimicrobiana. Qualquer valor obtido nesta condição pode apenas dever-se à ligação física do péptido ao tecido.

Apesar dos resultados não apresentarem valores de redução microbiana muito elevados, sendo que o maior é igual a 71,18%, é de notar que a concentração de péptido é bastante baixa 2,00µg/mL em relação à quantidade de amostras funcionalizadas e tamanho das mesmas. Além disso, mesmo com resultados relativamente consideráveis também é de salientar que foi usada uma concentração de péptido inferior ao valor MIC para ambas as estirpes (5,00µg/mL) e mesmo assim é possível atingir a inibição do crescimento bacteriano quando em contacto com as amostras.

Um dos maiores objetivos deste capítulo é provar que os Péptidos Antimicrobianos são perfeitamente capazes de desempenhar a sua função inibitória sobre o crescimento bacteriano em concentrações muito inferiores às alcançadas com outros agentes químicos e naturais aplicados às fibras de algodão. Mesmo com percentagens de redução superiores, as concentrações de agente aplicado são sempre extremamente superiores às que podem ser aplicadas na forma de AMPs.

Rabia *et al.* (2013) testaram a atividade antimicrobiana do algodão funcionalizado com o Quitosano/AgCl-TiO₂. O efeito sinérgico atingido com a formação de um complexo entre o quitosano e a prata permite ultrapassar dificuldades relacionadas com o mau manuseamento do tecido causado pelo quitosano. O TiO₂ tem um efeito antimicrobiano adicional. Este

processo foi aplicado em diferentes razões de concentração relativamente a ambos os componentes (Quitosano e AgCl-TiO₂) e foram obtidas diferentes % de redução tendo em conta esta razão. Por exemplo, os melhores resultados relativos à eficácia antimicrobiana foram atingidos aos 100% de Redução contra *S. aureus* quando a concentração de Quitosano era de 4g/L e a de AgCl-TiO₂ de 20g/L. Contra a *E. coli* atingiu os 98% para as concentrações de Quitosano e AgCl-TiO₂ iguais a 5g/L e 15g/L, respetivamente [23].

É de salientar que estes resultados mostram percentagens de redução bastantes elevados, porém também se tratam de concentrações de agente muito superiores comparativamente com as que se podem aplicar de AMPs. No caso do péptido Cys-LC-LL-37, apenas se aplicou a concentração de 2,00µg/mL e mesmo assim foi detetada uma inibição do crescimento microbiano de 71,18% e outra de 54,34%. Por exemplo, num estudo anterior sobre a atividade antimicrobiana do quitosano, uma %R aproximadamente igual à atingida com Cys-LC-LL-37 (71,07%, para o quitosano) apenas foi atingida quando o agente foi aplicado a uma concentração igual a 5g/L [68].

No entanto, os resultados obtidos ficam um pouco aquém de muitos resultados obtidos aquando da aplicação outros agentes antimicrobianos como o triclosano. Por exemplo, Mehmet Orhan *et al.* atingiram Redução bacteriana de 94,93% contra *S. aureus* e 95,20% contra *E. coli* (estirpe gram-negativa). Por outro lado, é importante salientar que estes resultados são obtidos com concentrações de triclosano que variaram entre 0.1 e 33mg/mL, ou seja, concentrações muito superiores às utilizadas com péptidos, neste caso 2.00µg/mL de Cys-LC-LL-37 [44].

3.3.3.2. Teste de Difusão em Agar - Avaliação qualitativa

A avaliação qualitativa relativa à eficácia antibacteriana dos processos aplicados à fibra de algodão foi complementada através do Teste de Difusão em Agar, que permitem a análise qualitativa dos mesmos. Este teste foi realizado para amostras de algodão não modificadas; funcionalizadas com Cys-LC-LL-37, mas não ativadas (Branco); ativadas com 4% (m/V) CDI e funcionalizadas com Cys-LC-LL-37; e ativadas com TEMPO e funcionalizadas com Cys-LC-LL-37. (Figuras 3.4 e 3.5)

Durante este teste é possível criar a imagem visual acerca do efeito que o método aplicado no algodão tem sobre o crescimento e desenvolvimento dos microrganismos em causa, nomeadamente *S. aureus* e *K. pneumoniae*.

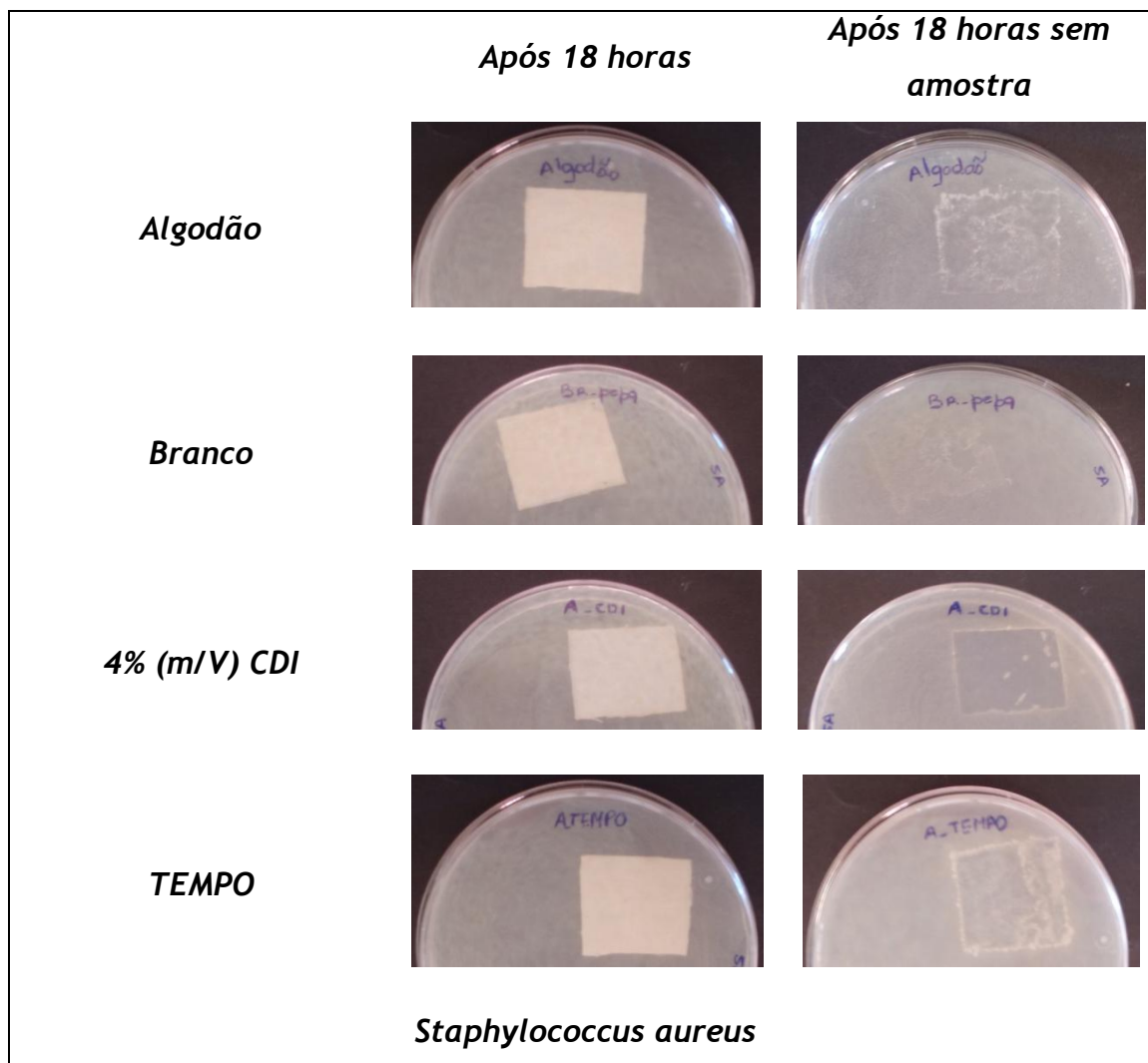


Figura 3.4 - Ensaio de difusão em agar: efeito inibitório do algodão não funcionalizado, da amostra apenas funcionalizada com Cys-LC-LL-37 e das amostras funcionalizadas com Cys-LC-LL-37 e ativadas com 4% (m/V) CDI e TEMPO, contra *S. aureus*, após 18h de incubação.

Estas imagens clarificam bastante o efeito inibitório das amostras funcionalizadas sobre o crescimento da estirpe gram-positiva *S. aureus*. Nas amostras atinentes ao algodão não modificado e ao Branco é possível verificar que as poucas marcas existentes podem ser devidas única e exclusivamente ao comprimir do tecido sobre o agar. Como era de esperar as amostras funcionalizadas, quer com CDI quer com TEMPO apresentam uma zona de inibição bastante notória, principalmente no que diz respeito ao primeiro método.

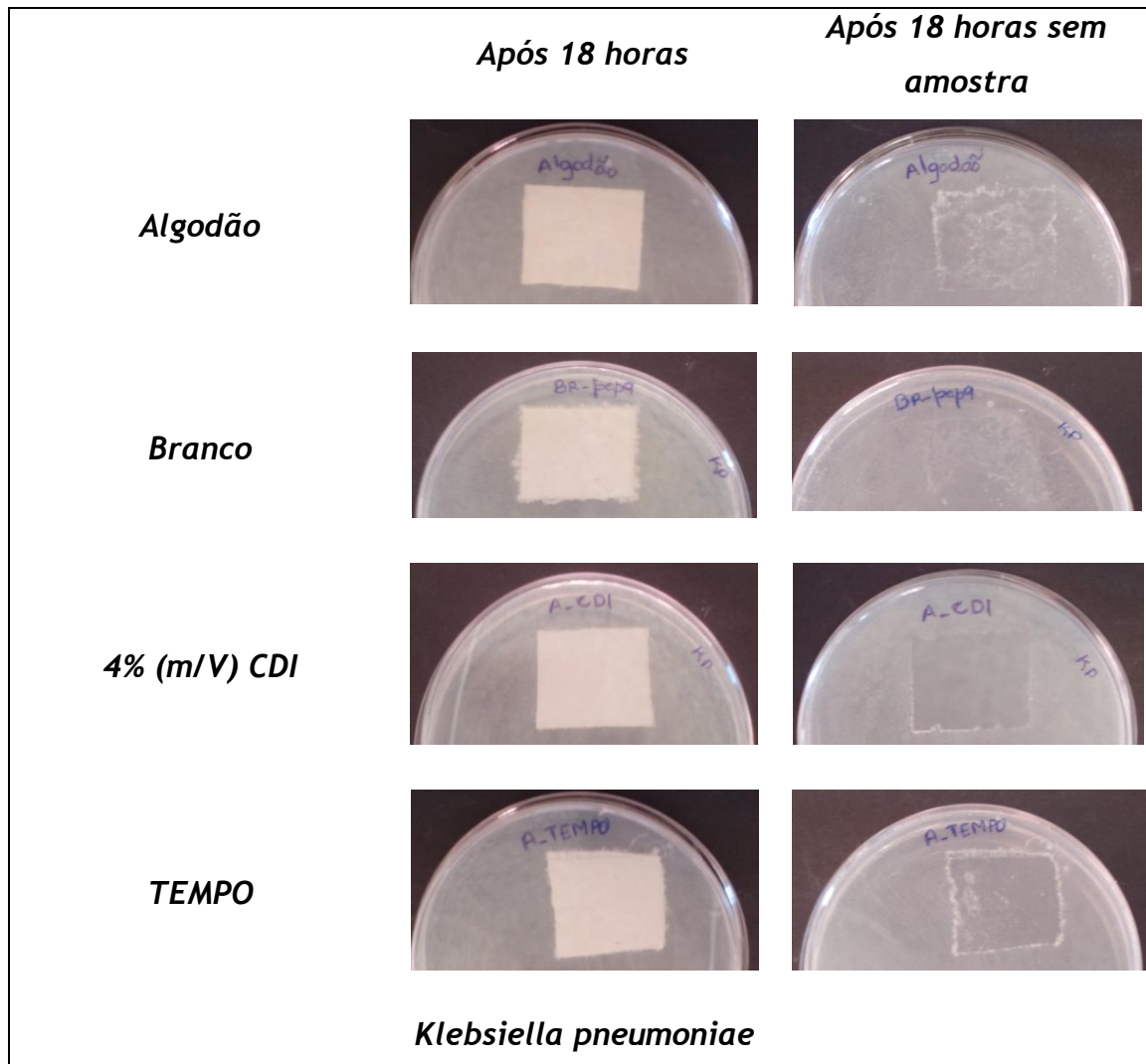


Figura 3.5 - Ensaio de difusão em agar: efeito inibitório do algodão não funcionalizado, da amostra apenas funcionalizada com Cys-LC-LL-37 e das amostras funcionalizadas com Cys-LC-LL-37 e ativadas com 4% (m/V) CDI e TEMPO, contra *K. pneumoniae*, após 18h de incubação.

Quanto ao efeito inibitório da *K. pneumoniae* (Figura 3.5), é mais uma vez possível ver as diferenças evidentes entre as amostras que foram submetidas aos processos de ativação, relativamente ao algodão não modificado e também o somente não ativado (Branco).

Em todas as amostras ativadas e posteriormente funcionalizadas com Cys-LC-LL-37 é possível verificar que a zona de inibição do crescimento bacteriano se encontra apenas por baixo da amostra têxtil, sendo que as imagens correspondentes ao ensaio com a amostra presente na placa não apresentam a formação desta zona em torno do tecido.

Este padrão de inibição, localizado apenas debaixo das amostras ocorre normalmente quando o agente não possui a capacidade de migrar. Este é o caso do nosso agente, que provocou a restrição da sua zona de inibição às zonas que estão em contacto direto com o

tecido e ao próprio têxtil antimicrobiano em conformidade com outros estudos efetuados sobre amostras têxteis [51].

Estes resultados evidenciam as capacidades antimicrobianas do péptido aplicado para ambas as estirpes. Consequentemente, validam também a eficácia dos procedimentos precedentes à funcionalização, responsáveis pela imobilização do péptido no tecido, tanto recorrendo ao composto orgânico CDI como ao radical TEMPO.

