



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Ciências

**Péptidos antimicrobianos: uma nova estratégia na
funcionalização bioativa de fibras de lã e
poliamida**

Cláudia Filipa Duarte Mouro

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

Orientador: Prof. Dr. Isabel Cristina Aguiar de Sousa e Silva Gouveia

Covilhã, outubro 2013

Agradecimentos

Este trabalho não é apenas resultado de um empenho individual, mas de um conjunto de esforços que o tornaram possível. Desta forma, manifesto o meu enorme agradecimento a todos aqueles que me acompanharam, apoiaram e de certa forma contribuíram para a concretização desta dissertação.

Em primeiro quero agradecer à Professora Doutora Isabel Cristina Gouveia, orientadora deste trabalho, pela partilha de conhecimento científico, disponibilidade e incentivo prestado. Agradeço ainda o contributo com sugestões e soluções para as dificuldades e dúvidas que iam surgindo.

Ao departamento de Química e ao departamento de Ciência e Tecnologia Têxtil pela cedência de instalações e equipamentos. Em especial ao Senhor António Machado, técnico de laboratório, pela ajuda prestada.

Ao centro de ótica, especialmente à Engenheira Ana Paula Gomes pela disponibilidade, colaboração e trabalho desenvolvido, fundamental para a realização deste trabalho.

À Professora Doutora Luíza Breitenfeld Granadeiro pela ajuda e apoio prestado na execução do ensaio de citotoxicidade.

Às minhas colegas de laboratório pela amizade e bom ambiente que me proporcionaram ao longo deste trabalho, em especial, à Joana Vaz, à Marta Pedrosa e à Sílvia Araújo por toda a ajuda, disponibilidade e partilha de conhecimentos. Bem como, pelos bons momentos que passámos juntas.

Ao Frederico Nogueira pela disponibilidade demonstrada e conhecimentos transmitidos.

A todos aqueles que de alguma forma e em determinados momentos me ajudaram a percorrer este caminho. Especialmente aos meus amigos por todo o apoio e bons momentos passados.

Um agradecimento especial ao Mauro e à minha família, particularmente aos meus pais e irmã. Ao Mauro pelo companheirismo, conforto e motivação. E aos meus pais e irmã, entre muitas coisas, por todo o esforço, dedicação e apoio incondicional. Certamente que, mesmo não o sabendo, foram o estímulo da minha motivação ao longo deste trabalho. Tenho a certeza que a concretização desta etapa é mais um motivo de alegria e orgulho para eles!

Por último, esta dissertação teve apoio através do projeto: PTDC/EBB-BIO/113671/2009 (FCOMP-01-0124-FEDER-014752), Skin2Tex.

Muito Obrigada.

Resumo

Os materiais têxteis em condições de humidade e temperatura adequadas são um excelente substrato para a proliferação de microrganismos, particularmente bactérias e fungos podendo, em ambiente hospitalar, contaminar doentes e profissionais de saúde. Assim, o uso de materiais têxteis antimicrobianos pode reduzir significativamente o risco de infeções especialmente quando usados em contacto direto com a pele. Para isso, várias substâncias com características antimicrobianas têm sido utilizadas, no entanto, preocupações devido aos seus efeitos colaterais têm levado a uma procura crescente de agentes antimicrobianos naturais, como soluções eficazes, ecológicas e não tóxicas. Consequentemente, neste trabalho, uma nova estratégia prevê o uso de péptidos antimicrobianos (AMPs) como agentes bioativos para a potencial biofuncionalização de materiais têxteis.

A cecropina-B, o [Ala5]-Tritrp7 e o Cys-LC-LL-37 foram os AMPs selecionados para conferir propriedades antimicrobianas aos materiais têxteis. Neste trabalho, os AMPs foram usados no tratamento da lã (fibra natural) e da poliamida 6.6 (PA 6.6) (fibra sintética) e a sua ligação às fibras foi confirmada pelo teste do reagente de Bradford em solução e na amostra. Nesse sentido, pelos resultados obtidos, processos de funcionalização de apenas 1 hora foram estabelecidos para a biofuncionalização ocorrer de forma eficaz.

Além disso, possíveis alterações nas características estruturais da lã e da PA 6.6 foram analisadas por difração de raio-x (DRX) e comprovou-se que a composição macromolecular das fibras não foi influenciada pelo processo de biofuncionalização, de forma prejudicial. Foram também obtidas imagens de microscopia eletrónica de varrimento (SEM) que comprovaram que a ligação dos AMPs nas fibras não alterou nem provocou danos na sua superfície.

Entre os resultados obtidos, é de realçar que as amostras de lã e de PA 6.6 funcionalizadas com os AMPs apresentaram percentagens de redução bacterianas elevadas. No caso da lã, as amostras funcionalizadas apresentaram uma redução no crescimento bacteriano para o *Staphylococcus aureus* de 71,67% para a cecropina-B e de 66,74% para o [Ala5]-Tritrp7, enquanto para *Klebsiella pneumoniae* houve uma redução no crescimento bacteriano de 85,95% para a cecropina-B e de 88,65% para o [Ala5]-Tritrp7.

Relativamente à PA 6.6, a redução de crescimento para o *Staphylococcus aureus*, das amostras de PA 6.6 funcionalizadas, foi de 68,81% para a cecropina-B e de 73,81% para o Cys-LC-LL-37. Por outro lado, para a *Klebsiella pneumoniae* reduções de crescimento de 85,25% para a cecropina-B e de 87,31% para o Cys-LC-LL-37 foram alcançadas.

Apesar do efeito antibacteriano dos AMPs ser promissor, procedeu-se também à avaliação da sua citotoxicidade. Os resultados demonstraram que os AMPs não são tóxicos nas condições testadas e que os materiais funcionalizados podem ser utilizados com segurança.

Assim, os resultados revelaram que os novos processos conferem propriedades antimicrobianas inequívocas às fibras tratadas. Esse efeito foi preferencialmente visível para as bactérias em estudo e foi avaliado pela norma JIS L 1902-2002.

Palavras-Chave

Materiais-Têxteis; Péptidos Antimicrobianos (AMPs); Têxteis antimicrobianos; Cecropina-B; [Ala5]-Tritrp7; Cys-LC-LL-37.

Abstract

Textiles under appropriate conditions of humidity and temperature are an excellent substrate for the growth of microorganisms, particularly bacteria and fungi, in a hospital environment that can contaminate patients and health-care professionals. Thus, the use of antimicrobial textiles can significantly reduce the risk of infections, especially when these are used in direct contact with the skin. For this purpose, several substances with antimicrobial characteristics have been used, however, concerns due to their side effects have led to an increasing demand for natural antimicrobials as effective solutions, ecological and non-toxic. Consequently, a new strategy of using antimicrobial peptides (AMPs) as bioactive agents for the functionalization of textile materials is here described.

The cecropin-B, [Ala5]-Tritrp7 and Cys-LC-LL-37 AMPs were selected to give antimicrobial properties to textile materials. In this work, the AMPs were used in the treatment of wool (natural fiber) and polyamide 6.6 (PA 6.6) (synthetic fiber) and the presence of the peptide at the functionalized samples was determined using the colorimetric assay of Bradford reagent in solution and in the sample. Accordingly, by results obtained, biofunctionalization processes of only 1 hour were established to biofunctionalization occur effectively.

Furthermore, possible changes in the structural characteristics of the wool and PA 6.6 were also analyzed by X-Ray Diffraction (XRD) and it was shown that the macromolecular composition of the fibers was not influenced by the functionalization process, of harms way. Scanning electron microscopy (SEM) images were also obtained and showed that there are no significant changes on fibers surface, when the AMPs if bind.

In addition, among the results obtained, the wool and PA 6.6 samples functionalized with peptides showed high percentages of bacterial reduction. In the case of wool, the functionalized wool sample showed a reduction in bacterial growth for *Staphylococcus aureus* of 71.67% for cecropin-B and of 66.74% for [Ala5]-Tritrp7, while for *Klebsiella pneumonia* there was a reduction of bacterial growth of 85.95% for cecropin-B and of 88.65% for [Ala5]-Tritrp7.

Regarding the PA 6.6, the reduction of growth for *Staphylococcus aureus*, the functionalized PA 6.6 samples, showed inhibitions of 68.81% for the cecropin-B and of 73.81% for the LC-Cys-LL-37. On the other hand, for *Klebsiella pneumoniae* reductions in growth of 85.25% for the cecropin-B and of 87.31% for the LC-Cys-LL-37, were obtained.

Despite the antibacterial effect of AMPs to be promising, it was also evaluated their cytotoxicity. The results demonstrated that the AMPs are non-toxic in the tested conditions and that the functionalized materials may be used with safety.

Thus, the results show that the new processes confer antimicrobial properties to the treated fibers. This effect was visible preferably for the bacteria under study and was evaluated by JIS L 1902-2002.

Keywords

Textile Material; Antimicrobial Peptides (AMPs); Antimicrobial textiles; Cecropin-B; [Ala5]-Tritrp7; Cys-LC-LL-37.