3.3.4. Ensaio de Citotoxicidade

O efeito citotóxico do péptido em estudo foi avaliado *in vitro* com fibroblastos. A viabilidade celular foi testada à concentração correspondente ao valor MIC do péptido, 5,00µg/mL, à concentração peptídica utilizada durante o estudo, 2,00µg/mL e ainda a uma concentração duas vezes superior ao valor MIC, 10,00 µg/mL (Tabela 3.8 e Figura 3.6). Apesar da não utilização da concentração igual a 5,00µg/mL, foi considerada pertinente a avaliação do seu efeito citotóxico neste estudo, uma vez que corresponde ao valor da menor concentração de Cys-LC-LL-37 a inibir o crescimento das estirpes estudadas e por ser uma concentração a considerar, num processo de otimização posterior.

Tabela 3.8 - Resultados obtidos na determinação do efeito citotóxico do péptido Cys-LC-LL-37 em contacto com fibroblastos.

Ensaio de Citotoxicidade - Péptido Cys-LC-LL-37				
	Controlo	2,00 µg/mL	5,00 µg/mL	10,00 µg/mL
Média (µ)	0,182666667	0,201666667	0,182333333	0,181666667
Desvio Padrão (η)	0,013316656	0,016072751	0,013796135	0,007094599
Viabilidade Celular relativamente ao controlo (%)	100	110,4014599	99,81751825	99,45255474
Diferença de Variação em relação ao Controlo		-10,40145985	0,182481752	0,181666667

Ensaio de Citotoxicidade (Método MTT) - Cys-LC-LL-37

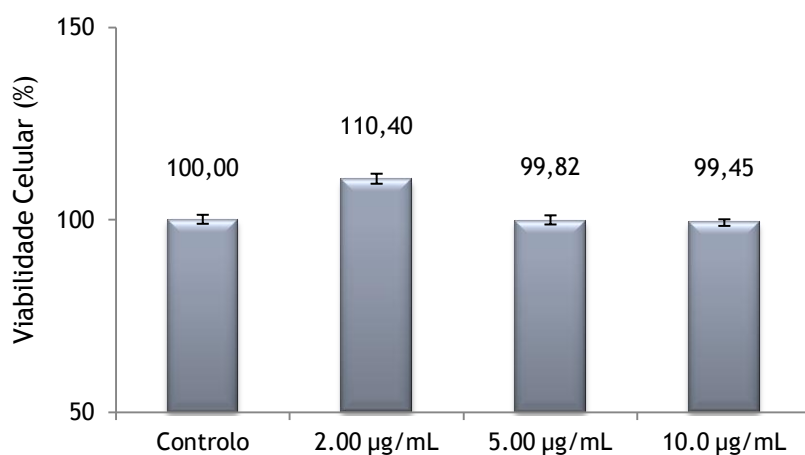


Figura 3.6 - Viabilidade das células NHDF relativamente ao controlo, expostas a 2,00, 5,00 e 10,00µg/mL de Cys-LC-LL-37.

É possível verificar que nenhuma das concentrações testadas demonstra ter um comportamento capaz de inviabilizar o crescimento destas células. A concentração usada na funcionalização do algodão apresentou uma %Viabilidade superior a 100% (110,40%) e a concentração mais elevada de 99.45%, enquanto o valor MIC permaneceu com 99,82%. Estes valores revelam ser bastante promissores, uma vez que mesmo usando uma concentração de péptido cinco vezes superior à utilizada não existe efeito tóxico para as células humanas.

Ensaio de citotoxicidade *in vitro* sobre o péptido LL-37 foram realizados anteriormente. Lehrer *et al.* (1999) chegaram à conclusão que concentrações entre 50-100µg/mL deste péptido eram suficientes para inviabilizar as células em estudo [70].

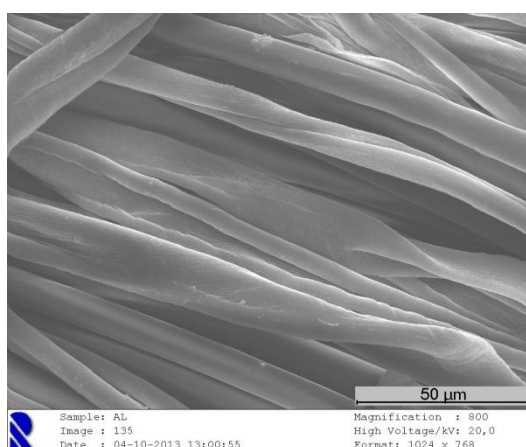
Mais recentemente Ling *et al.* (2006) demonstraram que não ocorrera efeito tóxico sobre HCECs (células epiteliais da córnea humana) para concentrações de LL-37 iguais e inferiores a 10µg/mL. No mesmo estudo, quando a concentração era superior a 10µg/mL este péptido tornava-se citotóxico para as células em estudo [71].

As concentrações do péptido Cys-LC-LL-37 testadas são bastante inferiores aos 50 µg/mL testados anteriormente e não ultrapassam os 10µg/mL também já testados para LL-37, e nenhuma das três concentrações apresentou qualquer efeito tóxico sobre os fibroblastos dérmicos. É de referir como importante evidência da segurança citotóxica da concentração peptídica em estudo que apenas uma alteração na viabilidade celular abaixo dos 30% comparativamente com o controlo, é considerada como tóxica para as células em estudo [51].

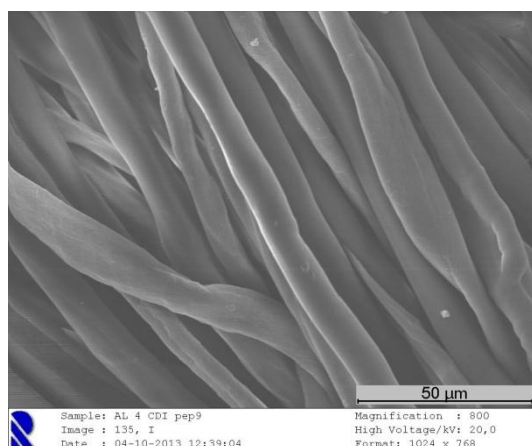
3.3.5. Microscopia eletrônica de varrimento (SEM)

A imagens SEM relativas ao algodão, dizem respeito às amostras do tecido não tratado, tratado com 4% (m/V) CDI e funcionalizado com o péptido Cys-LC-LL-37, e ainda à amostra tratada com TEMPO e funcionalizada com o mesmo péptido (Figura 3.7). Através desta figura é possível verificar se algum dos tratamentos aplicados afetou a estrutura morfológica ou a superfície do algodão e conseqüentemente as suas propriedades. As imagens apresentadas foram obtidas através de uma ampliação de 800×, sendo possível verificar se as fibras foram afetadas após a imobilização do péptido, por comparação com a amostra do algodão não modificado.

Algodão não modificado



4% (m/V) CDI e Cys-LC-LL-37



TEMPO e Cys-LC-LL-37

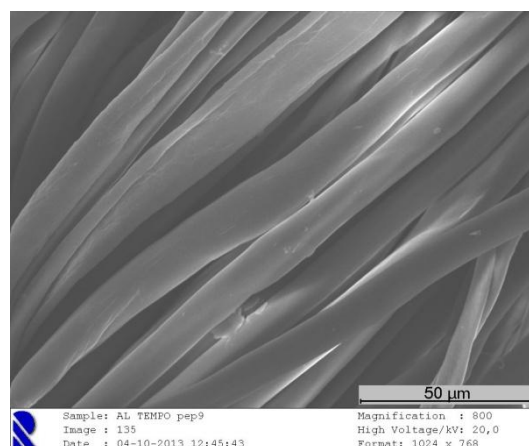


Figura 3.7 - Imagens SEM do algodão, nas respectivas condições, ampliação de 800×.

Nenhum dos processos de ativação da superfície têxtil parece ser responsável pela alteração estrutural das fibras de algodão, dado que por comparação entre as imagens não existem alterações em relação ao algodão não modificado. É possível também notar que quando o tratamento implicou a imobilização da L-Cisteína havia, ainda que ligeiras, algumas alterações no tecido nomeadamente no que diz respeito à rugosidade da sua superfície. Este

facto também pode dever-se à elevada concentração de L-Cisteína aplicada em comparação com a de péptido e ao tempo de incubação superior (24 horas e 1 hora, respetivamente).

Estas imagens (Figura 3.7) ajudam então a perceber que mesmo submetendo o tecido a dois tratamentos diferentes, prévios à imobilização do péptido, nenhum deles afeta a estrutura morfológica do tecido em estudo, e portanto as suas características nativas, assim como a posterior funcionalização do mesmo. Contrariamente a outros estudos, por exemplo, o mesmo estudo SEM efetuado aquando do tratamento plasmático aplicado ao algodão com finalidade antimicrobiana realizado por Kan *et al.* (2013) demonstrou o aparecimento de alterações morfológicas significativamente visíveis no tecido, provocando danos na superfície têxtil, devido a partículas reativas formadas pelo plasma [72].

3.4. Conclusões

O grande objetivo deste capítulo esteve relacionado com a imobilização de um péptido antimicrobiano, Cys-LC-LL-37, na superfície celulósica do algodão, recorrendo à ativação prévia do tecido através de dois métodos distintos já utilizados na funcionalização com L-Cisteína.

Os péptidos antimicrobianos (AMPs) têm-se tornado numa forte aposta terapêutica, dado que fazem parte do sistema imunitário de todos os organismos multicelulares. Além desta característica, os AMPs apesar de mais caros atuam em concentrações muito baixas, relativamente, por exemplo, à L-Cisteína.

O péptido selecionado é um AMP modificado, através da introdução de resíduo de Cisteína na extremidade da catelicidina humana LL-37 mediada por um ligando de 6 carbonos (LC). Como já mencionado, a família das catelicidinas atua sobre as membranas bacterianas formando dobras de modo a adquirir hélices α anfipáticas.

Conhecidas as suas propriedades antimicrobianas, selecionou-se um péptido que pode aliar estas características à eficácia da Cisteína já comprovada.

O péptido Cys-LC-LL-37 foi submetido à avaliação acerca dos valores MIC para ambas as estirpes em estudo, na qual se obteve uma concentração de 5,00 μ g/mL para cada uma.

Para comprovar a presença do péptido no algodão recorreu-se a um ensaio colorimétrico com o reagente de Bradford adaptado à aplicação em têxteis. Este ensaio baseou-se na formação de um complexo proteína-corante (ou seja, o péptido e a fibra de algodão tratada com o corante) nas amostras funcionalizadas com Cys-LC-LL-37, comparativamente com o algodão não modificado. Sob a forma de % de Reflectância foi possível comprovar a presença do péptido nas amostras ativadas com CDI e TEMPO e funcionalizadas, uma vez que esta percentagem foi sempre inferior à do algodão não modificado.

A eficácia antibacteriana determinada quantitativamente permitiu observar que o efeito antimicrobiano das amostras de algodão modificadas é sempre mais notório após as 24h de incubação, para ambas as estirpes bacterianas.

Os resultados relativos à percentagem de redução do crescimento bacteriano foram também esclarecedores quanto à necessidade de um processo de ativação que anteceda a imobilização do péptido, uma vez que as amostras que não sofreram esta etapa apresentam percentagens de redução sempre inferiores a 20%, mesmo após as 24h de incubação.

O método de ativação que mostrou ser mais eficaz na imobilização do AMP à fibra de algodão foi o que incluiu a utilização do radical estável TEMPO, uma vez que assim foram atingidas as maiores %s de Redução, após as 24 horas de incubação contra *K. pneumoniae* e *S. aureus*, 54,43% e 71,18% respetivamente.

Contrariamente ao esperado, uma vez analisados os resultados do ensaio colorimétrico, o método de ativação que mostrou ser mais eficaz na imobilização do AMP à fibra de algodão foi o que incluiu a utilização do radical estável TEMPO, uma vez que assim foram atingidas as maiores %s de Redução, após as 24h de incubação contra *K. pneumoniae* e *S. aureus*, 54,43% e 71,18% respetivamente. Os valores mais elevados obtidos para a concentração de ativação de 4% (m/V) CDI ocorreram também às 24h, mas não ultrapassaram os 41,69% contra *K. pneumoniae* e os 40,64% contra *S. aureus*.

O efeito inibitório sobre o crescimento dos microrganismos foi provado visualmente através do teste da difusão em agar, cuja zona de inibição é bastante notória nos locais de contacto com a amostra funcionalizada com o péptido selecionado.

Quanto aos ensaios citotóxicos, nenhuma concentração testada representou uma possível causa da perda da viabilidade das células, o que torna a sua aplicação viável e segura. Aliás mesmo aumentando cinco vezes a concentração utilizada e duplicando o valor MIC, ou seja com uma concentração de 10,00µg/mL, a % de viabilidade celular para NHDF permanece a 95,45%.

Relativamente às imagens SEM, estas demonstram que as amostras funcionalizadas não apresentam alterações sobre a morfologia nativa do algodão, uma vez comparadas com a amostra controlo (algodão não modificado). Há ainda que salientar que mesmo sendo o tratamento com TEMPO mais efetivo no que diz respeito à % de Redução bacteriana, nenhum processo de ativação da superfície têxtil, com TEMPO ou CDI, influencia a organização estrutural das fibras do algodão.

Capítulo IV - Conclusões Finais

O estudo realizado permitiu comprovar a aclamada atividade antimicrobiana da L-Cisteína. Igualmente importante foi avaliar a eficácia do tratamento prévio do algodão, para uma eficiente imobilização da L-Cisteína na superfície têxtil.

Este procedimento foi efetuado recorrendo à ativação da superfície do algodão com um composto orgânico útil na modificação de estruturas celulósicas (CDI), atuando sobre grupos hidroxilo (-OH) livres. O composto intermediário formado facilita a ligação da L-Cisteína através do seu grupo NH_2 . Assim, este composto foi colocado em contacto com o algodão em solução sob ação de diversas concentrações 0, 4, 40 e 60% (m/V). Posteriormente, a ligação covalente da L-Cisteína foi realizada em duas concentrações distintas, 5 e 7,5% (m/m).