Índice

Lista de figuras	X
Lista de tabelas	XII
Lista de acrónimos	XIV
Contextualização e estrutura da dissertação	1
<hr/>	
Capítulo 1 - Introdução	3
<hr/>	
1.1 Materiais têxteis	3
1.1.1 Fibras proteicas	4
▪ Estrutura física da lã	4
▪ Composição química da lã	6
▪ Ponto isoelétrico da lã	7
▪ Queratina da lã	8
1.1.2 Fibras poliamídicas	8
1.1.2.1 Poliamida 6.6 (Nylon 6.6)	9
▪ Composição química da PA 6.6	9
▪ Propriedades da PA 6.6	10
▪ Estrutura da PA 6.6	10
▪ Aplicações	12
1.2 Acabamentos antimicrobianos nos têxteis	12
▪ Métodos de acabamentos antimicrobianos	13
1.3 Avaliação da eficácia antimicrobiana	14
▪ Testes antimicrobianos	14
1.4 Agentes antimicrobianos	16
1.4.1 Compostos orgânicos sintéticos	17
a) Triclosano	17
b) Compostos de amónio quaternário (CAQs)	17
c) Polihexametileno de biguadina (PHMB)	18
d) Compostos aminas halogenadas (N-halaminas)	18
1.4.2 Compostos Metálicos	19
a) Prata e sais de prata	19
1.4.3 Compostos naturais	19

a) Quitosano	19
b) Outros polissacarídeos naturais	20
1.4.4 Extratos naturais	20
1.4.5 Aminoácidos	21
1.5 Péptidos antimicrobianos	21
1.5.1 Classificação	23
1.5.2 Mecanismos de ação	24
I. Mecanismos de morte por interferência com a membrana	26
II. Mecanismos de morte intracelular	28
1.6 Produção de AMPs	29
1.7 AMPs utilizados no presente estudo	30
1.7.1 Cecropina-B	31
1.7.2 [Ala5]-Tritrp7	31
1.7.3 Cys-LC-LL-37	32
Capítulo 2- Objetivos	34
<hr/>	
Capítulo 3- Materiais e Métodos	35
<hr/>	
3.1 Materiais têxteis	36
3.2 AMPs	36
3.3 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC)	37
3.4 Processos de biofuncionalização	37
3.4.1 Processo de biofuncionalização da lã	37
3.4.2 Processo de biofuncionalização da PA 6.6	38
3.5 Avaliação da eficácia da biofuncionalização	38
3.5.1 Teste do reagente de Bradford	38
3.5.2 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR-ATR)	40
3.6 Avaliação da qualidade do material funcionalizado	40
3.6.1 Difração de raio-x (DRX)	40
3.6.2 Microscopia eletrônica de varrimento (SEM)	40
3.7 Avaliação da atividade antimicrobiana	40
a) Teste de difusão em Agar	41
b) Teste de suspensão	41

3.8 Citotoxicidade	43
Capítulo 4- Resultados e discussão	44
<hr/>	
4.1 Biofuncionalização antibacteriana da lã com AMPs	45
4.1.1 Determinação da concentração mínima inibitória (MIC)	45
4.1.2 Biofuncionalização	46
4.1.3 Avaliação da eficácia da biofuncionalização	46
4.1.3.1 Teste do reagente de Bradford	46
4.1.3.2 FTIR-ATR	49
4.1.4 Avaliação da qualidade do material funcionalizado	51
4.1.4.1 Difração de raio-x (DRX)	51
4.1.4.2 Microscopia eletrônica de varrimento (SEM)	53
4.1.5 Avaliação da atividade antimicrobiana	54
a) Teste de difusão em Agar	54
b) Teste de suspensão	55
4.2 Biofuncionalização antibacteriana da PA 6.6 com AMPs	57
4.2.1 Determinação da concentração mínima inibitória (MIC)	57
4.2.2 Biofuncionalização	58
4.2.3 Avaliação da eficácia da biofuncionalização	59
4.2.3.1 Teste do reagente de Bradford	59
4.2.4 Avaliação da qualidade do material funcionalizado	62
4.2.4.1 Difração de raio-x (DRX)	62
4.2.4.2 Microscopia eletrônica de varrimento (SEM)	64
4.2.5 Avaliação da atividade antimicrobiana	66
a) Teste de suspensão	66
4.2.6 Citotoxicidade	68
4.3 Comparação da eficácia da biofuncionalização antibacteriana da lã e da PA 6.6 com os AMPs	71
Capítulo 5- Conclusão	72
<hr/>	
5.1 Perspetivas futuras	73
Capítulo 6- Referências	74
<hr/>	
Anexos	79

Lista de Figuras

Capítulo 1

Figura 1.1	Morfologia da fibra de lã.	4
Figura 1.2	Clivagem nucleofílica do 18-MEA da superfície da fibra de lã.	5
Figura 1.3	Representação esquemática de diferentes níveis de organização fibrilar da queratina da lã.	5
Figura 1.4	Cinco exemplos de possíveis ligações intermoleculares.	7
Figura 1.5	Representação das duas diferentes estruturas cristalinas da queratina da lã.	8
Figura 1.6	Representação esquemática da síntese da PA 6.6.	9
Figura 1.7	Representação esquemática das ligações de hidrogénio amida-amida existentes na PA 6.6.	11
Figura 1.8	Molécula de água entre a ligação de hidrogénio.	11
Figura 1.9	Representação esquemática dos possíveis métodos de incorporação dos agentes antimicrobianos nos materiais têxteis.	13
Figura 1.10	Diferentes estruturas dos AMPs.	24
Figura 1.11	Compreensão do comportamento dos AMPs nas membranas celulares.	25
Figura 1.12	Possível mecanismo de ação que ocorre na membrana citoplasmática de bactérias: <u>Modelo do Tapete</u> .	26
Figura 1.13	Possível mecanismo de ação que ocorre na membrana citoplasmática de bactérias: <u>Modelo do Barril</u> .	27
Figura 1.14	Possível mecanismo de ação que ocorre na membrana citoplasmática de bactérias: <u>Modelo do poro toroidal</u> .	27
Figura 1.15	Possível mecanismo de ação que ocorre na membrana citoplasmática de bactérias: <u>Modelo do poro toroidal desordenado</u> .	28
Figura 1.16	Mecanismos de ação intracelulares dos AMPs.	28

Capítulo 4

4.1 Biofuncionalização antibacteriana da lã com AMPs

Figura 4.1.1	Curva de calibração obtida através das soluções padrão de BSA.	46
Figura 4.1.2	Espectro FTIR da lã.	49
Figura 4.1.3	Espectros FTIR das amostras de lã funcionalizadas com os AMPs.	50
Figura 4.1.4	Espectros de difração de raio-x (DRX) da lã tratada durante 1h.	52

Figura 4.1.5	Imagens de microscopia eletrônica de varrimento (SEM) da lã não funcionalizada e das amostras de lã funcionalizadas com os AMPs.	53
Figura 4.1.6	Resultados obtidos no teste de difusão em agar: avaliação do efeito antimicrobiano.	54
Figura 4.1.7	Resultados obtidos no teste de suspensão: avaliação do efeito antimicrobiano.	56

4.2 Biofuncionalização antibacteriana da PA 6.6 com AMPs

Figura 4.2.1	Curva de calibração obtida através das soluções padrão de BSA.	59
Figura 4.2.2	Espectros de difração de raio-x (DRX) da PA 6.6 tratada durante 1h.	64
Figura 4.2.3	Imagens de microscopia eletrônica de varrimento (SEM) da PA 6.6 não funcionalizada e das amostras de PA 6.6 funcionalizadas com os AMPs.	65
Figura 4.2.4	Resultados obtidos no teste de suspensão: avaliação do efeito antimicrobiano.	67
Figura 4.2.5	Resultados obtidos no teste de citotoxicidade (MTT).	70

Lista de Tabelas

Capítulo 1

Tabela 1.1	Composição em aminoácidos da queratina da lã.	6
Tabela 1.2	Algumas propriedades físicas e térmicas da PA 6.6.	10

Capítulo 3

Tabela 3.1	Reagentes e equipamentos de uso corrente em laboratório usados no decorrer do trabalho.	35
Tabela 3.2	Sequência de aminoácidos da cecropina-B, [Ala5]-Tritrp7 e Cys-LC-LL-37.	36

Capítulo 4

4.1 Biofuncionalização antibacteriana da lã com AMPs

Tabela 4.1.1	Valores de MIC obtidos para o <i>Staphylococcus aureus</i> e para a <i>Klebsiella pneumoniae</i> dos AMPs em estudo.	45
Tabela 4.1.2	Resultados espectrofotométricos do ensaio do reagente de Bradford em solução.	47
Tabela 4.1.3	Resultados espectrofotométricos do ensaio do reagente de Bradford na amostra.	48
Tabela 4.1.4	Registo das intensidades dos picos a $2\theta=9,2^\circ$ e a $2\theta=20,02^\circ$ da amostra de lã não funcionalizada e das amostras de lã tratadas durante 1h.	52
Tabela 4.1.5	Resultados do teste quantitativo realizado nas amostras de lã funcionalizadas com os AMPs durante 1h.	56

4.2 Biofuncionalização antibacteriana da PA 6.6 com AMPs

Tabela 4.2.1	Valores de MIC obtidos para o <i>Staphylococcus aureus</i> e para a <i>Klebsiella pneumoniae</i> dos AMPs em estudo.	57
Tabela 4.2.2	Resultados espectrofotométricos do ensaio do reagente de Bradford em solução.	60
Tabela 4.2.3	Resultados espectrofotométricos do ensaio do reagente de Bradford na amostra.	62