Numa primeira fase, testou-se a presença da L-Cisteína na superfície têxtil e depois a sua eficácia antibacteriana. A presença da L-Cisteína no tecido foi comprovada por SEM-EDS, relativamente à quantidade de enxofre presente na superfície do mesmo e por análise FTIR-ATR, onde foram encontradas evidências da presença da L-Cisteína, nomeadamente o aparecimento do pico característico da ligação S-H dos grupos $-\text{CH}_2\text{SH}$, a 2599cm^{-1} . Nestes ensaios, as amostras funcionalizadas com 7,5% (m/m) L-Cisteína apresentavam indícios de maior eficácia de imobilização da mesma.

A inibição do crescimento bacteriano ocorreu essencialmente após 24 horas de incubação. A condição de ativação mais propensa a induzir maior efeito inibitório correspondeu aos 4% (m/V) CDI e surpreendentemente com 5% (m/m) L-Cisteína.

É importante salientar que este método se mostrou bastante eficaz, uma vez que as concentrações de L-Cisteína utilizadas atingiram valores potencialmente positivos, mesmo sendo bastante inferiores aos valores alcançados na determinação da menor concentração inibitória (MIC) para as estirpes em estudo, 48mg/mL contra *K. pneumoniae* e 6mg/mL contra *S. aureus*.

Perante estes resultados, esta foi a condição de ativação selecionada (4% (m/V) CDI) para a realização do estudo subsequente.

Numa fase posterior foi realizada a funcionalização do algodão com um péptido antimicrobiano modificado, derivado da catelicidina humana LL-37, cujas propriedades antimicrobianas são uma potencial referência. Além disto este péptido foi modificado através da implementação de um resíduo de Cisteína à cadeia peptídica do LL-37, cujos incrementos na eficácia antibacteriana já foram comprovados quando adicionada em outros péptidos.

Neste capítulo não só se estudou a atividade antimicrobiana do péptido Cys-LC-LL-37, como se testou qual o melhor método de imobilização do mesmo à superfície do algodão.

Inicialmente, por falha na deteção do péptido através da análise por espectrofotometria de Raios-X, recorreu-se ao ensaio colorimétrico do Reagente de Bradford adaptado a fibras têxteis. Este ensaio baseando-se na intensidade da cor azul, resultante da formação do

complexo proteína-corante, permitiu estabelecer um contraste entre as amostras funcionalizadas e o algodão não modificado. Por exemplo, em termos de percentagem de Reflectância as amostras ativadas e funcionalizadas com o péptido apresentaram valores mais baixos que o algodão não modificado, ou seja, são mais escuras logo é maior a quantidade de proteína que se ligou ao corante.

Mais uma vez, a inibição do crescimento bacteriano resultou maioritariamente de uma incubação de 24 horas. Além disto foi notória a necessidade de implementação de um método de modificação da estrutura morfológica do algodão, prévia à imobilização do péptido, uma vez que as amostras não ativadas não demonstraram valores apropriados a uma análise de atividade antibacteriana.

Os valores mais elevados quanto à redução do crescimento bacteriano ocorreram aquando da utilização do radical TEMPO. Este método demonstrou maior eficiência, uma vez que quando se recorreu à concentração de CDI 4% (m/V), obtiveram-se valores mais baixos de redução microbiana.

O efeito antimicrobiano que resulta dos ensaios realizados provém da atividade inibitória do péptido aplicado à fibra. Porém, neste estudo era também importante clarificar qual o melhor método de imobilização do mesmo no algodão. Portanto, quanto melhores os resultados relativos à inibição do crescimento microbiano melhor o método de imobilização, pois resulta numa maior quantidade de Cys-LC-LL-37 ligada ao tecido.

A citotoxicidade do péptido em estudo foi testada, sendo que não apresentou valores que inspirassem apreensão relativamente ao efeito citotóxico do péptido antimicrobiano.

A análise SEM foi útil ao permitir observar que os tratamentos aplicados ao tecido apesar de lhe conferirem novas propriedades, não alteram a sua estrutura e consequentemente características próprias da fibra de algodão.

No entanto, é preciso ressaltar que quando se funcionaliza o tecido com L-Cisteína, existem pequenas alterações na fibra de algodão, nomeadamente um ligeiro aumento da sua rugosidade. Trata-se de uma ligeira alteração que não ocorre aquando da funcionalização com o péptido Cys-LC-LL-37, e que pode ser fruto da maior concentração de agente utilizado.

Capítulo V - Perspetivas Futuras

Os resultados obtidos durante as diferentes etapas deste estudo deixam em aberto diversas possibilidades de otimização dos vários processos aplicados sobre o algodão, assim como a sua utilização em outros materiais de bases têxtil. Desta forma é fundamental dar lugar a uma investigação mais detalhada acerca do mecanismo de ação da L-Cisteína sobre a inibição do crescimento microbiano, nomeadamente a ação dos seus grupos sulfidril (-SH) livres e os constituintes da membrana das bactérias, recorrendo a estudos de Citometria de Fluxo. E ainda testar a sua eficácia sobre outras estirpes bacterianas e fúngicas.

É ainda de importância relevante o estudo da aplicação da L-Cisteína como agente antimicrobiano em materiais celulósicos de diferentes origens, nomeadamente a celulose ecológica de origem bacteriana, produzida natural e laboratorialmente, com possível uso na substituição de pele em materiais substitutos de peles animais.

Já com ambições posteriores foi aqui abordada a utilização de péptidos antimicrobianos, nomeadamente Cys-LC-LL-37 por conter cisteína na sua estrutura, como agentes antimicrobianos de potencial uso na indústria têxtil, uma vez que atuam sob concentrações bastante baixas. Esta aplicação, futuramente, poderá ser abordada com o intuito de melhorar a sua imobilização no algodão, testando outras condições de ativação de superfície do mesmo, concentração, e ainda testar o alargamento do espectro de ação nomeadamente contra fungos. Deve também recorrer-se a estudos de determinação do mecanismo de ação deste composto sobre estirpes selecionadas por Citometria de Fluxo.

É também objetivo futuro testar novamente a funcionalização do algodão com prévia ativação da superfície com CDI e submeter estas amostras a testes de durabilidade do efeito antimicrobiano até à perda total do efeito (lavagens sucessivas), uma vez que este procedimento pode ser um potencial método de imobilização permanente do agente antimicrobiano sobre fibras celulósicas que requeiram reutilização.

A aplicabilidade destes processos de manipulação dos tecidos, no sentido de melhorar as suas propriedades e ainda de lhes conferir novas, toma real proporção e importância uma vez que estes agentes foram aplicados para que numa fase seguinte possam ser produtos de cosmética ou materiais de aplicação médica com potencial antimicrobiano seguro e durável.

Capítulo VI - Referências

- [1] Windler, L., Height, M., Nowack B., “Comparative evaluation of antimicrobials for textile applications - Review”, *Environment International*, Vol. 53, p. 62-73 (2013)
- [2] Gao, Y., Cranston, R., “Recent Advances in Antimicrobial Treatments of Textiles”, *Textile Research Journal*, Vol. 78(1), p. 60-72 (2008)
- [3] Joshi, M., Ali, W. S., Purwar, R., “Ecofriendly antimicrobial finishing of textiles using bioactive agents based on natural products”, *Indian Journal of Fibre & Textile Research*, Vol. 37, p. 295-304 (2009)
- [4] Tijana, R., Zemljic, F. L., Novak, M., Kuncic, K. M., Sonjak, S., Cimerman, G. N., Strnad, S., “Antimicrobial efficiency of functionalized cellulose fibres as potential medical textiles”, *Health Care*, p. 36-51 (2011)
- [5] McDonnell, G., Russel, D. A., “Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance”, *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 12(1), p. 147-179 (1999)
- [6] Maillard, Y. J., “Bacterial target sites for biocide action”, *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, Vol. 92, p. 16-27 (2002)
- [7] Li, Q., Mahendra, S., Lyon, D. Y., Brunet, L., Liga, M., Alvarez, P., “Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications”, *Water Research*, Vol. 42, p. 4591-4602 (2008)
- [8] Dastjerdi, R., Montazer, M., “A review on the application of inorganic nano-structured materials in the modification of textiles: Focus on anti-microbial properties”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Vol. 79, p. 5-18 (2010)
- [9] Young-A, S., Byung-Soon, K., Ravikumar, K., Seung-Goo, L., “Imparting durable antimicrobial properties to cotton fabrics using quaternary ammonium salts through 4-aminobenzenesulfonic acid-chloro-triazine adduct”, *European Polymer Journal*, Vol. 42, p. 3059-3067 (2006)
- [10] Wang, Q., Xuerong, F., Gao, W., Chen, J., “Characterization of bioscoured cotton fabrics using FTIR ATR spectroscopy and microscopy techniques”, *Carbohydrate Research*, Vol. 341, p. 2170-2175 (2006)

- [11] Guillen, J. G., Garrido, J. M., “Algodon y celulosa: estructura e propiedades”, Universidade Politécnic da Catalunha, Terrassa (1987)
- [12] Cavaco, P. A., Dissertação de Doutoramento - “Influência da agitação mecânica e da composição enzimática no tratamento do algodão com celulasas”, Escola de engenharia- Universidade do Minho, p. 7-9 (1995)
- [13] Zhou, W., Shao, Z.P., Ran, R., Jin, W. Q., “Functional nano-composite oxides synthesized by environmental-friendly auto-combustion within a micro-bioreactor”, *Materials Research Bulletin*, Vol. 43, p. 2248-2250 (2008)
- [14] Klemm, D., Philipp, B., Heinze, T., Heinze, U., Wagenknecht, W., “Comprehensive Cellulose Chemistry: Fundamentals and analytical methods”, Vol. 1, p. 9-165 (1998)
- [15] Boufi, S., Rei, V. M., Parra, V., Ferraria, A.M., Botelho, A. M., “Grafting of Porphyrins on Cellulose Nanometric Films”, *Langmuir*, Vol. 24, 7309-7315 (2008)
- [16] Nithya, E., Radhai, R., Rajendran, R., Jayakumar, S., Vaideki, K., “Enhancement of the antimicrobial property of cotton fabric using plasma and enzyme pre-treatments”, *Carbohydrate Polymers*, Vol. 88, p. 986-991 (2012)
- [17] Sakai Y., Hayano, K., Yoshioka, H., Fujieda, T., Saito, K., “Chitosa-coating of cellulosic materials using an aqueous Chitosan CO₂ solution”, *Polymers Journal*, Vol. 34, p. 144-148 (2002)
- [18] Lim, S. H., Hudson, M. S., “Application of a fiber-reactive chitosan derivative to cotton fabric as an antimicrobial textile finish”, *Carbohidrate Polymers*, Vol. 56, p. 227-234 (2004)
- [19] Khaled, F., El-bendary, A. M., Elhendawy, G. A., Hudson, M. S., “The antimicrobial activity of cotton fabrics treated with different crosslinking agents and chitosan”, *Carbohydrate Polymers*, Vol. 60, p. 421-430 (2005)
- [20] Matyjas-Zgondek, E., Bacciarelli, A., Rybicki, E., Szykowska, M., Kotodziejczyk, M., “Antibacterial Properties of Silver-Finished Textiles”, *Fibres & Textiles in Eastern Europe*, Vol. 16, p. 101-107 (2008)
- [21] El-Rafie, M.H., Shaheen, T.I., Mohamed, A.A., Hebeish, A., “Bio-synthesis and applications of silver nanoparticles onto cotton fabrics”, *Carbohydrate Polymers*, Vol. 90, p. 915-920 (2012)
- [22] Mehmet, O., Dilek, K., Cem, G., “Use of triclosan as antibacterial agent in textiles”, *Indian Journal of Fibre & Textile Research*, Vol. 32, p. 114-118 (2007)

- [23] Rabia, A. A., Zeeshan, K., Muhammad, H. M., Ick-Soo, K., “Antibacterial property and characterization of cotton fabric treated with chitosan/AgCl-TiO₂ colloid”, *Carbohydrate Polymers*, Vol. 96, p. 326-331 (2013)
- [24] Ramirez, H. E., Contreras-Garcia, A., Fernandes M. J., Concheiro, A., Alvarez-Lorenzo, C., Bucio, E., “Radiation grafting of glycidyl methacrylate onto cotton gauzes for functionalization with cyclodextrins and elution of antimicrobial agentes”, *Cellulose*, Vol. 19, p. 2165-2177 (2012)
- [25] Cabrales, L., Abidi, N., Hammond, A., Hamood, A., “Cotton Fabric Functionalization with Cyclodextrins”, *Journal of Materials and Environmental Science*, Vol. 3(3), p. 561-574 (2012)
- [26] Gouveia, I.C., Sá, D., Henriques, M., “Functionalization of Wool with L-Cysteine: Process Characterization and Assessment of Antimicrobial Activity and Cytotoxicity”, *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 124, p. 1352-1358 (2012)
- [27] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/168149?lang=pt®ion=PT>, consultado dia 15 de Setembro de 2013, às 22h39min.
- [28] <http://cs.stedwards.edu/chem/Chemistry/CHEM43/CHEM43/Thioredox/FUNCTION.HTML> Consultado dia dia 29 de Setembro de 2013, às 16h45min
- [29] Kari, C., Nagy Z., Kóvacs, P., Hernandi F., “Mechanism of the Growth Inhibitory Effect of Cysteine on Escherichia coli”, *Journal of General Microbiology*, Vol. 68, p. 349-356 (1971)
- [30] Gomez, R.F., MONTVILLE, T., Blais, K., “Toxic Effect of Cysteine Against *Salmonella typhimurium*”, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 39, p. 1081-1083 (1980)
- [31] Morris, S. L., Walsh, R. C., Hansen, J. N., “Identification and Characterization of Some Bacterial Membrane Sulfhydryl Groups Which Are Targets on Bacteriostatic and Antibiotic Action”, *The journal of Biological Chemistry*, Vol. 259, p. 13590-13594 (1984)
- [32] Gouveia, I. C., “Nanobiotechnology: A new strategy to develop non-toxic antimicrobial Textiles”, *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, A. Méndez-Vilas (Ed), p. 410-414 (2010)
- [33] Marshall S. H., Arenas, G., “Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology”, *Electronic Journal of Biotechnology*, Vol.6, 271-284 (2003)