Tabela 4.2.4	Registo das intensidades dos picos a $2\theta=20,26^\circ$ e a $2\theta=23,1^\circ$ da amostra de PA 6.6 não funcionalizada e das amostras de PA 6.6 tratadas durante 1h.	64
Tabela 4.2.5	Resultados do teste quantitativo realizado nas amostras de PA 6.6 funcionalizadas com os AMPs durante 1h.	67
Tabela 4.2.6	Resultados do teste de citotoxicidade (MTT).	69

Lista de Acrónimos

%E	Percentagem de esgotamento
18-MEA	Ácido 18-metileicosanóico
Ag ⁺	lão de prata
AgNO ₃	Nitrato de prata
Ala	Alanina
AMP	Péptido antimicrobiano
BSA	Albumina sérica bovina
CAMPs	Catelicidinas
CAQs	Compostos de amónio quaternário
CFU	Unidades Formadoras de Colónias
CO ₂	Dióxido de carbono
Cys	Cisteína
Da	Dalton
DD	Grau de desacetilação
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRX	Difração de raio-x
FBS	Soro fetal bovino
FG	Fosfatidilglicerol
FTIR-ATR	Espetroscopia de infravermelho por transformadas de Fourier
HCEC	Células epiteliais da córnea humana
LDH	Lactato desidrogenase
LPS	Lipopolissacarídeo
MHB	Mueller Hinton Broth
MIC	Concentração mínima inibitória
MLC	Concentração mínima letal
mRNA	RNA mensageiro
MTT	3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
MW	Massa molecular
NA	Nutrient Agar
NaCl	Cloreto de sódio
NB	Nutrient Broth
N-halaminas	Compostos aminas halogenadas
NHDF	Fibroblastos dérmicos humanos normais
NPs	Nanopartículas
PA	Poliamida
PA 6.6	Polihexametileno-adipamida

PBS	Tampão fosfato salino
PC	Fosfatidicolina
PHMB	Polihexametileno de biguanidina
pI	Ponto isoelétrico
Pro	Prolina
PS	Fosfatidilserina
SEM	Microscopia eletrônica de varrimento
SM	Esfingomielina
Spf	Sobre peso de fibra
SPFS	Síntese de péptidos em fase sólida
T _g	Temperatura de transição vítrea
Zn ²⁺	lão zinco

Contextualização e estrutura da dissertação

Nos últimos anos, verificaram-se diversos avanços tecnológicos na indústria têxtil. Com os avanços tecnológicos, surgiram os materiais têxteis com propriedades antimicrobianas.

A incorporação de propriedades antimicrobianas aos materiais têxteis é de facto relevante, pois o crescimento de microrganismos nos têxteis apresenta uma série de efeitos indesejados, não apenas para os próprios materiais mas também para quem os utiliza. Assim, e uma vez que em condições adequadas de temperatura, humidade e nutrientes, os microrganismos se multiplicam facilmente, a utilização de uma tecnologia inovadora que permite incorporar nos materiais têxteis determinados agentes que lhes conferem um efeito protetor antimicrobiano, tem sido apresentada e aplicada.

No entanto, apesar de existirem alguns agentes antimicrobianos referenciados na literatura, poucos são os que não apresentam limitações e desvantagens. Dessa forma, substâncias eficazes, duráveis e não tóxicas e, principalmente, com reduzida probabilidade de aquisição de resistência por parte das bactérias são potenciais soluções e estratégias.

Face a essa necessidade, o objetivo do presente trabalho consistiu em funcionalizar materiais têxteis, de origem natural e sintética, com péptidos antimicrobianos (AMPs), através de processos biotecnológicos. Os AMPs são compostos naturais, presentes na maioria dos seres vivos, que apresentam atividade antimicrobiana potente contra um amplo espectro de microrganismos.

No presente estudo, o efeito antibacteriano dos AMPs incorporados nos materiais têxteis foi comprovado sobre as estirpes *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae* de acordo com a Norma JIS 1902-2002. A seleção destas estirpes teve como base o facto de serem, muitas das vezes, responsáveis por infeções da pele e ainda também por estarem referenciadas nas normas que referenciam os têxteis antimicrobianos. Assim, uma vez que os microrganismos contactam regularmente com a pele e com os materiais têxteis em contacto com a pele, a aplicação de acabamentos antimicrobianos tem sido especialmente usada em materiais na área da higiene e saúde. Entre as possíveis aplicações médicas dos AMPs destaca-se a biofuncionalização de matérias têxteis. Neste caso, são exemplos, a sua aplicação em válvulas cardíacas, gazes de feridas crónicas, pensos curativos e em meias especiais para pés diabéticos, a fim de evitar o aparecimento de ulcerações. Além disso os AMPs podem ser também aplicados em materiais poliméricos utilizados em implantes e cateteres a fim de prevenir infeções.

Neste contexto, este trabalho visa estabelecer uma nova estratégia na biofuncionalização de materiais têxteis e encontra-se dividido em seis capítulos.

O primeiro capítulo contém a introdução ao tema e a revisão da literatura. Faz uma breve abordagem às fibras têxteis utilizadas e referencia as suas principais características.

Descreve de forma resumida e atualizada, o resultado da pesquisa bibliográfica sobre o tratamento antimicrobiano conferido aos materiais têxteis, focando-se em aspectos como características, aplicações e funcionalidades dos principais agentes antimicrobianos utilizados. Descreve ainda, de forma mais aprofundada, o potencial dos AMPs e destaca a sua classificação, mecanismos de ação e produção.

O segundo capítulo apresenta detalhadamente os objetivos da dissertação e no terceiro capítulo encontra-se toda a parte de desenvolvimento laboratorial, os materiais, os substratos têxteis utilizados, bem como a descrição dos métodos.

O quarto capítulo apresenta os resultados conseguidos ao longo do trabalho, e também a discussão dos mesmos.

O quinto capítulo apresenta as conclusões mais relevantes, mostra de forma resumida os principais resultados obtidos e propõe possíveis trabalhos futuros. E por fim, no sexto capítulo encontram-se as referências bibliográficas que serviram de base científica para a realização deste trabalho.

Capítulo 1

Introdução

1.1 Materiais têxteis

O início da utilização dos materiais têxteis remete-nos aos primórdios. Nessa altura os materiais têxteis eram utilizados com o objetivo de proteger o homem contra as condições climáticas. Tendo a importância dada à estética e ao conforto surgiu só mais tarde.

O interesse pelos materiais têxteis tornou-se cada vez maior e mais exigente e atualmente uma grande diversidade de fibras de origem natural e sintética encontram-se disponíveis, sendo selecionadas de acordo com o objetivo final e com a sua potencial aplicação [1].

Cada vez mais, a proximidade ao cliente e a capacidade de resposta são os pontos fortes da evolução do setor têxtil. É hoje um dado adquirido que o desenvolvimento tecnológico e a flexibilidade na resposta às exigências são os principais responsáveis pela obtenção de materiais têxteis com as mais diversas características e funcionalidades. Além disso, maior atenção tem sido dada aos caprichos do mercado e à inovação [2, 3].

Neste contexto, e de forma a diferenciar-se dos têxteis convencionais, o desenvolvimento de materiais têxteis funcionais que visam uma determinada característica funcional e não somente o aspeto estético, têm ganho cada vez mais destaque neste setor [3].

Assim, têxteis funcionais, nomeadamente têxteis com acabamentos antimicrobianos, de origem sintética ou de origem natural, permitem eliminar os microrganismos patogénicos e evitar a sua proliferação [2].

Desta forma, a utilização de uma tecnologia inovadora que permite incorporar nos materiais têxteis determinados agentes que conferem um efeito protetor antimicrobiano tem sido apresentada e aplicada, especialmente na área de higiene e saúde [2, 4]. Esses materiais visam apresentar potencialidades em termos de conforto, prevenção e controlo de determinados problemas de saúde [2, 3, 4].

Neste âmbito, no presente trabalho será dada especial atenção à biofuncionalização de materiais têxteis de origem natural e sintética, nomeadamente à lã e à poliamida, com AMPs.

1.1.1 Fibras proteicas

As fibras proteicas de origem animal são fibras naturais que são compostas por uma sequência específica de aminoácidos. Entre estas fibras destaca-se a lã que é principalmente constituída pela queratina, e a seda que possui como principal constituinte a fibroína [5].

Embora a lã e a seda apresentem grande importância na indústria têxtil, no âmbito deste trabalho irá apenas focar-se a estrutura e composição da fibra de lã.

A lã é uma fibra natural proteica, extremamente complexa, que tem sido amplamente utilizada como material têxtil. É mais leve, mais quente, mais macia e suave do que outras fibras e é formada nos folículos da pele [6, 7]. Assim, a fibra de lã é uma fibra única e de grande qualidade devido à sua resiliência e conforto. No entanto, a lã é um excelente hospedeiro para o crescimento e propagação de microrganismos. Por isso, acabamentos têxteis antimicrobianos sobre materiais à base de lã têm recebido grande destaque nos últimos anos [8].

▪ Estrutura física da lã

A fibra de lã é constituída por uma estrutura extremamente complexa que pode ser dividida em três componentes: cutícula, córtex e medula. Contudo, cada um desses componentes pode ser diferenciado e subdividido em várias camadas, figura 1.1 [9-12].