- [34] Hassan, M., Kjos, M., Ne, I.F., Diep, D.B., Lotfipour, F., “Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance”, *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 113, p. 725-736 (2012)
- [35] Li, Y., Xiang, Q., Zhang, Q., Huang, Y., Su, Z., “Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application”, *Peptides*, Vol. 37, p. 207-215 (2012)
- [36] Yeaman, M. R., Nannette Y. Y., “Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance”, *Pharmacological Reviews*, Vol. 55, p. 27-55 (2003)
- [37] Epanand, R. M., Vogel, H. J., “Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action”, *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1462, p. 11-28 (1999)
- [38] Jenssen, H., Hamill, P., Hancock, R. E. W., “Peptide Antimicrobial Agents”, *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 19, p. 491-511 (2006)
- [39] Marr, A. K., Gooderham, W. J., Hancock, R., “Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics”, *Current Opinion in Pharmacology*, Vol. 6, 468-472 (2006)
- [40] Scott, N.D., Bishop, B., Van-Hoek, M. L., “Natural and synthetic cathelicidin peptides with anti-microbial and anti-biofilm activity against *Staphylococcus aureus*”, *BMC Microbiology*, Vol. 11, p. 1471-2180 (2011)
- [41] Brogden, K. A., “Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic Inhibitors in bacteria?”, *Nature Reviews Microbiology*, Vol. 3, p. 238-250 (2005)
- [42] William, C. Wim, L., “Describing the Mechanism of Antimicrobial Peptide Action with the Interfacial Activity Model”, *ACS Chemical Biology*, Vol. 5, p. 905-917 (2010)
- [43] Sato, H., Feix, J.B., “Peptide-membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic α -helical antimicrobial peptides”, *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1758, p. 1245-1256 (2006)
- [44] Vandamme, D., Landuyt, B., Luyten, W., Schoofs, L., “A comprehensive summary of LL-37, the factotum human cathelicidin peptide”, *Cellular Immunology*, Vol. 280, p. 22-35 (2012)
- [45] Wiradharma, N., Khan, M., Yong, L. K., Hauser, C., Seow, S. V., Zhang, S., Yang, Y. Y., “The effect of thiol functional group incorporation into cationic helical peptides on antimicrobial activities and spectra”, *Biomaterials*, Vol. 32, p. 9100-9108 (2011)

- [46] Hermeanson, G. T., "Bioconjugate Techniques", Second Edition, Copyright© Elsevier Inc, p.196 (2008)
- [47] Navard, P., "The European Polysaccharide Network of Excellence (EPNOE)", *Springer-Verlag Wien*, p. 295 (2012)
- [48] Boufi, S., Vilar, M. R., Parra, V., Ferraria, A. M., Rego, A. M., "Grafting of Porphyrins on Cellulose Nanometric Films", *Langmuir*, Vol. 24, p. 7309-7315 (2008)
- [49] "Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactérias de Crescimento Aeróbio", Norma Aprovada - Sexta Edição, M6-M7, ISBN 1-56238-486-4, ISSN 0273-3099, Vol. 23 (2)
- [50] "Testing for antibacterial activity and efficacy on textile products", JIS L 1902:2002 (E) (*Japanese Industrial Standard*), ICS 59.080.01
- [51] Gouveia, I.C., Henriques, M., "Functionalization of Wool with L-Cysteine: Process Characterization and Assessment of Antimicrobial Activity and Cytotoxicity", *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 124, p. 1352-1358 (2011)
- [52] DIN EN ISO 10993-5: 2009, Technical Committee ISO/TC 194, "Biological Evaluation of medical devices", Terceira Edição, Parte 5: Testes de Citotoxicidade *in vitro*.
- [53] Kim, Y.H., Nam, C.W., Choi, J.W., Jang, J.H., "Durable antimicrobial treatment of cotton fabrics using N-(2-hydroxy)propyl-3-trimethylammonium chitosan chloride and polycarboxylic acids", *Journal of Applied Polymer Science*. Vol. 9, p. 1567-72 (2003)
- [54] Cottell, A., Denyer, S.P., Hanlon, G.W., Ochs, D., Maillard, J.Y., "Triclosan-tolerant bacteria: changes in susceptibility to antibiotics", *The Journal of hospital infection*, Vol. 72, p. 71-76 (2009)
- [55] Socrates. G., "Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts", John Wiley & Sons, Ltd, Third Edition (2004)
- [56] Chinkap, C., Myunghee, L., Kyung, C., "Characterization of cotton fabric scouring by FTIR-ATR ATR spectroscopy", *Carbohydrate Polymers*, Vol. 58, p. 417-420 (2004)
- [57] Caldeira, E., Dissertação de Mestrado: "Biofuncionalização do algodão com L-Cisteína: estudo do efeito antibacteriano e dos mecanismos de ação contra *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*", Universidade da Beira Interior (2012)

- [58] Borenfreund, E., Borrero, O., “In vitro cytotoxicity assays. Potential alternatives to the Draize ocular allergy test”, *Cell Biology and Toxicology*, Vol. 1, p. 5- 65 (1984)
- [59] Martins, M. C., Curtin, S. A., Freitas, S. C., Salgueiro, P., Ratner, B. D., Barbosa, M., “Molecularly designed surfaces for blood deheparinization using an immobilized heparin-binding peptide”, *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol. 88, p. 162-173 (2009)
- [60] Cardenas, G., Miranda, S. P., “FTIR and TGA studies of chitosan composite films”, *Journal of the Chilean Chemical Society*, Vol. 49, p. 291-295 (2004)
- [61] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/214000?lang=pt®ion=PT>, Consultado dia 25 de Setembro de 2013, às 16h05min
- [62] Saito, T., Shibata, I., Isogai, A., Suguri, N., Sumikawa, N., “Distribution of carboxylate groups introduced into cotton linters by the TEMPO-mediated oxidation”, *Carbohydrate Polymers*, Vol. 61, p. 414-419 (2005)
- [63] Dai, L., Yuan, Y., Sun, X., Zhengjun, Z., “Effect of TEMPO oxidation system on kinetic constants of cotton fibers”, *BioResources*, Vol. 6, p. 2619-2631 (2011)
- [64] Gomes A.P., Mano J.F., Queiroz J.A., Gouveia I.C., “Assessment of bacteria-textile interactions using Scanning Electron Microscopy: A study on LbL chitosan/alginate coated cotton”, *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*, Vol. 1, p. 286-292 (2010)
- [65] Fukuzumi H., Saito T., Okita Y., Isogai A., “Thermal stabilization of TEMPO-oxidized cellulose” *Polymer Degradation and Stability*, Vol. 95(9), p. 1502-1508 (2010)
- [66] Monier, M., El-Sokkary, A. M., “Modification and characterization of cellulosic cotton fibers for efficient immobilization of urease”, *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 51, p. 18-24 (2012)
- [67] Ramos, R., Domingues, L., Gama, M., “LL37, a human antimicrobial peptide with immunomodulatory properties”, *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*, A. Méndez-Vilas (Ed), p. 915-925 (2011)
- [68] Turner, J., Cho, Y., Dinh, N. N., Waring, A. J., Lehrer, R., “Activities of LL-37, a Cathelin Associated Antimicrobial Peptide of Human Neutrophils”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 42, p. 2206-2214 (1998)

[69] Ortega-Ortiz, H., Gutiérrez-Rodríguez, B., Cadenas-Pliego, G., Jimenez, L. I., “Antibacterial Activity of Chitosan and the Interpolyelectrolyte Complexes of Poly(acrylic acid)-Chitosan”, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Vol. 53, p. 623-628 (2010)

[70] Lehrer, R.I., Ganz, T., “Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence”, *Current Opinion Immunology*, Vol. 11, p. 23-27 (1999)

[71] Ling, C.H., Tihomira, D. P., Reins, R.Y., Proske, R.J., McDermott, A.M., “Multifunctional Roles of Human Cathelicidin (LL-37) at the Ocular Surface”, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, Vol. 47, p. 2369-2380 (2006)

[72] Kan, C.W., Lam, Y.L., “Low Stress Mechanical Properties of Plasma-Treated Cotton Fabric Subjected to Zinc Oxide-Anti-Microbial Treatment”, *Materials*, Vol. 6, p. 314-333 (2013)

Capítulo VII - Anexos

Anexo I - Artigo Submetido: Covalent modification of cellulosic-based textiles: a new strategy to obtain antimicrobial properties

**COVALENT MODIFICATION OF CELLULOSIC-BASED TEXTILES: A NEW STRATEGY TO OBTAIN
ANTIMICROBIAL PROPERTIES**

Frederico Nogueira^{1,3}, Joana Vaz³, Erhan Piskin², Isabel Gouveia³

¹ CICS-UBI - Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior (Portugal)

² Center for Bioengineering and Biomedtek, Hacettepe University (Ankara, Turkey)

³ R&D Unit Textile and Paper Materials, University of Beira Interior (Portugal)

Correspondence to:

Isabel C. Gouveia

R&D Unit Textile and Paper Materials, University of Beira Interior

Rua Marquês d'Ávila e Bolama, 6201-001 Covilhã, Portugal

Tel: 351 27 5319825

Fax: 351 27 5319723

e-mail: igouveia@ubi.pt

Abstract

New advances have been released in textile industry. Contributions at the level of textile fiber chains engineering has allowed modification of their structure, production of smart polymers responding to changes in environment, and attachment or entrapment of cells and bioactive molecules. Likewise, our society high demand of hygienic patterns, has increased the intensive research and development of antimicrobial textiles. Applications are being extended to underwear, sportswear, home furnishing, protective clothes, wound-dressings and in areas with high risk of microbial infection, as health care, schools and hotels.

The aim of the present work was to develop a strong, durable and washable microbicidal L-Cys-functionalized cotton by a covalent mechanism. The covalent binding of L-cys onto cellulosic fibers was monitored by SEM-EDS and FTIR analysis. The functionalized cotton presented strong microbial killing rates, with inhibitions of 89% and 83% against *K. pneumoniae* and *S. aureus*, respectively, comparatively with the non-functionalized fabric after 24 hours of incubation.

Keywords: L-cysteine, antimicrobial-textiles, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*

1. Introduction

Throughout last decades hospitals have faced tough challenges regarding growing microbial multi-resistance, especially in immunodepressed patients. The strongest cause for microbial resistance may be due to the abuse of antibiotics use to treat diseases non appropriately, as by cattle and poultry to earn weight [1]. The development of antimicrobial textiles arises as a promising solution to decrease nosocomial infections.

Some compounds have already been tested on textiles, such as Quaternary Ammonium Compounds (QACs), Biguanidines, Silver, Triclosan, and N-Halamines. However, they have proved to be limited on their clinical applications. They have shown cytotoxicity causing skin irritation, toxicity to the environment, reduced spectrum of microbial inhibition (except for silver and N-Halamines), which cause resistances, and gradually lose their bioactivity with use and launderings, with the exception of QACs which establish covalent, very durable bonds with textiles [2, 3].

Furthermore, the mechanisms already tested to covalently attach antimicrobial agents to fabric structures are few, and the most relevant included ionically binding of quaternary ammonium salts on cotton fabrics using a covalently bound adduct that increased anionic sites [4], covalent attachment of a chloromelamine derivative to cotton through nucleophilic substitution reactions [5], fixation of a cyclodextrin derivative to cotton by a nucleophilic substitution reaction between the hydroxyl groups of the cellulose chain and the chlorotriazine ring [6], and the attachment of chitosan to cotton fabric via cross-linking agents [7]. Also trimethoprim and sulfamethoxazole antibiotics were modified to act as reactive dyes and were covalently bonded to cotton surface in order to impart antibacterial properties [8]. Actually, covalent bonding of a molecule to a non-reactive surface (as cotton) requires surface activation [9].

L-Cysteine (L-Cys), with a molecular weight of 121.16 g/mol, is a unique amino acid present in a number of food sources with a sulphur group at the end of its variable side group. It establishes an antimicrobial effect with Gram-positive and Gram-negative bacteria, whose antimicrobial mechanism relies on metabolic disturbance and some membrane depolarization (Estela Caldeira, *et al.* Submitted), thus evidenced as an appealing alternative to antibiotics [10]. Once L-Cys targets are the bacterial membrane due to high reactivity of its -SH group which causes the critical decrease of enzymatic activity and decrease of bacterial metabolism, microorganisms hardly may develop resistance, otherwise they would have to change all their membrane composition and/or organization, which is highly demanding and not energetically worthwhile.

Natural polymers show few adverse reactions, excellent humidity control, biocompatibility and low-allergic responses, due to their similarity to macromolecules which biological environment is prepared to recognize and to deal with metabolically. Cotton is mainly composed of cellulose, which is a natural biodegradable biopolymer, a β -1,4-linked glucan, with -OH at positions 2, 3 and 6. Furthermore, it has unique characteristics as high moisture (hydrophilic), huge fluid retention capacity [11], low impurity content, antistatic behaviour

and good mechanical properties [12]. Due to these properties, cotton fibers are widely used in the health-care and hospital textiles. However, since cotton fibers do not have an antimicrobial effect by themselves, the development of new strategies and processes to give a durable and effective antimicrobial effect to give cotton materials is of the utmost importance [2, 3, 11].

Thus, this work aimed to immobilize L-Cys on cotton textiles through N,N-carbonyldiimidazole (CDI) at different concentrations, which is a surface-activator of hydroxyl groups. In addition, it was also analyzed if these covalently functionalized textiles had antimicrobial capacity. Due to its covalent bond to cellulose surface, it was expected L-Cys to act as a by-contact antimicrobial, which prevents its leaching from the substrates to the surroundings, minimizing the probability of microorganisms acquiring resistance and enhancing its durability to launderings.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Cotton surface activator solution was prepared by dissolving N,N-carbonyldiimidazole (CDI) (Sigma) in Anhydrous Tetrahydrofuran (THF) (Sigma) at an absolute absence of water (glove box chamber with nitrogen replacing atmosphere). Samples were then functionalized in a L-Cysteine (Sigma-Aldrich) solution (ddH₂O) at pH 9.5. *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) and *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352) strains were grown on Nutrient Agar (NA) and Nutrient Broth (NB) (Panreac).