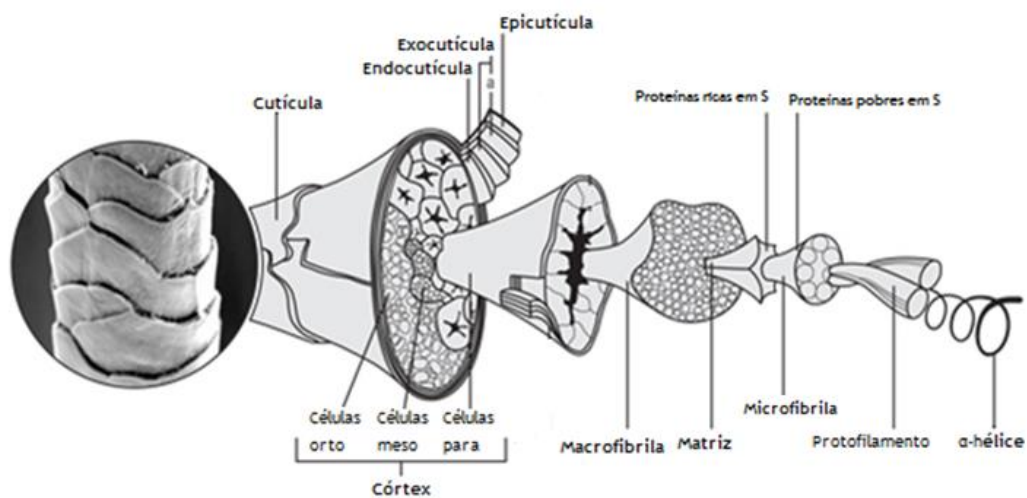


Figura 1.1- Morfologia da fibra de lã - Representação das principais características estruturais encontradas nas células corticais da fibra de lã (adaptado de [11]).

- **Cutícula:** A cutícula é constituída por células laminares que encaixam em torno do córtex - as escamas [12]. A camada mais externa dessas escamas é uma fina membrana conhecida como epicutícula formada por proteínas, mas também por lípidos. Apesar da quantidade de lípidos ser menor, uma camada lipídica externa ligada covalentemente confere à lã um

carácter hidrofóbico, mesmo após a remoção da gordura. Assim, o principal componente da superfície lipídica da lã é o ácido 18-metileicosanóico (18-MEA) que se encontra ligado, principalmente, por ligações tioéster (S-C=O) à proteína subjacente da epicutícula. Para melhorar a hidrofilicidade, vários tratamentos têm sido estudados. Estes tratamentos visam clivar as ligações S-C=O e formar grupos tióis (-SH) sobre a superfície da epicutícula, como demonstra a figura 1.2 [13].

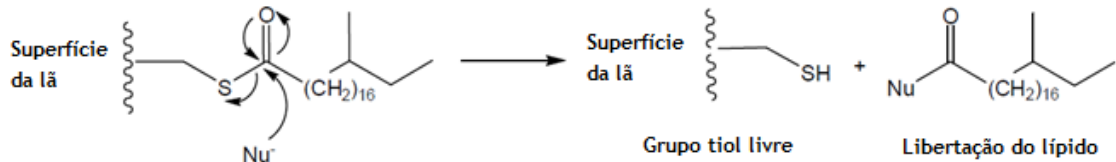


Figura 1.2- Clivagem nucleofílica do 18-MEA da superfície da fibra de lã (adaptado de [13]).

No entanto, como a epicutícula é a camada mais externa da córtica ainda recobre as seguintes camadas mais espessas: a exocutícula e a endocutícula, camada mais próxima do córtex [14].

- Córtex: O córtex é o principal constituinte da fibra de lã e é formado por células corticais de natureza fibrilar. Estas células encontram-se dispostas ao longo do eixo da fibra de uma forma alongada e fusiforme e podem ser diferenciadas em três tipos: orto-córtex, meso-córtex e para-córtex. Estes três tipos de células não se apresentam em igual distribuição e proporção em todos os tipos de lã [12].

As células do córtex são constituídas por microfibrilas que se encontram agrupadas em agregados conhecidos por macrofibrilas. Por sua vez as microfibrilas são formadas por um arranjo de elementos menores denominados protofibrilas que são compostas por protofilamentos. Os protofilamentos são pares de super-hélices que resultam do enrolamento de duas cadeias de α -queratina, figura 1.3 [9, 12].

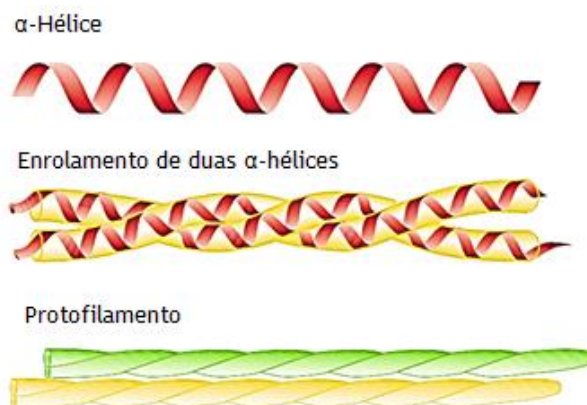


Figura 1.3 - Representação esquemática de diferentes níveis de organização fibrilar da queratina da lã (adaptado de [15]).

- Medula: Em determinados tipos de lã pode ainda existir uma zona central denominada medula. Esta zona é formada por células medulares de diferente formato e densidade das do córtex [12].

▪ Composição química da lã

Em termos de composição química, a lã é principalmente constituída por uma proteína, a queratina. A queratina da lã é composta por dezoito aminoácidos que se encontram na proporção indicada na tabela 1.1 [12].

Tabela 1.1- Composição em aminoácidos da queratina da lã (adaptado de [12]).

	% Resíduos na Lã
Alanina	5,2
Arginina	6,2
Ácido aspártico	5,9
Cistina/Cisteína	13,1
Ácido glutâmico	11,1
Glicina	8,6
Histidina	0,8
Isoleucina	3,0
Leucina	7,2
Lisina	2,7
Metionina	0,5
Fenilalanina	2,5
Prolina	6,6
Serina	10,8
Trionina	6,5
Tirosina	3,8
Valina	3,7

À semelhança de todas as proteínas, as cadeias laterais dos aminoácidos constituintes da queratina da lã contêm grupos aniónicos e catiónicos que conferem à lã um carácter anfotérico. Portanto, o carácter catiónico é-lhe conferido pelas cadeias laterais protonadas dos resíduos de arginina, lisina e histidina, e pela protonação do pequeno número de grupos amino livres (NH_2), localizados nas extremidades das cadeias peptídicas, em grupos amino protonados (NH_3^+). Enquanto que, por outro lado, o carácter aniónico se deve às cadeias laterais dissociadas do ácido aspártico e glutâmico e à dissociação dos grupos terminais carboxilo (COOH) em iões carboxilato (COO^-) [16].

Ainda assim, as cadeias laterais dos aminoácidos constituintes da queratina da lã podem formar ligações intermoleculares com outra cadeia polipeptídica por vários tipos de

ligação. Na figura 1.4, cinco exemplos de possíveis ligações intermoleculares são apresentados [16].

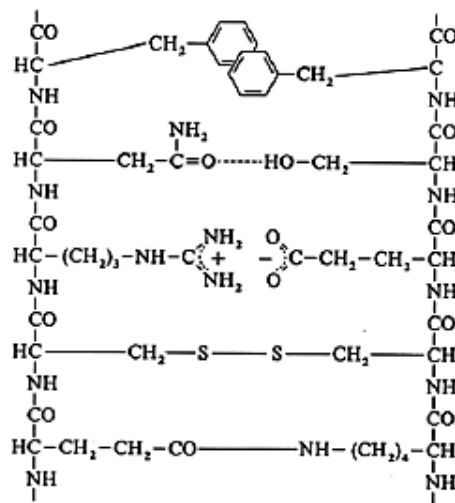


Figura 1.4 - Cinco exemplos de possíveis ligações intermoleculares. 1- Interação hidrofóbica entre anéis fenílo; 2- Formação de uma ligação de hidrogénio entre por exemplo um resíduo de arginina e um resíduo de serina; 3- Ligação salina ou interação eletrostática entre um resíduo de arginina catiónico e um resíduo de ácido glutâmico aniónico; 4- Ligação dissulfureto entre dois resíduos de cisteína; 5- Ponte iso-dipéptido entre um resíduo de ácido glutâmico e um resíduo de lisina (adaptado de [16]).

No entanto, entre os exemplos apresentados de possíveis ligações intermoleculares a formação de ligações dissulfureto (-S-S-) entre dois resíduos de cisteína (Cys) é a mais relevante, pois confere estabilidade à fibra de lã. Além disso, a estrutura tridimensional da proteína da lã é também estabilizada por uma grande variedade de interações eletrostáticas entre as cadeias laterais dos aminoácidos constituintes [16].

▪ Ponto isoelétrico da lã

O pH do meio é decisivo para a reatividade da lã. Os principais grupos reativos da fibra de lã são os grupos carboxilo desprotonados (COO^-) carregados negativamente e os grupos amino protonados (NH_3^+) carregados positivamente. Assim, no ponto isoelétrico (pI), a lã apresenta uma carga líquida igual a zero que corresponde a um equilíbrio entre cargas positivas e negativas [17].

Por conseguinte, em meio ácido, os grupos COO^- da lã são protonados em COOH e os grupos NH_3^+ permanecem carregados positivamente. Estas transformações fazem com que a pH ácido a lã apresente uma carga líquida positiva. Já a pH básico apresenta uma carga líquida negativa pois os grupos NH_3^+ e COOH são desprotonados, originando grupos amino, eletricamente neutros (NH_2) e grupos carboxilo carregados negativamente (COO^-) [17].