2.2. Methods

2.2.1. Determination of Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of L-Cystein

MIC determination was performed according with macrodilution method. This procedure followed the Standard M07-A6 applied to *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) and *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352), which are the recommended strains for antimicrobial assays on textile fibers, as described in Standard JIS L 1902:2002. Summarily, the minimal inhibitory concentration was determined by serial dilutions of 1:2 in Mueller-Hinton Broth (MHB) (Sigma-Aldrich) with concentrations of L-Cys ranging from 9.7×10^{-2} g/mL to 2.3×10^{-5} g/mL. Bacterial inocula were prepared from fresh overnight liquid cultures and its turbidity adjusted to 0.5 McFarland (approximately $1-2 \times 10^8$ CFU/mL) with sterilized water, and then diluted to give a final concentration of 1×10^5 CFU/mL. 1 mL of inoculum was added to each tube containing 1 mL of L-Cysteine. After an incubation of 24 hours at 37°C antibacterial activity was assessed.

2.2.2. Cotton Preparation

Cotton was first washed in a 1g/L ECE Reference Detergent for 30 minutes at 40°C, rinsed, and dried afterwards at 30°C until used, in order to remove impurities and soils.

2.2.3. Functionalization

In order to provide the surface activation of cellulose (as showed in figure 1), prior to L-cys covalent binding, surface activator solutions were prepared at different concentrations: 0, 4, 40 and 60% (w/V) (prepared by dissolving N,N-carbonyldiimidazole (CDI) (Sigma) in Anhydrous Tetrahydrofuran (THF) (Sigma) at an absolute absence of water (glove box chamber with nitrogen replacing atmosphere)), where respective cotton samples were immersed for 2 hours at 15 rpm. Subsequently samples were rinsed in THF, and incubated for 24 hours by exhaustion functionalization procedure, at 40°C, 15 rpm (Mathis-BFA12) [19]. Concentrations of 5 and 7.5% of L-Cysteine were used. Finally, samples were rinsed three times with ddH₂O and dried at 30°C. Functionalization was performed using duplicates.

Afterwards, all samples were washed in a 1 g/L of a solution of AATCC 1993 Standard Reference Detergent WOB, in 5 washing cycles performed at 40°C during 60 minutes, a method adapted from the international standard EN ISO 105-C06:2010, followed by drying at 37 °C for approximately 4 hours. The soaping procedure was performed over the samples treated with L-Cys prior to further investigation and assessment of antibacterial activity in order to give evidence of a durable functionalization effect.

2.2.4. Cotton Characterization

Samples were characterized using different surface analyzing techniques.

2.2.4.1. Scanning Electron Microscopy-Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (SEM-EDS)

Surface morphology of samples was analyzed by a scanning electron microscope HITACHI S 2700. Images of the details of the cotton surface were formed through secondary electrons. The high voltage used was 20KV. An EDS attachment was used to characterize the sulphur presence of L-Cys-cotton on its surface.

2.2.4.2. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR-ATR)

The chemical composition of cotton and L-Cys-cotton was analyzed by FTIR-ATR. Measurements were done with Thermo-Nicolet is10 FTIR spectrophotometer. Samples were scanned 64 times each, with a spatial frequency resolution of 4 cm⁻¹.

2.2.5. Antimicrobial Activity

Antimicrobial behavior of cotton samples successfully grafted with L-cys (samples 4, 40 and 60% CDI pre-activation) was evaluated against two bacterial strains: gram-negative *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352) and gram-positive *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). The selection of these strains as well as the whole procedure was carried out according to the Japanese Industrial Standard JIS L 1902:2002, as previously described by us [10]. Briefly, after preparation of inoculum and bacterial culture, both functionalized samples and controls were tested. Antimicrobial activity was evaluated by two different methods: (i) qualitative method, where samples (duplicates) were placed on petri dishes seeded with the respective

bacteria embedded in broth and incubated at 37°C for 24-48 hours; (ii) quantitative method, in order to determine more accurately the percentage of bacterial growth inhibition on textiles (% of Inhibition) at 0 and 24 hours:

$$\%Inhibition = \frac{C - A}{C} \times 100$$

where C corresponds to the average value of Colony forming Units (CFU-ug/mL) of non-modified textile, and A to the average value of CFU of functionalized textile [13].

In addition, qualitative assays were performed for the best functionalization conditions in order to show the non-halo formation around the test-specimen as a consequence of the covalent binding of L-cys onto cellulose. The qualitative Test Agar diffusion, was used to test textile samples with a size Pattern-determined which contact directly with a bacterial suspension (1×10^6 - 1×10^7 CFU/mL) blended with Nutrient Agar (Cultimed) in Petri dishes. These samples are placed in the center and pushed down with the aid of sterile forceps of plates in order to whole surface intimate contact the medium. Finally, the plates were incubated at 37°C for 18-24 hours. It is not mandatory the existence of a halo to describe the antibacterial activity of a textile once it can be seen in the contact zone with the sample textile in the case of a non-leaching effect.

3. Results

3.1. Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of L-Cysteine

The results showed MIC values for *Klebsiella pneumoniae* of 48 mg/mL, and for *Staphylococcus aureus* of 6 mg/mL.

3.2. Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDS)

L-Cysteine presence on cotton samples is indirectly perceived through elemental analysis of sulphur amount that exists on each sample with different surface-activation and functionalization conditions. Cotton, a cellulosic fiber, is not composed of sulphur in its native structure. Thereby we were able to regard the amount of surface sulphur as a result of the functionalization process with L-Cysteine (Table 1).

Table 1 shows the activation condition of 4% (w/V) more prone to retain a higher L-Cysteine concentration (0.32 for 5% L-Cys owf and 0.44 for 7.5% L-Cys owf), once for both concentrations of functionalization, 5 and 7.5% owf of L-Cysteine, 4%(w/V) of CDI activator was the one that retained higher amounts of sulphur on cotton surface after three washings. At the absence of surface pre-activation (0% (w/V) CDI) there were a few percentage of sulphur detection (0.21 for 5% L-Cys owf and 0.23 for 7.5% L-Cys owf), suggesting physical or electrostatic bonds of L-Cys to cotton surface.

3.3. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR-ATR)

The infrared spectrum of unmodified cotton is shown in Figure 2. The IR spectrum of unmodified cotton presented the expected characteristic peak at 3330 cm^{-1} due to O-H stretching vibrations, and at 1335 cm^{-1} assigned to O-H deformation vibrations. The specific bands of the $\beta(1-4)$ glycoside bridge came out at 1159 and 897 cm^{-1} , as well as C-O-C stretching vibration in the pyranose ring at 1030 cm^{-1} [14].

Structural changes on cotton after functionalization were also assessed by FTIR-ATR. At 7.5% (w/w), figure 3 B, the presence of L-Cys was confirmed with observed peak of amides, namely vibrations of amide I band due to C=O stretching at 1650 cm^{-1} , N-H bending of primary amines at 1587 cm^{-1} , and the amide III at 1340 cm^{-1} (C-N stretching vibrations); also $-\text{CH}_3$ symmetrical angular deformation is shown at 1382 cm^{-1} . Importantly, the spectrum of cotton-L-Cys also presented the S-H stretching of $-\text{CH}_2\text{SH}$ functional groups at 2599 cm^{-1} [14]. These IR spectra also suggested an increased L-Cys immobilization at surface-activator concentrations of 4 and 40% (w/V) of CDI, and a less immobilization with 60% (w/V) of CDI, once it was demonstrated an increase in the absorption band at assigned to C=O stretching, N-H bending of primary amines, vibration of amide III, and -SH stretching. On the contrary, with functionalization at 5% owf of L-Cys, it was not possible to detect S-H stretching vibrations at any condition. Figure 3 A. At 0% (w/V) of activator there were no peaks suggesting any covalent bond formation.

3.4. Antimicrobial Assays

3.4.1. Quantitative Method (suspension)

Cotton activated surfaces showed pretty positive microbial inhibition results, as shown in figure 4. We observed that the lowest concentration of activator tested (4% CDI) was enough to promote the greatest antimicrobial inhibition in both bacterial strains after 24 hours - ~88% with *K. pneumoniae* and ~83% with *S. aureus*. Furthermore, as we raised activator concentration the percentage of inhibition outcome decreased. As an example, for *K. pneumoniae* (A) we observed an inhibition of 89.39% for an activation with 4% (w/V) and functionalization with 5% owf L-Cysteine. However, when we raised the activator concentration to 40% (w/V) growth inhibition dropped to 63.47%.

Our results also showed that L-Cysteine was able to inhibit at its lowest concentration (5% (w/w)). For example, *S. aureus* (B) samples activated with 4% (w/V) CDI and functionalized with 5 and 7.5% owf L-Cys showed a slight difference of 0.03%. Furthermore, microbial inhibition values showed to be always higher after bacterial adsorption to L-Cys-cotton with 4% (w/V) of CDI activation.

3.4.2. Qualitative Method (Halo)

Complementarily, qualitative tests were performed concerning antimicrobial activity of cotton activated with 4% CDI (w/V) and functionalized with L-Cysteine at 5 and 7.5% owf, in order to get a visual perception of this inhibition. This activator percentage was chosen based

on previous results that showed 4% (w/V) CDI as the most efficient activator concentration to cross-link L-Cysteine to the fiber as well as presented the best antimicrobial inhibition results for both concentrations of functionalization.

Actually, halo assays (Agar diffusion tests) (Figures 5 and 6) against *K. pneumoniae* and *S. aureus*, confirmed there was antimicrobial activity of L-Cys-cotton. The antimicrobial effect can be visualized at inhibition zone of microbial growth underneath cotton sample. This kind of inhibition normally takes place when the antimicrobial agent doesn't have the capacity to migrate. This way, the inhibition zone will be restricted to the antimicrobial textile and the area that is in intimate contact with it [10].

4. Discussion

A previous study carried out by Morris *et al.* [15] postulated the antimicrobial effect of thiol compounds through its reaction with sulphhydryl groups located at the membrane of gram-positive and gram-negative bacteria [15]. Gouveia *et al.* [10] established that beyond arginine, AMPs containing cysteine residues with free sulphhydryl groups (-SH) seem to have an important role in the antibacterial activity [10]. Herein L-Cysteine was chosen once it is low cost when compared with AMPs, it also presents antimicrobial activity, and it seems very attractive to use on surface modification of cotton surface.

Our fiber modifications relied on the primary amine of L-Cysteine, which is not important for its antimicrobial activity in this work, once we were wondering the effect of free -SH groups of L-Cysteine covalently immobilized on cotton. We promoted the covalent bonding between the primary amine of L-Cysteine and free hydroxyl groups (-OH) of cotton fibers by zero-length covalent bonding chemistry [16]. CDI converted free hydroxyl groups of cotton into the intermediate imidazole-carbamate groups, which ultimately reacted with N-nucleophile of the free amines of L-Cysteine [16].

MIC values for *Klebsiella pneumoniae* of 48 mg/mL, and for *Staphylococcus aureus* of 6 mg/ml are significantly higher in comparison with other compounds, namely chitosan (0.05% (w/v) against *S. aureus* and *K. pneumoniae*) and for triclosan (6 % (w/v) against *S. aureus*) [17, 18]. However, our mechanism of L-Cys immobilization at cotton surface pointing up its free sulphhydryl groups at the surface proved to require much lower concentrations of L-Cys to kill bacteria (5% owf over the weight of the fiber in a ratio solution of 1/50 g of fiber per 50 mL; thus, 1 mg/mL), when comparing to L-Cys in an aqueous solution. L-Cys molecules dissolved in aqueous solutions can agglomerate between each other thus losing L-Cys reactive groups. Hence, this immobilization strategy proved to be more efficient requiring less concentrate L-Cys solutions to yield cotton fibers the desired antibacterial activity.

Cotton surfaces with different concentrations of CDI (0, 4, 40, and 60mg/mL) with 5 and 7.5% owf L-Cysteine were tested. EDS results showed the best L-Cys adsorption was achieved with activator at 4% (w/w) CDI either at 5 or 7.5% (w/V) functionalization. In addition, with 7.5%, more L-Cysteine was detected adsorbed. FTIR-ATR spectra confirmed L-Cysteine bonded to

cotton surface, especially at CDI 4 and 40 at L-Cys functionalization of 7.5%. At CDI 60%, a smaller sulphur peak was also detected. Surprisingly, no L-Cysteine was detected at 5% (w/w) functionalization. Although this chemical mechanism proved to be suitable for introducing the desired modifications in cellulose at 7.5% (w/w), the percentage of killing bacteria at contact with samples after 24h showed the lowest concentration of activator tested, 4% (w/V) CDI (for 5 and 7.5 % owf L-Cys), and also the highest, 60% (w/V) CDI (7.5% owf L-Cys), enough to promote the best antimicrobial inhibition in both bacterial strains. This later result could be explained with the formation of non-specific physical adsorption reactions beyond the presence of covalent bond we obtained. Martins *et al.* [19] also stated that when fewer concentrations of pKL (selective to heparin) were immobilized (using the least activator concentration) heparin bind was more effective. Contrarily with high amounts of pKL at the surface, heparin binding was not selective anymore due to steric hindrance of packed chains or high degrees of activator which could bind several lysines of pKL [19]. Our FTIR-ATR results at a 5% owf L-Cys concentration might be too low to be detected on spectra, however they had the most prominent effect on antimicrobial killing. We can understand this result as a very low ratio of L-Cys 5% owf when compared to cotton native backbone of our samples that had a thick depth. Cardenas & Miranda [20] also had its incorporation of emulsifier and acid in chitosan at such low concentrations to be detected by FTIR-ATR, even though these composite films showed influence on thermogravimetric analyses [20]. Both concentrations of functionalization proved to inhibit these two reference strains at all antimicrobial assays, although 5% (w/w) L-Cys proved to be the most effective amount of L-Cysteine to be used, as well as with an activation of surface of 4% (w/V) CDI.