Assim, apesar da queratina da lã resultar da combinação de dezoito aminoácidos, a composição, proporção e distribuição dos aminoácidos ao longo da cadeia polipeptídica da

queratina pode variar. Esta variação é a razão para que através da realização de diversos estudos nenhum valor em concreto tenha sido obtido para o ponto isoelétrico da lã [18]. Assim, a queratina da lã não possui um ponto isoelétrico bem definido, mas uma região ou zona isoelétrica entre o pH 4.5 e 7 [17].

▪ Queratina da lã

A queratina é uma proteína fibrosa que na fibra de lã apresenta duas estruturas cristalinas diferentes. Essas duas estruturas representam duas diferentes conformações da cadeia, figura 1.5.

A conformação em α -hélice (α -queratina) é característica das fibras de lã no seu estado natural, isto é, quando a fibra não é esticada ao longo do seu eixo. Mas se a lã é esticada, existe uma transformação gradual e reversível da α -queratina para β -queratina. A β -queratina apresenta uma conformação instável e quando a força de alongamento desaparece a conformação da queratina reverte para estrutura em α -hélice [19].

Além disso, a estrutura em α -hélice é estabilizada por ligações de hidrogénio intramoleculares. Enquanto na estrutura da β -queratina, as cadeias peptídicas estão esticadas para formar o que é chamado de uma estrutura em folha- β . Cada folha estabelece ligações de hidrogénio entre os grupos laterais de cadeias peptídicas opostas, isto é, ligações intermoleculares [20-22].

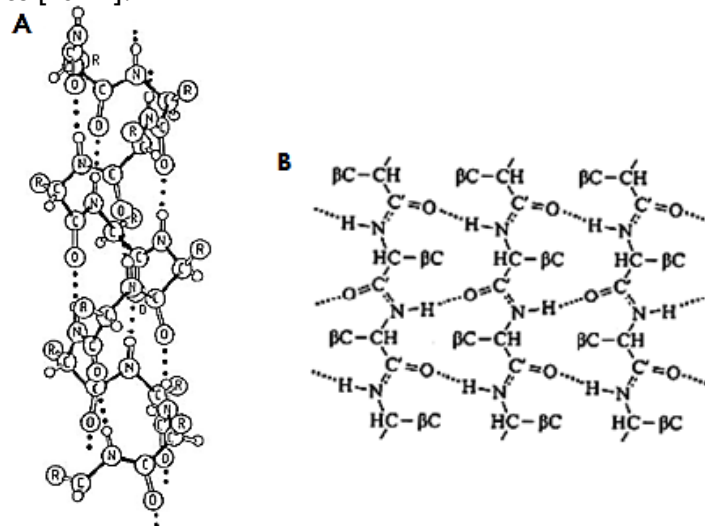


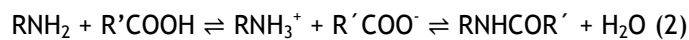
Figura 1.5- Representação das duas diferentes estruturas cristalinas da queratina da lã. A - Estrutura em α -hélice da α -queratina [16]; B - Estrutura em folhas- β da β -queratina (adaptado de [16]).

1.1.2 Fibras poliamídicas

As poliamidas (PAs) são macromoléculas formadas pela repetição de unidades estruturais, unidas por ligações amida (-NHCO-). A natureza da unidade estrutural é a base

para a classificação das fibras poliamídicas. E assim, poliamidas alifáticas cujas unidades estruturais derivam predominantemente de monómeros alifáticos são genericamente designadas por *nylons*. Enquanto, poliamidas aromáticas, em que pelo menos 85% dos grupos -NHCO- estão diretamente ligados a dois anéis aromáticos, são designadas por *aramidas* [12].

As poliamidas são na sua maioria sintetizadas por amidação direta. Ou seja, são fibras sintéticas cujos monómeros se ligam por ligações peptídicas quando um grupo -NH₂ reage com um grupo -COOH, libertando-se uma molécula de água. No processo de síntese o grupo -NH₂ reativo e o grupo -COOH podem estar presentes em uma única molécula (1) ou em moléculas diferentes (2) [12].



(R representa um segmento de cadeia alifática ou uma unidade aromática)

Para diferenciar as poliamidas sintetizadas, números que indicam a quantidade de átomos de carbono nas unidades monoméricas originais, são utilizados [12]. As poliamidas 6 e 6.6 têm sido distinguidas no mercado mundial como duas das fibras têxteis sintéticas mais importantes [23]. No entanto, neste ponto focar-se-á apenas um dos membros da família das poliamidas, a poliamida 6.6 (PA 6.6) ou *nylon 6.6*, por ser a mais utilizada em materiais têxteis.

1.1.2.1 Poliamida 6.6 (Nylon 6.6)

▪ Composição química da PA 6.6

A poliamida 6.6 (PA 6.6) é o termo genérico para a polihexametileno-adipamida. A PA 6.6 é sintetizada por policondensação do ácido adípico e hexametileno diamina, sendo referida como 6.6 pelo facto dos dois tipos de unidades repetitivas terem seis átomos de carbono. Assim, a reação entre os grupos -COOH do ácido adípico e os grupos -NH₂ do hexanometileno diamina permite a formação da ligação peptídica com eliminação de uma molécula de água. Esta reação, entre os grupos funcionais, prossegue formando-se uma cadeia longa e repetida de unidades de PA 6.6, como se pode ver pela figura 1.6 [24 e 25].

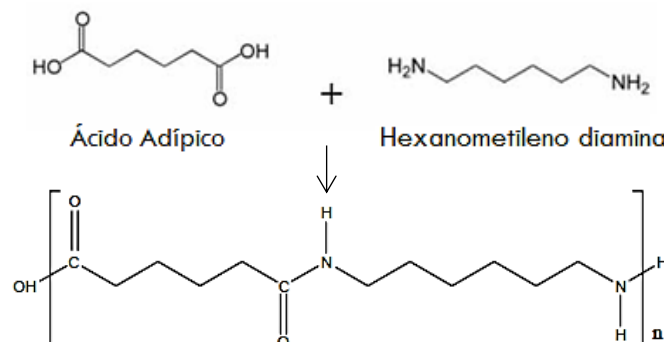


Figura 1.6- Representação esquemática da síntese da PA 6.6 (adaptado de [25]).

▪ Propriedades da PA 6.6

A PA 6.6 é um polímero higroscópico que apresenta boas propriedades físicas, químicas e térmicas. Possui excelente isolamento térmico/elétrico, um elevado alongamento à ruptura e uma elevada tenacidade. Além disso, apresenta uma excelente durabilidade da cor, um elevado ponto de fusão e uma boa resistência mecânica, química e à abrasão. É uma fibra leve e macia que não encolhe nem deforma e tem elevada elasticidade [24, 26, 27]. Embora a PA 6.6 seja mais hidrofílica (ângulo de contacto $\sim 67^\circ$) que muitos outros polímeros, por apresentar grupos -NHCO- ao longo da sua cadeia, possui um reduzido número de grupos funcionais, -COOH e -NH₂, que exibem características polares e hidrofílicas, nos extremos da macromolécula [28 e 29].

Com objetivo de melhorar a sua capacidade de absorção vários estudos têm sido realizados para modificar a superfície da PA 6.6 [24].

A tabela 1.2 resume os valores de algumas propriedades físicas e térmicas da PA 6.6.

Tabela 1.2- Algumas propriedades físicas e térmicas da PA 6.6 (adaptado de [23]).

Propriedades - PA 6.6	
Ponto de fusão	262°C
Temperatura de transição vítrea (T _g)	65°C
Módulo de elasticidade	2,9 GPa

▪ Estrutura da PA 6.6

A PA 6.6 é um polímero semicristalino que possui zonas cristalinas perfeitamente ordenadas e zonas amorfas que conferem ao polímero uma determinada flexibilidade.

A estrutura cristalina depende das ligações intermoleculares de hidrogénio que se formam, ao longo da cadeia, entre os grupos laterais -NHCO-. No caso da PA 6.6 as ligações de hidrogénio existentes entre as várias cadeias encontram-se deslocadas umas em relação às outras e formam um zig-zag o que facilita o alinhamento das macromoléculas e a capacidade de formação da fibra, figura 1.7 [30].

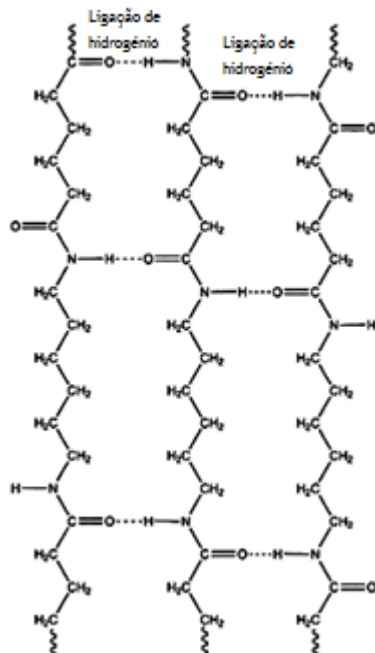


Figura 1.7- Representação esquemática das ligações de hidrogênio amida-amida existentes na PA 6.6 (adaptado de [30]).

Desta forma, a obtenção de uma estrutura ordenada é relevante e conseqüentemente influencia o valor do ponto de fusão. Esse valor aumenta linearmente com a concentração dos grupos -NHCO-, o que justifica o elevado valor do ponto de fusão da PA 6.6 (262°C). Assim, a estrutura cristalina depende principalmente da concentração dos grupos -NHCO- e nomeadamente da simetria molecular [30].

Por outro lado, devido à natureza higroscópica das ligações de hidrogênio, as moléculas de água conseguem colocar-se entre as ligações intermoleculares fazendo parte da estrutura do polímero, figura 1.8. Logo, a presença de água irá funcionar como um plastificante, separando as cadeias macromoleculares e reduzindo a cristalinidade, assim como a temperatura de transição vítrea (T_g) do polímero. Contrariamente, irá aumentar a resistência ao impacto e à tenacidade [31].

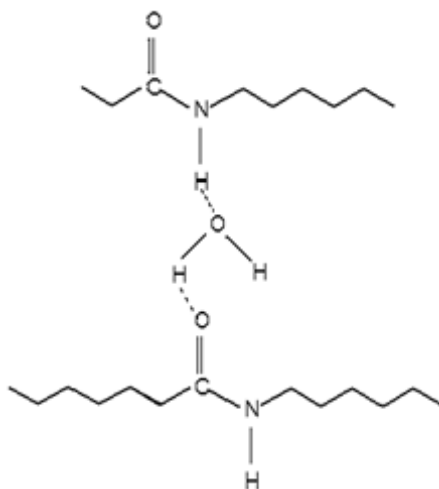


Figura 1.8 - Molécula de água entre a ligação de hidrogênio (adaptado de [32]).

▪ Aplicações

Atualmente a PA 6.6 tem sido amplamente utilizada na preparação de membranas [28]. Contudo, a sua principal aplicação na área têxtil surge na fabricação de tecidos e na construção de malhas que proporcionam maior conforto, durabilidade e funcionalidade aos materiais. Neste caso, é em peças de moda íntima e em artigos de desporto ou biomédicos que estes materiais têxteis têm sido mais aplicados [27].

1.2 Acabamentos antimicrobianos nos têxteis

A consciência de que o tratamento antimicrobiano dos materiais têxteis é de vital importância para a saúde pública fez com que uma nova área surgisse no domínio dos acabamentos têxteis [33, 35].

A velocidade a que os microrganismos se desenvolvem sobre os materiais têxteis é drasticamente elevada, em condições de humidade e temperatura adequadas. Logo, nestas condições os materiais têxteis são um excelente substrato para a proliferação de microrganismos, nomeadamente de bactérias e fungos, apresentando uma série de efeitos indesejados, não só para os próprios têxteis, mas também para quem os utiliza [4, 34, 35, 36].

Assim, em ambiente hospitalar, o uso de materiais têxteis antimicrobianos é particularmente importante. Estes podem reduzir significativamente o risco de infeções, sobretudo quando usados em contacto direto com o corpo, o que evita a contaminação de doentes e de profissionais de saúde [2, 33].

A finalidade de conferir atividade antimicrobiana aos têxteis tem, assim, como objetivo não só proteger o material do ataque microbiano, mas também prevenir a transmissão e propagação de microrganismos patogénicos, inibir o desenvolvimento de odores resultantes da degradação microbiana e criar novos materiais que atuem como tratamento preventivo e/ou curativo [2, 4, 33, 34, 35, 36].

Contudo, para que os acabamentos antimicrobianos aplicados nos materiais têxteis sejam benéficos, uma série de requisitos tem de ser necessariamente cumprida. Isto é, os acabamentos antimicrobianos devem ser eficazes contra um amplo espetro de microrganismos, não devem ser tóxicos para o consumidor e não devem apresentar efeitos nefastos para o meio ambiente. Além disso, não devem afetar de forma negativa a qualidade do material e o seu aspeto, devendo ser duráveis e resistentes, tanto às condições atmosféricas (luz, humidade) como a fluidos corporais. Inevitavelmente, devem também ser compatíveis com a flora bacteriana não patogénica residente na superfície da pele, evitar reações alérgicas e irritações e exibir uma boa relação custo/eficácia [33-36].

▪ Métodos de acabamentos antimicrobianos

Vários métodos têm sido utilizados para funcionalizar materiais têxteis, podendo dividir-se, de forma generalizada, em dois grupos distintos. No primeiro grupo os agentes antimicrobianos são incorporados diretamente na produção das fibras, ou seja, antes ou simultaneamente à extrusão. No segundo os agentes antimicrobianos são adicionados durante o acabamento dos materiais têxteis, por processos de impregnação, esgotamento, pulverização/*spraying* ou revestimento/*coating*, figura 1.9 [33-35].

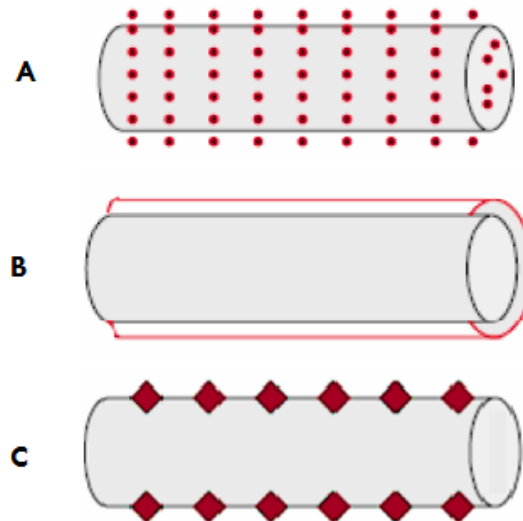


Figura 1.9- Representação esquemática dos possíveis métodos de incorporação dos agentes antimicrobianos nos materiais têxteis. A- Agente antimicrobiano incorporado na fibra (libertação controlada); B- Agente antimicrobiano adsorvido à superfície da fibra; C- Agente antimicrobiano ligado quimicamente à fibra (adaptado de [33]).

O método em que os agentes antimicrobianos são incorporados antes ou simultaneamente à extrusão é mais apropriado para fibras de origem sintética. Neste caso, os agentes são adicionados no interior da fibra e para que o acabamento seja eficiente os compostos utilizados têm de migrar para a superfície do material e ser libertados lentamente. Por outro lado, nos casos em que os agentes antimicrobianos são incorporados na fase de acabamento dos materiais têxteis por processos de esgotamento e impregnação, o agente antimicrobiano é adicionado na superfície do material. No entanto, revestimentos por recobrimento da superfície com um filme e utilização de pós para deposição sobre a superfície do material têm também sido utilizados a fim de conceder as propriedades desejadas aos materiais [33].

Os agentes antimicrobianos podem ainda, de forma similar, ligar-se quimicamente à superfície do material têxtil. Este tipo de ligação é mais durável, o que confere maior resistência à lavagem. Contudo, a durabilidade à lavagem de um agente pode não ser garantia

de atividade antimicrobiana, pois os agentes podem perder a atividade, tornando-se inativos [4, 33].

Além destes métodos, outra técnica bastante simples tem também conferido a funcionalidade pretendida aos materiais. Esta consiste em encapsular os agentes antimicrobianos em nanopartículas de sol-gel, para posterior fixação nos materiais têxteis [4].

Assim, a adesão dos agentes antimicrobianos nos materiais têxteis pode ser conseguida de diferentes formas, sendo o procedimento escolhido o mais adequado à utilização pretendida. Ou seja, se o material têxtil for utilizado por um curto período de tempo, o agente não necessita de ser tão fortemente ligado como os incorporados em materiais de uso continuado pois, neste caso é indispensável que o agente tenha uma boa capacidade de fixação e permanência no material [37].

Além disso, a seleção do método de funcionalização é também dependente do agente e do tipo de fibra utilizada [36]. Porém, mesmo existindo uma grande diversidade de procedimentos para funcionalizar os materiais têxteis, é cada vez mais recorrente a sua utilização aliada à tecnologia, uma vez que esta aliança permite aumentar a permanência do agente antimicrobiano no material têxtil. Entre estas tecnologias destaca-se a libertação controlada do agente antimicrobiano, o tratamento da superfície da fibra e a ligação química dos agentes antimicrobianos à fibra [35].

1.3 Avaliação da eficácia antimicrobiana

▪ Testes antimicrobianos

Para avaliar o efeito antimicrobiano provocado pelos agentes incorporados nos materiais têxteis, é necessário determinar a sua atividade antimicrobiana após o processo de acabamento. Nesse sentido, a eficácia dos agentes incorporados nos materiais têxteis é normalmente avaliada por testes antimicrobianos. Com esse objetivo, a atividade antimicrobiana dos compostos adicionados aos materiais têxteis pode ser quantificada com base nas normas AATCC TM100 e TM147, JIS L 1902, ASTM E 2149 e ISO 20743, através do método de difusão em agar e/ou do método em suspensão [4, 33, 34].

O teste de difusão em agar é qualitativo, relativamente rápido, barato e simples. Neste teste, a atividade antimicrobiana é expressa através da inibição do crescimento microbiano observada pela formação de uma zona de inibição em torno da amostra funcionalizada. Assim, a ausência de crescimento indica que o agente antimicrobiano utilizado atua de forma inibitória [4, 33, 34].

Contudo, este teste não é apropriado para todos os tipos de materiais têxteis, nem para analisar a difusão no agar de diferentes agentes antimicrobianos. Esta limitação deve-se ao facto da taxa de difusão poder ser distinta para diferentes agentes [33, 35].