5. Conclusions

This study showed that cotton samples covalently functionalized with L-Cysteine using a zero-length crosslinking chemistry were effective, as demonstrated by EDS and FTIR-ATR, after five washing cycles according with the international standard EN ISO 105-C06:2010.

Functionalized cotton presented strong microbial killing rates, with inhibitions around 89% and 83% against *K. pneumoniae* and *S. aureus*, respectively, when compared with the non-functionalized fabric.

Thereby here we report a new process to obtain cotton textile material with strong antimicrobial properties with great potential to be used in several applications, especially in health care context.

Acknowledgments

The authors would like to thank Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) for the funding granted concerning the project - PTDC/EBB-BIO/113671/2009 (FCOMP-01-0124-FEDER-014752) Skin2Tex. Also we would like to acknowledge Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional

(FEDER) through COMPETE - Programa Operacional Factores de Competitividade (POFC) for the co-funding.

References

1. Fischbach LA, Goodman KJ, Feldman M, Aragaki C. Sources of variation of *Helicobacter pylori* treatment success in adults worldwide: a meta-analysis. *International Journal of Epidemiology*. 2002 Feb;31(1):128-39.
2. Gao Y, Cranston R. Recent advances in antimicrobial treatments of textiles. *Textile Research Journal*. 2008;78(1):68-72.
3. Kramer A, Guggenbichler P, Heldt P, Junger M, Ladwig A, Thierbach H, *et al.* Hygienic relevance and risk assessment of antimicrobial-impregnated textiles. *Current problems in dermatology*. [Review]. 2006;33:78-109.
4. Son Y, S. Kim, K. Ravikumara, and SG Lee. Imparting durable antimicrobial properties to cotton fabrics using quaternary ammonium salts through 4-aminobenzenesulfonic acid-chlorotriazine adduct. *Eur Polymer J*. 2006;42:3059-67.
5. Sun Y ZC, and M Braun. Preparation and physical and antimicrobial properties of a cellulose-supported chloromelamine derivative. *Ind Eng Chem Res* 2005;44:7916-20.
6. Luis Cabrales NA, Adrienne Hammond, Abdul Hamood. Cotton Fabric Functionalization with Cyclodextrins. *J Mater Environ Sci*. 2012;3(3):561-74.
7. Khaled F. El-tahlawy MAE-b, Adel G. Elhendawy, Hudson SM. The antimicrobial activity of cotton fabrics treated with different crosslinking agents and chitosan. *Carbohydrate Polymers*. 2005;60(4):421-30.
8. Chun DTW, Gamble GR. Using the Reactive Dye Method to Covalently Attach Antibacterial Compounds to Cotton. *The Journal of Cotton Science*. 2007;11:154-8.
9. Gashti MP, Willoughby J, Agrawal P (2011). Surface and Bulk Modification of Synthetic Textiles to Improve Dyeability. *Textile Dyeing*, Prof. Peter Hauser (Ed.), ISBN: 978-953-307-565-5, InTech, DOI: 10.5772/18706.
10. Isabel C. Gouveia, Sa D, Mariana Henriques. Functionalization of Wool with L-Cysteine: Process Characterization and Assessment of Antimicrobial Activity and Cytotoxicity. *Journal of Applied Polymer Science*. 2012;124(2):1352-8.
11. Ratner B. *Biomaterials Science An Introduction to Materials in Medicine* 2nd Edition 2004.
12. Vigo T. *Antimicrobial Polymers and Fibers: Retrospective and Prospective*. *Bioactive Fibers and Polymers* American Chemical Society. 2001;11:175-200.
13. Selvam S, Sundrarajam M. Functionalization of cotton fabric with PVP/ZnO nanoparticles for improved reactive dyeability and antibacterial activity. *Carbohydrate Polymers*. 2012;87;2:1419-1424.
14. Socrates G. *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts*: John Wiley & Sons, Ltd; 2004.

15. Morris SL, Walsh RC, Hansen JN. Identification and characterization of some bacterial membrane sulfhydryl groups which are targets of bacteriostatic and antibiotic action. *The journal of biological chemistry* 1984;259:13590-4.
16. Greg T. Hermanson. *Bioconjugate Techniques (Second Edition)*. Academic Press. 2008.
17. Kim YH, Nam CW, Choi JW, Jang JH. Durable antimicrobial treatment of cotton fabrics using N-(2-hydroxy)propyl-3-trimethylammonium chitosan chloride and polycarboxylic acids. *Journal of Applied Polymer Science*. 2003 May 9;88(6):1567-72.
18. Cottell A, Denyer SP, Hanlon GW, Ochs D, Maillard JY. Triclosan-tolerant bacteria: changes in susceptibility to antibiotics. *The Journal of hospital infection*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2009 May;72(1):71-6.
19. Martins MCL, Curtin SA, Freitas SC, Salgueiro P, Ratner BD, Barbosa MA. Molecularly designed surfaces for blood deheparinization using an immobilized heparin-binding peptide. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2009 Jan;88A(1):162-73.
20. Cardenas G, Miranda SP. FTIR and TGA studies of chitosan composite films. *Journal of the Chilean Chemical Society*. 2004 Dec;49(4):291-5.

A. Appendices
Table A.1. Full EDS

Cotton - 5% L-Cys			
	Elements [C(atom)]		
	O	S	C
BL_5%	44.31	0	55.54
0% CDI	44.85	0.15	54.94
4% CDI	49.23	0.32	50.45
40% CDI	45.43	0.12	54.44
60% CDI	42.34	0.17	57.49

Cotton - 7.5% L-Cys			
	Elements [C(atom)]		
	O	S	C
BL	46.27	0	53.52
0% CDI	48.63	0.22	51.14
4% CDI	49.70	0.44	49.87
40% CDI	45.75	0.30	53.94
60% CDI	37.64	0.10	62.26

Table A.2. Suspension Tables:

<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 24h		
Sample	Average CFU/mL	% Inhibition
Cotton-control	2.45×10^8	-----
<i>5% L-Cysteine</i>		
0% CDI	1.50×10^8	38,78%
4% CDI	$2,60 \times 10^7$	89,39%
40% CDI	$8,95 \times 10^7$	63,47%
60% CDI	$9,70 \times 10^7$	60,41%
<i>7.5% L-Cysteine</i>		
4% CDI	$3,05 \times 10^7$	87,55%
40% CDI	$3,20 \times 10^8$	69,38%
60% CDI	$6,60 \times 10^7$	73,06%

<i>Staphylococcus aureus</i> - 24h		
Sample	Average CFU/mL	% Inhibition
Cotton	7.55×10^8	-----
<i>5% L-Cysteine</i>		
4% CDI	$1,27 \times 10^8$	83,21%
40% CDI	$3,05 \times 10^8$	59,60%
60% CDI	$3,65 \times 10^8$	51,66%
<i>7.5% L-Cysteine</i>		
4% CDI	$1,27 \times 10^8$	83,18%
40% CDI	$4,20 \times 10^8$	44,37%
60% CDI	$2,05 \times 10^8$	72,85%

	Average CFU/mL_24h
<i>S. aureus</i>	$2,11 \times 10^8$
<i>K. pneumoniae</i>	$6,48 \times 10^7$

Figures

Figure 1. CDI-mechanism for the activation of cellulose.

Figure 2. IR spectrum of cotton.

Figure 3. IR spectra of modified cotton with different concentration of surface-activator at (A) 5 and (B) 7.5% (w/w) of L-Cys functionalization.

Figure 4. Percentage of microbial inhibition for *K. pneumoniae* at 24 hours (A) and *S. aureus* at the same timepoint (B) - all of these values were obtained by comparison with results of non-functionalized cotton.

Figure 5. Halo Assay: inhibitory effect of samples functionalized with 5%(w/w) L-Cysteine and activated with 4%(w/V) CDI, against *S. aureus* and *K. pneumoniae*, after 18h of incubation.

Figure 6. Halo Assay: inhibitory effect of samples functionalized with 7.5%(w/w) L-Cysteine and activated with 4%(w/V) CDI, against *S. aureus* and *K. pneumoniae*, after 18h of incubation.

Tables

Table 1. Energy dispersive X-ray spectroscopy. Functionalization assays with L-Cysteine concentrations of 5%(w/w) and 7.5%(w/w), using different concentrations of surface-activator (CDI), 0, 4, 40 e 60% (w/V) and the blank (non-activated sample).

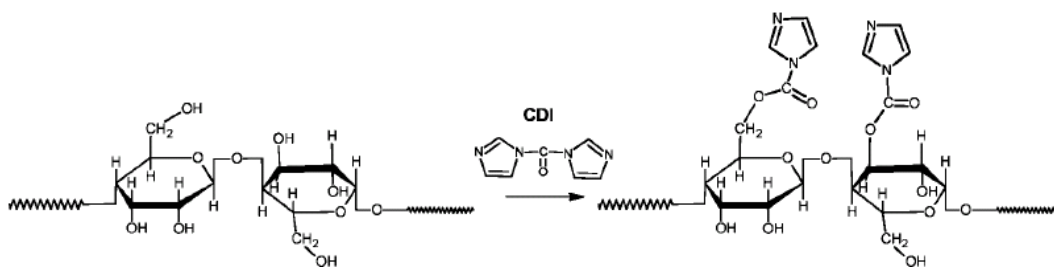


Figure 1.

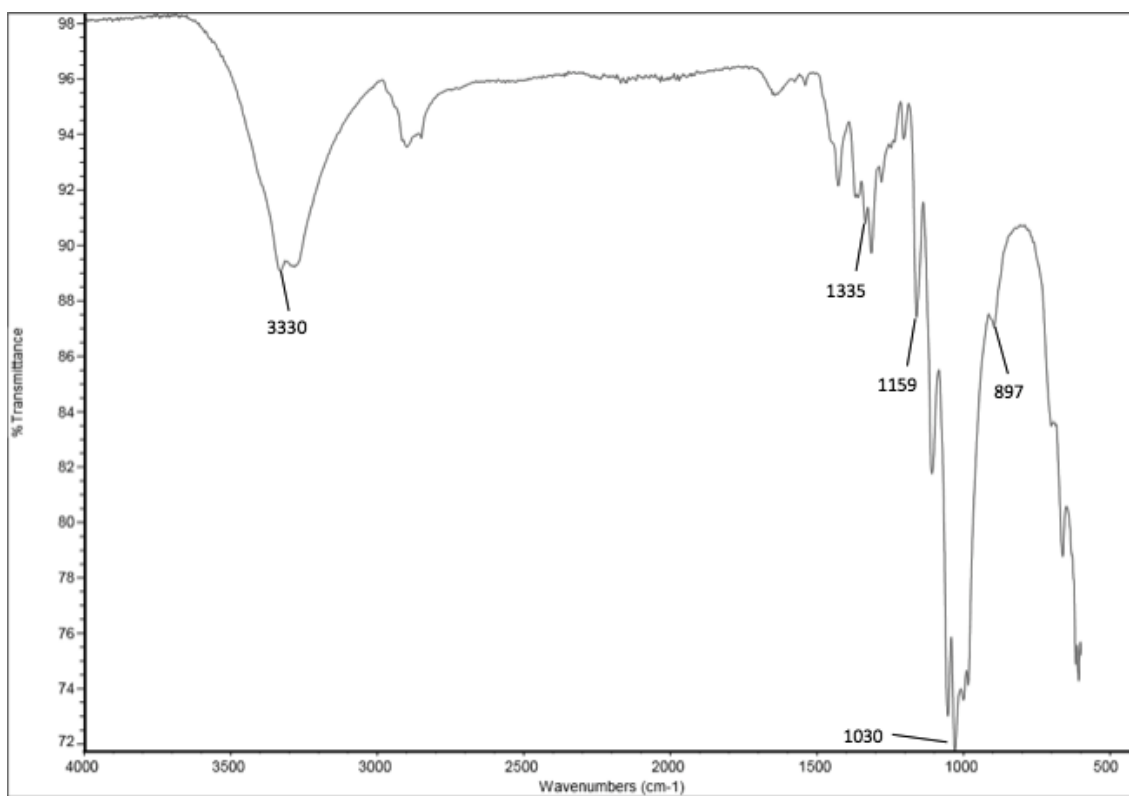


Figure 2.

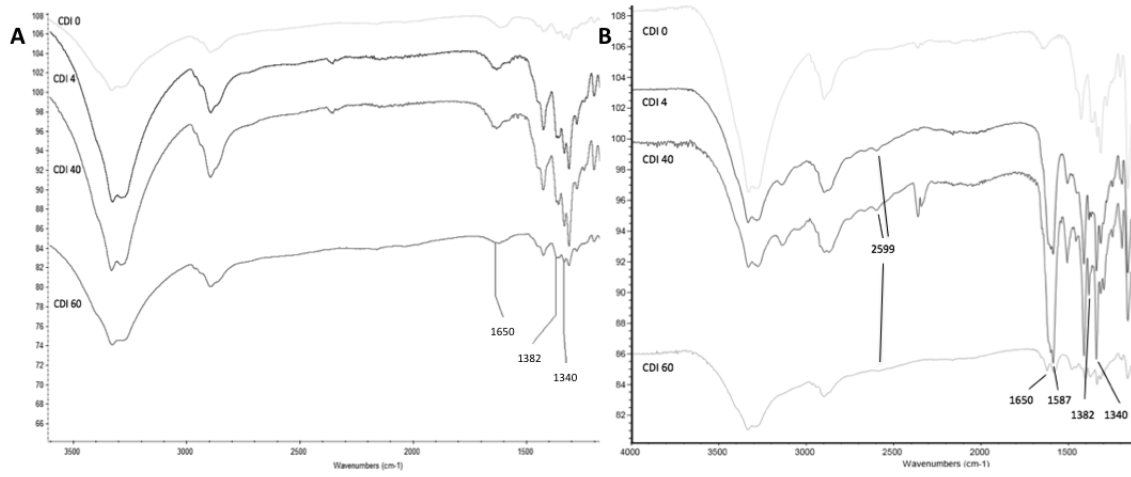


Figure 3.

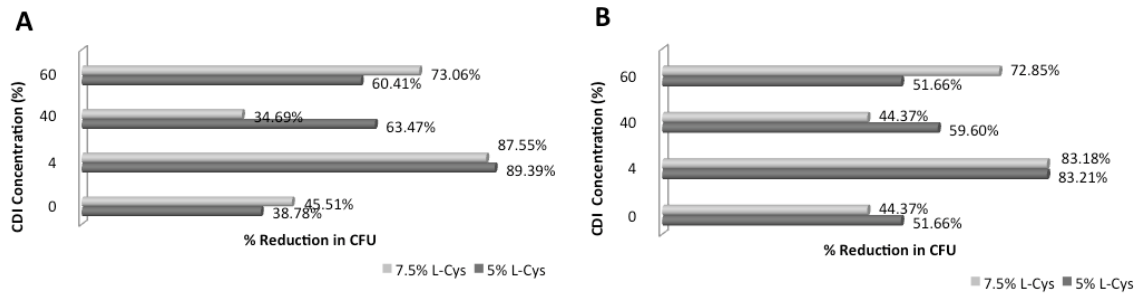


Figure 4.

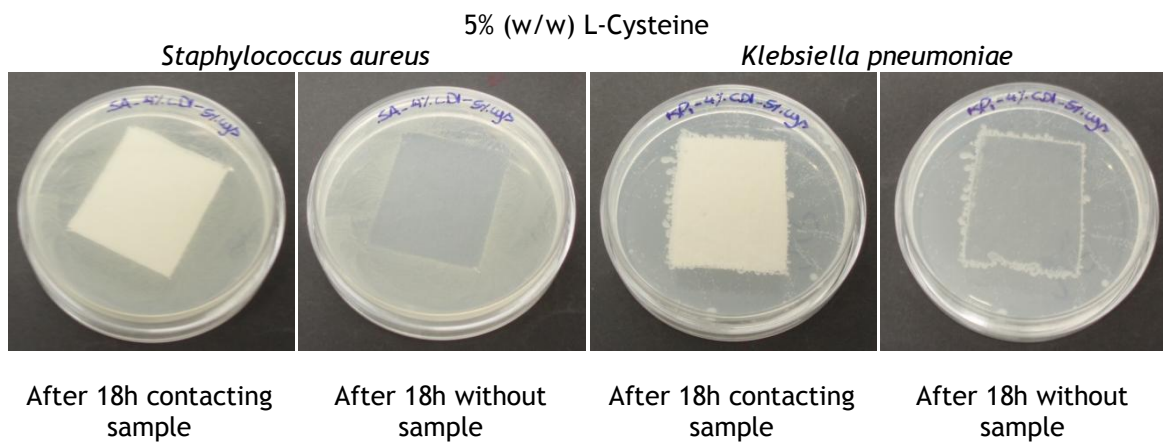


Figure 5.

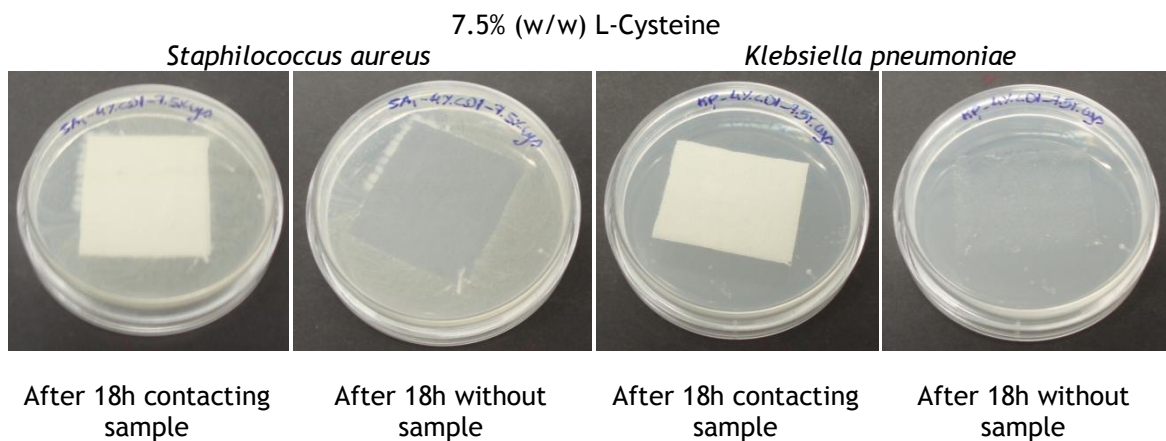


Figure 6.

Table 1.

Cotton functionalized with 5% L-Cysteine		Cotton functionalized with 7.5% L-Cysteine	
Condition	S (Elements [C(atom)])	Condição	S (Elements [C(atom)])
Blank	0.00	Blank	0.00
0% CDI	0.21	0% CDI	0.23
4% CDI	0.32	4% CDI	0.44
40% CDI	0.12	40% CDI	0.30
60% CDI	0.17	60% CDI	0.10

Anexo II - Artigo Submetido: Comparison of two surface activation strategies to functionalize cotton fibers with cys-LC-LL-37 Antibacterial peptide

Comparison of two surface activation strategies to functionalize cotton fibers with cys-LC-LL-37 Antibacterial peptide

Marta Pedrosa¹, Joana Vaz¹, Claudia Mouro¹, Erhan Piskin² and Isabel Gouveia^{1#}

¹R&D Unit of Textile and Paper Materials, University of Beira Interior, 6201-001 Covilhã, Portugal

²Center for Bioengineering and Biomedtek, Hacettepe University (Ankara, Turkey)

#Contact author: Isabel Gouveia

Phone: +351275242053; +351275319825

Fax: +351275349725

E-mail address: igouveia@ubi.pt

Postal address: R&D Unit of Textile and Paper Materials, University of Beira Interior, Av. Marquês de Ávila e Bolama, 6201-001 Covilhã - Portugal

Abstract

With this work an attempt was made to determine which one of the two surface activation methods allowed to more effectively bonding of Cys-LC-LL-37 to the cotton fibres and which one presented a higher antimicrobial activity. This was made to assess if it is advantageous to use a time and labour consuming CDI activation approach rather than a simpler and direct TEMPO activation.

The results showed that cys-LC-LL-37 had no cell-toxic effect on fibroblasts, so this molecule was safe to be in contact with the skin. Cotton fibers were activated with either TEMPO or with CDI, which allowed to create ionic and covalent bonds, respectively, between the textile surface and the peptide, cys-LC-LL-37.

The overall antibacterial effect of the TEMPO activated cotton functionalized with the AMP was more relevant than the effect of the AMP covalently bonded to the textile, regardless of the fact that covalent surface modification with CDI allowed to retain a higher amount of peptide in the cotton. The ionic bonding of the peptide had a better antibacterial performance and implicated a less laborious activation procedure, so it is more suitable to be applied as a finish of medical textiles.

Keywords: medical textiles; cys-LC-LL-37; antimicrobial peptides (AMPs); surface activation; textile functionalization.

Introduction

Natural fibers based on cellulose (cotton) and proteins (wool, silk) are a good media for the development of microorganisms [1]. Synthetic fibers are less susceptible to microbial attack, because of their hydrophobicity [1]. The destruction of textile fibers is mainly caused by enzymes produced by microorganisms and is manifested through the deterioration of physico-mechanical properties of the attacked materials [1]. Microbial enzymes can cleave cellulose to oligosaccharides and simple sugars that are carbon and energy sources for the microorganisms [1].

Prevention of microbial damage in textiles can be accomplished for instance, by fixating antimicrobial agents or by altering fibers' surface to obtain derivatives that are not attacked by microorganisms [1]. These substances must exhibit sufficient antimicrobial activity with a wide spectrum of action against bacteria and fungi, low toxicity and good compatibility with the skin [1].

There is a variety of textile products based on synthetic antimicrobial agents. The problem with these agents is the side effects, action on non-target microorganisms and environmental pollution [2]. Hence, antimicrobial textiles based on ecofriendly agents, like antimicrobial peptides (AMPs) are also a good alternative ecofriendly antimicrobial finishing for textiles, as they natural molecules with a broad spectrum of activity.

Cys-containing peptides are very important biomolecules due to the inherent reactivity of the thiol group, allowing them to participate in an array of processes ranging from redox reactions, metal ion binding, posttranslational modifications, disulfide and thioether bond

formation among others [3]. Thus, Cys-LC-LL-37 a modified antimicrobial peptide (C-LC-LLGDDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES) derived from an LL-37 altered with a LC, as a 6-carbon linker to bind the cysteine amino acid, was used in this study. Wiradharma *et al.*, (2011) [4] modified the end-terminal(s) of the peptides with cysteine (cys) residues and the results showed that the incorporation of cysteine at the terminal end of the AMPs significantly broadens their antimicrobial activity to Gram-positive, Gram-negative bacteria and yeasts [4].

AMPs are often intended to work at local surfaces in most of their natural applications, so immobilizing AMPs onto a biomaterial can be advantageous [5]. Covalent immobilization of AMP can increase their long-term stability while decreasing their toxicity, as compared to incorporation approaches on leach- or release-based systems [5]. Furthermore, the proper orientation of the peptide may result in enhanced activity. In this work we attempted to use N,N'-carbonyldiimidazole (CDI), a highly reactive carboxylating agent that contains two acylimidazole leaving groups, to form reactive carbonyl groups on the hydroxyl particles of cotton [6]. CDI activates the hydroxyl groups to form imidazolyl carbamate of high reactivity [6]. At elevated pH, nucleophilic attack of free amino groups in peptides upon these reactive intermediates is stimulated to greatly improve immobilization [6]. Attack by the amine group will then release the imidazole, resulting in the formation of a one-carbon length and stable N-alkyl carbamate linkage [6].

On the other hand, the use of this activation method has some drawbacks such as: the need for anhydrous conditions; high degree of reagents toxicity and the time consuming and cumbersome procedures [7]. Therefore, exploring other surface activation strategies is important. The stable nitroxyl radical 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPO) in combination with a non-metallic co-catalyst, have been increasingly explored for the oxidation of alcohols using molecular oxygen as terminal oxidant [8] thus converting hydroxyl groups of Carbon-6 into carboxylate one's. This surface activation provides a negative charge to the cotton fibres, which facilitates the bonding of the AMP [8].

With this study a comparison of the antibacterial efficacy of cotton activated with CDI (covalent surface activation) and with TEMPO radical (ionic surface activation) against two bacterial strains was made. This was made to assess if it is advantageous to use a time and labour consuming CDI activation approach rather than a simpler and direct TEMPO activation.

2. Materials and methods

2.1 Chemicals

Cys-LC-LL-37 was purchased from Eurogentec (Seraing, Belgium).

Nutrient agar and Nutrient broth were from Cultimed (Barcelona, Spain). Sodium hypochloride and methanol from Panreac (Barcelona, Spain) and bovine fetal serum (FBS) was from Biochrom (Portugal). All other reagents were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

2.2 Minimal inhibitory concentration of the AMPs against *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*

The minimal inhibitory concentration (MIC) of Cys-LC-LL-37 against *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) and *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352) was determined using the broth microdilution method, adapted from National Clinical and Laboratory Standard, NCLS M7-A6 [9]. Cys-LC-LL-37 stock solution was prepared in sterile deionised water (pH of 5.5) to a concentration of 20 µg/mL. Serial dilutions of the AMPs stock solutions were made in Mueller-Hinton Broth (MHB) with concentrations ranging from 10 to 0.156 µg/mL.

The inoculums were prepared from colonies of fresh cultures that were incubated for 24 hours (h) and the bacterial turbidity was adjusted to 0.5 McFarland with sterile water. Afterwards, bacterial work suspensions were made by diluting 500 µL of the 0.5 McFarland suspension in 4500 µL of MHB. 50 µL of the bacterial work suspensions and 50 µL of the AMPs dilutions and the stock solution were added to the wells in a 96 multi-well plate. The multi-well plates incubated for 24h at 37°C. For each AMP concentration, the turbidimetry of bacterial growth was compared with the controls and all determinations were performed in triplicate.

2.3 Cytotoxicity assay

Cytotoxicity of the AMP was evaluated by an MTT (3-[4,5- dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) viability assay [10] using normal human dermal fibroblasts (NHDF), since the textile material is intended to be in contact with the human skin. Cells were routinely maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ and cultured in RPMI medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), HEPES (0.01 M), L-glutamine (0.02 M) and sodium pyruvate (0.001 M) and 1% antibiotic/antimycotic. Cells were used on the 20th passage.

Briefly, cells were seeded in 24-well plates (2×10⁴ cells/well) in culture medium containing FBS and after 48 hours adherence, some of the wells were treated with different concentrations of cys-LC-LL-37 (2.00 and 5.00 µg/mL) and incubated at 37°C, in a 5% CO₂ atmosphere, for 48 hours. The concentrations chosen were the MIC value against *K. pneumoniae* and *S. aureus* and 40% of the MIC. Untreated cells were used as control. Afterwards, the liquid content of the wells was removed and it was replaced with 200 µL of MTT solution of 1mg/mL in PBS. The multi-well plates were incubated for 4 hours, at 37°C, with a 5% CO₂ atmosphere, in the dark. Next, the content of the wells was removed and it was added 200 µL of DMSO and 20 µL of Glicil-Glicin buffer to dissolve the formazan crystals and to stabilize the colour, respectively. The absorbance of each well was measured at 570 nm using a Biochrom Anthos 2020 microplate reader. The extent of cell viability was expressed as the percentage of viable treated cells in comparison with control cells.

The cytotoxicity results were submitted to a Student's t-test in 95% confidence interval, using the computer software, IBM SPSS Statistics for Windows (version 19.0). p-Values < 0.05 were considered statistically significant.

2.4 Cotton surface activation

Firstly, the cotton fabrics were washed with 1 g/L of a solution of AATCC 1993 Standard Reference Detergent WOB to remove any surface residues that could provide false results regarding the antimicrobial activity.

2.4.1 Activation with 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl radical

The fabric surface was oxidized by 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl radical (TEMPO), which converts hydroxyl groups of carbon-6 into carboxylate one's. This step provided the negative net charge at the surface of cotton enabling the adsorption of the cationic antimicrobial peptides during the functionalization process.