Além disso, a taxa de difusão do agente para o inóculo influencia o crescimento da zona de inibição sendo que o tamanho dessa zona indica a eficiência da atividade antimicrobiana ou a taxa de libertação do agente ativo. Assim, uma ligação forte do agente ao material têxtil (por exemplo, ligação covalente) dificulta a sua difusão para o meio e deste modo impossibilita a interação entre o agente e o microrganismo, impedindo a formação da zona de inibição [4, 34, 35]. É também de salientar que a existência de uma zona de inibição não implica necessariamente a morte dos microrganismos (efeito biocida), pois eles podem apenas ser impedidos de crescer (efeito bioestático) [33].

O teste de suspensão, ao contrário do de difusão em agar, fornece valores quantitativos e pode ser usado para todos os tipos de materiais têxteis e agentes antimicrobianos. Este permite que sejam feitas comparações entre diferentes tratamentos antimicrobianos, bem como entre vários níveis de tratamento no mesmo material têxtil. No entanto, é mais trabalhoso e dispendioso. Neste caso a eficácia antimicrobiana é avaliada pela redução da população microbiana através da contagem do número de microrganismos, comparando o tamanho da população controlo com o tamanho da população relativa às amostras funcionalizadas com o agente antibacteriano [4, 33, 34].

A principal limitação destes testes é, na sua maioria, a reduzida reprodutibilidade dos resultados. Dessa forma, os métodos de ensaio antimicrobianos devem ser realizados sob condições controladas e padronizadas, a fim de garantir a reprodutibilidade dos resultados. Além disso, a avaliação dos resultados obtidos por estes dois métodos requer uma compreensão cuidadosa e básica de microbiologia, sendo fundamental compreender as vantagens e limitações de cada método e o modo de ação do agente antimicrobiano em questão [33].

Existe assim, cada vez mais, uma necessidade crescente de ensaios microbiológicos mais seguros, rápidos e baratos [33].

A este respeito é importante destacar que os testes antimicrobianos normalmente utilizados apenas avaliam a capacidade antimicrobiana do material têxtil funcionalizado. Porém, devem ser realizados outros ensaios para que estes materiais possam ser comercializados. Assim, para certificar que o material é seguro para o utilizador e para o ambiente, devem ser realizados testes que avaliem a biocompatibilidade, nomeadamente a citotoxicidade, sensibilidade e irritabilidade, em parceria com testes de ecotoxicidade [4, 34, 36].

1.4 Agentes antimicrobianos

A escolha apropriada do agente antimicrobiano é de fundamental importância. Para isso é necessário compreender o que é verdadeiramente um agente antimicrobiano e como é que os agentes que se encontram disponíveis são utilizados e atuam.

Certos compostos com ação antimicrobiana podem ser usados para controlar a invasão microbiana, sendo designados por agentes antimicrobianos. Ou seja, os agentes antimicrobianos são compostos naturais ou sintéticos, que apresentam efeito biocida ou bioestático sobre o crescimento microbiano. Assim, quando um agente antimicrobiano provoca a morte dos microrganismos é designado biocida e quando inibe o crescimento dos microrganismos é chamado bioestático. Sendo o efeito do agente biocida estudado em função da concentração mínima letal (MLC) e o do agente bioestático em função da concentração mínima inibitória (MIC) [4, 33, 34, 35].

Por outro lado, os mecanismos, pelos quais as substâncias antimicrobianas atuam sobre o crescimento microbiano, são extremamente variados e dependentes do tipo de agente utilizado. Geralmente, os agentes antimicrobianos permeabilizam a célula, inibem a síntese da parede celular, a síntese proteica e/ou a síntese de ácidos nucleicos. Porém, podem também inibir diversas enzimas do metabolismo citoplasmático, tornando impossível a sobrevivência da célula [34].

Com esse objetivo, alguns dos importantes agentes antibacterianos utilizados em acabamentos têxteis são mencionados e descritos posteriormente. Também de seguida serão destacados alguns exemplos relevantes de recentes aplicações de compostos aplicados nos materiais têxteis nos últimos anos, nomeadamente nos materiais em estudo, lã e poliamida.

Os compostos orgânicos sintéticos como o triclosano, o amónio quaternário, o polihexametileno de biguanidina (PHMB) e as N-halaminas são alguns dos agentes mais utilizados. Tal como os metais como a prata (e seus respetivos sais).

No entanto, a utilização destes compostos apresenta alguns efeitos indesejáveis pois a maioria exibe um espectro reduzido de inibição microbiana, podendo ainda causar irritações na pele, ecotoxicidade e resistência a bactérias. Além disso, durante os processos de lavagem e uso dos materiais têxteis a atividade do biocida pode ser perdida gradualmente, sendo necessário aplicá-lo em concentrações elevadas para, eficientemente, controlar o crescimento microbiano e manter a sua durabilidade. Desta forma, a contaminação dos efluentes, devido às elevadas dosagens de agentes aplicados, tem sido também verificada [2, 34].

Para minimizar estas desvantagens, uma variedade de compostos de origem natural como o quitosano, extratos naturais e aminoácidos têm sido avaliados como sendo potenciais agentes antimicrobianos para materiais têxteis, pois não são tóxicos e são ecológicos [33]. Contudo, ainda que existam inúmeras vantagens associadas à utilização destes compostos de origem natural é ainda necessário melhorar alguns aspetos, pois os extratos são difíceis de

obter e purificar e, normalmente, são extraídos em quantidades reduzidas. Além disso, uma das maiores limitações dos acabamentos antimicrobianos com agentes naturais é a sua baixa durabilidade e resistência [2].

1.4.1 Compostos orgânicos sintéticos

a) Triclosano - O triclosano, éter 2,4,4-tricloro-2-hidroxidifenil, é um composto fenólico utilizado como agente antimicrobiano. Apresenta um amplo espectro de ação exibindo atividade antimicrobiana principalmente para as bactérias, sendo a atividade antifúngica não tão significativa [4, 33]. Atua sobre o crescimento microbiano, inibindo a biossíntese de lípidos. Além disso, quando exposto à luz solar, o triclosano forma dioxinas que têm potenciais efeitos tóxicos no ambiente e que provocam possíveis danos na saúde, por serem altamente cancerígenas [33]. Assim, além desta limitação, a resistência bacteriana a este composto também suscita uma enorme preocupação [4], tendo uma reavaliação da sua segurança levado a que fosse proibido o seu uso, sendo retirado do mercado em alguns países europeus [33, 34].

A poliamida é um exemplo de fibra à qual tem sido aplicado o triclosano. Este composto pode ser adicionado antes da extrusão da fibra ou na fase de acabamento têxtil por um processo de esgotamento [34].

b) Compostos de amónio quaternário (CAQs) - Os CAQs são compostos ativos de superfície catiónica, pois apresentam uma carga positiva no átomo de azoto. Apresentam atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, fungos e alguns tipos de vírus [4].

A atividade antimicrobiana que estes compostos apresentam advém da interação eletrostática entre o grupo amónio catiónico dos CAQs e as membranas celulares microbianas carregadas negativamente. Estas interações provocam danos nas membranas microbianas afetando as suas funções essenciais e, por conseguinte, levam à desnaturação de proteínas celulares essenciais, e à rutura da membrana. Os CAQs podem também afetar o DNA, impedindo a sua replicação [4, 33].

A lã e a poliamida são exemplos de fibras têxteis onde têm sido aplicados estes compostos. Acredita-se que a ligação dos CAQs aos substratos têxteis seja efetuada por interações iónicas entre o CAQ catiónico e a superfície aniónica da fibra. Portanto, na lã os grupos carboxilo do glutamato e aspartato conferem à fibra o carácter aniónico [34]. Em outro estudo tentou-se ligar um CAQ covalentemente à lã. Neste caso, este composto reagiu com a lã por intermédio dos seus grupos -SH livres ligando-se aos grupos -SH da Cys ou à ligação S-S da cistina presente na lã, formando uma ligação S-S assimétrica [34].

Relativamente à poliamida, uma vez que contem menos locais reativos e é bastante resistente a processos de modificação química, existem estudos em que os CAQs foram ligados às fibras através de corantes que atuam como ligantes, tendo a interação iónica entre as

moléculas de corante e os CAQs demonstrado ser suficientemente forte para proporcionar um acabamento antimicrobiano semi-durável [34].

c) Polihexametileno de biguanidina (PHMB) - O PHMB é um dos poucos agentes antimicrobianos que apresenta efeito biocida. O efeito biocida conferido a estes compostos deve-se aos núcleos catiónicos de biguanidina que interagem com as membranas microbianas carregadas negativamente. Assim, estes compostos ao interagirem com as membranas microbianas provocam a lise dos microrganismos, pois alteram a fluidez da membrana, aumentam a sua permeabilidade e levam à perda da integridade celular provocando libertação de eletrólitos citoplasmáticos, em particular, iões sódio e potássio [4, 33].

O PHMB apresenta um amplo espectro de atividade contra bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos, apresenta baixa toxicidade e um impacto ambiental aceitável [4].

O tratamento da lã pela incorporação do PHMB por um processo de esgotamento tem sido um exemplo de aplicação deste tipo de agente [38]. Além desta aplicação, na poliamida o PHMB tem sido incorporado por um processo de esgotamento ou impregnação da fibra sintética [34].

d) Compostos aminas halogenadas (N-Halaminas) - As N-halaminas são compostos orgânicos heterocíclicos que contêm um átomo de azoto ligado a um átomo de halogénio (N-X). Esta ligação é designada por ligação halamina e o X, normalmente, representa um átomo de cloro (N-Cl) [4, 34].