A solution of 0,0125% (w/v) of TEMPO; 0,125% (w/v) of sodium bromide and 3,2% (v/v) of sodium hydrochloride was prepared and its pH value was adjusted at 10.5. Then, 2 g of fabric samples were submersed in 50 mL of the previous solution and stirred for 60 minutes. Afterwards, the pH of the solution was adjusted to 7 and the samples were washed in deionized water.

2.4.2 Activation with *N,N*-carbonyldiimidazole reagent

All the steps in this procedure, including preparation of solutions, were performed in a glove-box chamber with an inert atmosphere of liquid nitrogen to avoid reaction with oxygen and water in the normal atmosphere. The 4% (m/v) activation solution was prepared by dissolving *N,N*-carbonyldiimidazole (CDI) in anhydrous tetrahydrofuran (THF). The samples were submerged in the surface-activator solution for 2 h under moderate stirring. Afterwards, the samples were rinsed 3 times in THF and then deionized water.

2.5 Functionalization process with AMPs

For the exhaustion functionalization process which took place after the surface activation, of cotton fibers, solutions of cys-LC-LL-37 were diluted to a concentration of 1.91 µg/mL in deionized water. This concentration corresponded to about 40% of the MIC value of the antimicrobial peptide. This concentration is expected to be enough to provide antibacterial effect in cotton, being that immobilization often promotes the activity of AMPs [5], as it can leave available reactive groups of the molecule to stimulate a more pronounced effect. Also, antimicrobial peptides are very expensive and have a powerful antimicrobial activity, so it seemed promising to use 40% of MIC to functionalize the samples.

Samples, with a total of 4 g, were immersed in 100 mL of the bioactive solution and placed in the containers of the Ahiba datacolor dyeing machine and functionalized at 45°C for 60 minutes, at 15 rpm.

To finalize, all samples were washed in a 1 g/L of a solution of AATCC 1993 Standard Reference Detergent WOB, in 5 washing cycles performed at 40°C during 60 minutes, a method adapted from the international standard EN ISO 105-C06:2010 [11], followed by drying at 37°C for approximately 4 hours. The soaping procedure was performed over the

samples treated with the AMPs prior to further investigation and assessment of antibacterial activity in order to give evidence of a durable functionalization effect. Samples were then rinsed in distilled water and placed to dry at room temperature.

Effectiveness of the functionalization process - colour strength

A colour strength test was performed using Coomassie brilliant blue reagent to assess the presence of cys-LC-LL-37, in the modified-cotton samples and the K/S values were determined. Textile samples were immersed in 10mL of reagent solution Coomassie Brilliant Blue G-250 at room temperature and under constant stirring for 15 minutes. Then, the samples were washed with distilled water to remove unbound peptides out of the fibers.

The colour measurement of samples was performed by spectrophotometer readings in the spectrophotometer Spectraflash 110 from Datacolor at 595 nm.

Efficacy of the functionalized material - Antibacterial properties

The antibacterial effect of functionalized textile samples was tested according with the Japanese Industrial Standard, JIS L Standard 1902:2002 [12]. The evaluation of the antimicrobial effect against *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae* of the functionalized samples was performed by a suspension quantitative test, in which there was direct contact of the biomaterial with a suspension of bacterial cells. Control samples (without AMP) and functionalized samples (with AMP) were tested for its antimicrobial effect. The bacterial growth reduction rate was calculated based on the difference between the number of colony forming units on the control fabric and the functionalized fabric, using the equation (1):

$$\frac{[Control] - [Functionalized]}{[Control]} \times 100\% = \% \text{ growth reduction} \quad (1)$$

Where, [Control] is the CFU/mL of the control fabric (without the AMPs) and [Functionalized] is the CFU/mL of the functionalized fabric with the AMPs. The growth reduction was calculated for the initial time (0h) and after 18 h of incubation between textiles and bacterial suspension.

Results and Discussion

*1.1. Minimal inhibitory concentration of the AMPs against *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus aureus**

The minimal inhibitory concentration (MIC) of cys-LC-LL-37 against *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) and *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352) was 5.00 µg/mL.

According to Dürr *et al.* (2006) [13], LL-37 presented a minimal inhibitory concentration against *K. pneumoniae* of 4.20 µg/ml [13], which was a very similar value to the one obtained in this study (4.17 µg/ml); and a MIC of > 32 µM [15] (144 µg/ml) against *S. aureus*, which was a much higher value than the one determined here (5.00 µg/ml).

1.2. Cytotoxicity assay

MTT viability assay was used to determine the AMPs cytotoxicity on normal human dermal fibroblasts (NHDF), as the textile material was intended to be in contact with the human skin. The results represented in Figure 1 are in terms of the viability percentage of the fibroblasts treated with two concentrations of the AMP, comparatively to the controls that had no contact with the tested agents. (Insert Figure 1 here)

When fibroblasts contacted with cys-LC-LL-37 at concentrations of 2.00 and 5.00 µg/mL, there was an increase in fibroblast viability of 10% and a decrease of 0.2% comparatively to the control, respectively.

These results meant that cys-LC-LL-37 concentrations didn't caused cytotoxic effect in the normal human dermal fibroblasts, as according to Gouveia *et al.* (2011) [14], only an alteration above 30% in comparison with control is considered cell-toxic [14]. Consequently, these AMPs were considered safe to be applied as antimicrobial agents to contact with the human skin without causing any cutaneous adverse reaction in the tested concentrations. The results were statistically significant for a p-value < 0.05, according to a Student's t-test with a 95% confidence interval.

In accordance to this, Lehrer and Ganz (1999) [15] stated that at 50-100 µg/ml, LL-37 was cytotoxic. Cys-LC-LL-37 tested concentrations were much lower than 50 µg/ml and as expected there was no cytotoxic effect was observed.

1.3. Efficacy of the functionalization process on cotton - colour strength

The higher the percentage of dye strength the higher the peptide content in the sample comparatively to the untreated cotton (control). The covalent surface modification with CDI allowed to retain a higher amount of peptide in the cotton, of about 49%. The TEMPO activated cotton retained cys-LC-LL-37 in a percentage of about 26%. The covalent surface activation allowed to retain a higher amount of peptide in the cotton fabric.

1.4. Efficacy of the functionalized material - Antibacterial properties

The antibacterial effect of 1.91 µg/mL cys-LC-LL-37 peptide functionalized textile samples is in Table 1. Peptide surface concentration depends on the immobilization strategy used, as limited accessibility of the peptide reactive groups and different coupling procedures can affect the efficiency of peptide immobilization [5]. Most studies indicate that peptide concentrations, although important, do not appear to be the most critical parameter for

antimicrobial activity [5]. Additionally it was observed that the bactericidal activity of LL-37 immobilized onto titanium surfaces was independent of the peptide concentration [5]. In most cases the immobilized AMPs displayed an increase in their MIC value compared to the soluble peptide [5]. Therefore, in this work it was used a concentration of 1.91 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of cys-LC-LL-37, about 40% of the 5.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MIC value. This AMP is expensive unless very small concentrations are used and since other studies revealed the immobilized AMPs presented a 50-fold higher MIC compared to soluble peptides [5], it was attempted to obtain an antibacterial effect with a 40% lower MIC value of peptide. (Insert Table 1 here)

At 0 hours of incubation between the covalently bonded AMP to the cotton, a reduction of 25% of *Klebsiella pneumoniae* growth in comparison with an untreated cotton sample, was observed. No *K. pneumoniae* reduction after 18 h of incubation of the biomaterial was verified. Regarding the activity at 0h against *Staphylococcus aureus* a reduction of 50% was obtained and after an 18h incubation period the bacterial reduction was 41%.

Cotton with the ionic bonded cys-LC-LL-37 provided by a surface activation with TEMPO radical, there was no *K. pneumoniae* reduction at 0 h incubation. However, after 18h of incubation there was a 33% reduction of the Gram-negative microorganism. Moreover, there was a *S. aureus* reduction of 55%, at 0h of incubation and after 18h incubation, the reduction was 64%.

Previous facts showed that Gram-positive bacteria, like *S. aureus*, are more sensitive to antimicrobial agents than Gram-negative ones, *K. pneumoniae* [1]. The reason for the increased resistance of Gram-negative bacteria is composition of their outer cell membrane, which is richer in lipopolysaccharides forming a protective layer on the bacterial surface [1]. Thus, the more prominent effect of the cys-LC-LL-37 against *S. aureus*.

Furthermore, the overall antibacterial effect of the TEMPO activated cotton functionalized with the AMP was more relevant than the effect of the AMP covalently bonded to the textile, regardless of the fact that covalent surface modification with CDI allowed to retain a higher amount of peptide in the cotton. This can be due to the loss of secondary structure of immobilized AMP by the covalent immobilization onto cotton and since the secondary structure of the peptide is directly correlated to the AMP' antibacterial activity, the antimicrobial effect of this biomaterial was not the best, as discussed elsewhere [5]. This result showed that the less labor intensive surface activation by oxidizing the surface of cotton fibers with TEMPO radical was the preferred approach.

Conclusion

This research concerned the development of two cotton fibers with an antibacterial finishing that could be employed in the medical field to aid in the prevention of development of microorganisms in the textiles. The bioactive agent, cys-LC-LL-37, was tested for cytotoxic effect against human normal fibroblasts and no cell-toxic effect was observed, so this molecule was safe to be in contact with the skin. Cotton fibers were activated with either TEMPO or with CDI, which allowed to create ionic and covalent bonds, respectively, between

the textile surface and the peptide, cys-LC-LL-37. The two biomaterials were compared in terms of functionalization efficacy and antibacterial performance. Results showed that the covalent surface modification with CDI allowed to retain a higher amount of peptide in the cotton, than the TEMPO activated cotton.

On the other hand, the overall antibacterial effect of the TEMPO activated cotton functionalized with the AMP was more relevant than the effect of the AMP covalently bonded to the textile, regardless of the fact that covalent surface modification with CDI allowed to retain a higher amount of peptide in the cotton. Often immobilization of peptides lead to a loss of secondary structure of the molecule which is directly related to the antimicrobial efficacy and it was probably what happen in this case.

To conclude the TEMPO activated cotton presented a higher antibacterial performance and thus is more effective to be used as a medical textile to reduce the development of microorganisms. Also the activation process using TEMPO radical is simpler to perform, so it is a good alternative to the labor intensive process of covalent activation.

Acknowledgments

The authors thank Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) for the funding granted concerning the project - PTDC/EBB-BIO/113671/2009 (FCOMP-01-0124-FEDER-014752) Skin2Tex. Also we thank Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) through COMPETE - Programa Operacional Factores de Competitividade (POFC) for the co-funding.

References

Vltavská P, Kašpárková V, Janiš R, Buňková L. Antifungal and antibacterial effects of 1-monocaprylin on textile materials. *Eur. J. Lipid Sci. Technol* 2012; 114, 849-856

Joshi M, Wazed A, Purwar R. Ecofriendly antimicrobial finishing of textiles using bioactive agents based on natural products. *Indian Journal of Fiber & Textile Research*, 2009; 34: 295-304.

Stathopoulos P, Papas S, Pappas C, Mousis V, Sayyad N, Theodorou V, Tzakos A G, Tsikaris V. Side reactions in the SPPS of Cys-containing peptides. *Amino Acids* (2013) 44:1357-1363

Wiradharma N, Khan M, Yong L, Hausera CAE, Seow SV, Zhang S, Yang Y. The effect of thiol functional group incorporation into cationic helical peptides on antimicrobial activities and spectra. *Biomaterials* 2011; 32: 9100-9108

Costa F, Carvalho IF, Montelaro RC, Gomes P, Martins MCL. Covalent immobilization of antimicrobial peptides (AMPs) onto biomaterial surfaces. *Acta Biomaterialia* 2011; 7:1431-1440

Ho J, Al-Deena FMN, Al-Abboodia A, Selomulya C , Xiang SD, Plebanski M, Forde GM. N,N'-Carbonyldiimidazole-mediated functionalization of superparamagnetic nanoparticles as vaccine carrier. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2011; 83: 83-90

Bora U, Kannan K, Nahar P. A simple method for functionalization of cellulose membrane for covalent immobilization of biomolecules. *Journal of Membrane Science* 250 (2005) 215-222.

Karimi B, Badreh E. SBA-15-functionalized TEMPO confined ionic liquid: an efficient catalyst system for transition-metal-free aerobic oxidation of alcohols with improved selectivity. *Org Biomol Chem* 2011; 9: 4194-4198.

NCLS M7-A6. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that grow aerobically, 6th ed.

Freshney I. Culture of animal cells: a manual of basic technique. 5th ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc, 2005, Chapters 9, 10, 13, 21 and 22.

ISO 105-C06:2010. Textiles - Tests for colour fastness - Part C06: Colour fastness to domestic and commercial laundering.

JIS L 1902:2002 (Japanese Industrial Standard). Testing for antibacterial activity and efficacy on textile products

Dürr, U. H. N., Sudheendra, U. S., Ramamoorthy, A., LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006, 1758, 1408-1425.

Gouveia, I. C., Sá, D., Henriques, M., Functionalization of Wool with L-Cysteine: Process Characterization and Assessment of Antimicrobial Activity and Cytotoxicity. *J. Appl. Polym. Sci.* 2011, 124, 1352-1358.

Lehrer, R. I. & Ganz, T. Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Curr Opin Immunol* 1999; 11: 23-27.

Dubas, S. T., Kumlangdudsana, P., Potiyaraj, P., Layer-by-layer deposition of antimicrobial silver nanoparticles on textile fibers. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.* 2006, 289, 105-109.

Tables

Table 1. Percentages of bacterial reduction at 0 hours and 18 hours of incubation between fabric and bacteria

Figures

Figure 1. Fibroblasts viability percentage (mean \pm SD) when in contact with two concentrations of cys-LC-LL-37 and the untreated control.

Table

	%R of <i>Staphylococcus aureus</i>		%R of <i>Klebsiella pneumoniae</i>	
	0h	18h	0h	18h
control	0	0	0	0
cdi p9	50	41	25	0
tempo p9	55	64	0	33

Figure