As N-halaminas são agentes regeneráveis e inibem os microrganismos maioritariamente por mecanismos de oxidação. Este tipo de mecanismo deve-se à substituição eletrofílica na ligação N-Cl do átomo de cloro (Cl) por um átomo de hidrogénio (H) que leva à formação de iões cloro (Cl^+). Estes iões por sua vez ligam-se aos microrganismos e impedem processos enzimáticos e metabólicos levando à lise da célula. Ou seja, a forte ação bactericida associada a estes compostos é atribuída às propriedades oxidativas das ligações halamina (N-Cl), nomeadamente, ao forte poder oxidativo do cloro sobre os microrganismos [4, 33].

Assim, devido à reversibilidade das ligações halamina as N-halaminas apresentam atividade antimicrobiana duradoura e são ativas contra um amplo espectro de bactérias, fungos e vírus [4].

Posto isto, estudos demonstraram que as fibras de poliamida podem apresentar propriedades antimicrobianas regeneráveis por ligação covalente das N-halaminas ao átomo de azoto de um monómero de $-\text{NHCO}-$ da poliamida. Este acabamento foi conseguido por tratamento químico das moléculas do polímero sobre a superfície da fibra, porém, com alguma degradação das fibras [39].

1.4.2 Compostos metálicos

a) Prata e Sais de Prata - A prata e os sais de prata são os biocidas inorgânicos mais utilizados. Numa fase inicial, o nitrato de prata (AgNO_3) foi o sal mais utilizado. Recentemente, as nanopartículas (NPs) de prata são as mais estudadas e aplicadas, podendo ser utilizadas em curativos e na cicatrização de feridas [4, 33, 34, 36].

A prata quer no seu estado livre ou combinada com outros compostos é altamente tóxica para os microrganismos mesmo em baixas concentrações, apresenta um amplo espectro de atividade e age afetando o metabolismo celular. Ou seja, os compostos de prata ao estabelecerem uma ligação com a membrana provocam rupturas tornando a célula permeável, ocorrendo então a libertação do conteúdo intracelular para o exterior e, conseqüentemente, a lise da célula [33, 34].

Além disso, tem sido relatado que os compostos de prata apresentam ainda grande afinidade para os grupos fosfatos e para ligações S-S. Assim, uma vez que as membranas bacterianas contêm na sua constituição proteínas que têm grupos -SH e grupos fosfato, estes constituintes são um dos locais preferenciais para a ação destes compostos [4, 33, 36].

Mais ainda, quando estes compostos entram em contacto com um meio húmido ocorre a formação de iões de prata (Ag^+). Apesar de existirem em pequena concentração, estes iões intensificam o efeito biocida, mas em condições normais não são tão tóxicos para os microrganismos [4, 33].

Exemplos de aplicações mais recentes são o revestimento da poliamida com NPs de prata por um método simples e eficaz de irradiação com ultrassons [40] e o tratamento da lã com NPs de prata pelo processo de esgotamento [41]. Contudo, ainda se colocam questões de durabilidade reduzida e oxidação.

1.4.3 Compostos naturais

a) Quitosano - O quitosano é um polissacarídeo catiónico produzido através da desacetilação da quitina. Apresenta uma combinação de propriedades únicas, tais como biodegradabilidade, biocompatibilidade, não-toxicidade e atividade antimicrobiana e é encontrado principalmente no exoesqueleto de crustáceos [4, 35]. A sua propriedade antimicrobiana está relacionada com o facto de em solução aquosa de pH ácido, a sua forma protonada (NH_3^+) se comportar como um polielectrólito catiónico. Assim, ao interagir com as membranas carregadas negativamente irá ocorrer a perda da integridade da membrana celular, bem como alterações na permeabilidade da célula, o que induz a libertação de compostos intracelulares. Além deste mecanismo de ação, o quitosano pode ligar-se ao DNA inibindo a síntese de mRNA [4, 34, 35].

A capacidade antimicrobiana do quitosano pode ser influenciada por parâmetros estruturais como o grau de desacetilação (DD), massa molecular (MW) e pela razão entre grupos amino protonados (NH_3^+) e não protonados (NH_2) [4, 33].

Acabamentos antimicrobianos em que o quitosano foi aplicado na lã foram realizados por processos de impregnação e sol-gel [42]. Já, na poliamida, primeiramente a fibra foi ativada por plasma e de seguida incorporado o quitosano que lhe conferiu propriedades antimicrobianas [43], no entanto, os resultados conduzem a níveis de redução microbiana substancialmente baixos.

b) Outros polissacarídeos naturais - Outros polissacarídeos naturais que desempenham um papel importante a nível dos têxteis hospitalares são o ácido hialurónico, o alginato e a heparina. Estes podem ser implementados em dispositivos médicos, como por exemplo, em implantes e pensos, devido à sua boa atividade antimicrobiana. Desta forma, o ácido hialurónico pode ser utilizado na cicatrização de feridas em meio húmido, os copolímeros de alginato podem ser utilizados em pensos para feridas, devido à sua elevada capacidade de absorção, e a heparina pode ser usada para revestir veias artificiais de tereftalato de polietileno, melhorando a sua biocompatibilidade [33].

1.4.4 Extratos naturais

Alguns produtos naturais à base de plantas e os seus extratos têm suscitado grande interesse por demonstrarem atividade antimicrobiana. Desta forma, derivados de plantas como óleo de eucalipto, tulsi, extratos de nem e aloé vera têm demonstrado atividade antimicrobiana contra vários microrganismos. Estes produtos são constituídos por substâncias fenólicas, terpenóides, óleos essenciais, alcalóides, lectinas, polipéptidos e poliactenos, que lhes confere, não só atividade antimicrobiana mas também antioxidante. Isto é especialmente importante, pois fornecem aos materiais redução de espécies reativas de oxigénio, além de inibição antimicrobiana [33].

Muitas vezes, são também extraídos de plantas compostos naturais que conjuntamente com a atividade antimicrobiana exibem capacidade de tingimento [34]. Assim, corantes e pigmentos têm sido extraídos, não só de plantas mas também de insetos, animais e minerais [34]. Estes extratos são vantajosos pois não só vão tingir, mas também conferir propriedades antimicrobianas aos materiais têxteis. Como exemplos, temos o corante extraído da planta *Lawsonia inermis* pertencente à família *Lythraceae* que contém um pigmento vermelho-alaranjado e o extrato aquoso das folhas dessa mesma planta que manifestou capacidade de inibir o crescimento de bactérias gram-positivas e gram-negativas, assim como de microrganismos envolvidos em infeções provenientes de queimaduras [44].

Assim, a aplicação de materiais revestidos com extratos deste género em queimaduras pode ser vantajosa, embora de durabilidade reduzida, comparativamente com os pensos contendo AgNO₃, que provocam manchas e retardam o processo de cicatrização [44].

Outros corantes extraídos das plantas *Acácia catechu*, *Quercus infectoria*, ou de insetos como *Kerria lacca*, quando aplicados na fibras de lã por esgotamento demonstraram um amplo espectro de atividade, nomeadamente contra, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris* e *Bacillus subtilis* [45]. Por outro lado, um corante catiónico natural, designado berberina, foi também incorporado com sucesso na PA 6.6, o qual apresentou atividade antimicrobiana elevada contra o *Staphylococcus aureus* e a *Klebsiella pneumoniae* [29].

1.4.5 Aminoácidos

A cisteína (Cys) é um aminoácido que exibe um potente efeito antimicrobiano. Esse efeito deve-se à reatividade dos grupos -SH que permitem à Cys participar numa série de processos. Entre esses processos destacam-se as reações de oxidação-redução, as ligações a iões metálicos, as modificações pós-translacionais e a formação de ligações S-S e/ou S-C=O.

Assim, uma vez que os grupos -SH da Cys podem reagir com os grupos -SH das proteínas presentes na membrana microbiana, alterações na permeabilidade da membrana podem induzir a lise celular [46-48].

Quando aplicada na lã a Cys liga-se preferencialmente através dos grupo -NH₂ e/ou -COOH, verificando-se um aumento dos grupos -SH livres. No entanto, em solução a Cys pode formar agregados, estabelecendo ligações S-S entre as moléculas do aminoácido, o que diminui a disponibilidade dos grupos -SH para interagirem com as membranas bacterianas. Ainda assim, o efeito antimicrobiano da Cys, contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, mostrou ser duradouro e não tóxico para o ser humano [47].

Apesar da intensa investigação na utilização de agentes antimicrobianos naturais e sintéticos, para superar os riscos, as desvantagens e os efeitos colaterais associados ao uso dos agentes antimicrobianos anteriormente descritos, uma nova estratégia prevê o uso de AMPs como agentes bioativos para a potencial biofuncionalização de materiais têxteis e de materiais poliméricos, com potencial baixa toxicidade e inibidores de resistência bacteriana.

1.5 Péptidos antimicrobianos (AMPs)

Todos os organismos vivos, como bactérias, plantas, invertebrados e vertebrados, possuem sistemas que lhes permitem produzir substâncias protetoras contra microrganismos. Muitas destas substâncias são de natureza peptídica e são chamadas de péptidos

antimicrobianos (AMPs). Os AMPs produzidos por bactérias são denominados bacteriocinas e destroem ou inibem o crescimento de outros microrganismos. Os produzidos por insetos, plantas e mamíferos apresentam um importante papel na imunidade inata, constituindo a primeira barreira de defesa do organismo contra a entrada de substâncias estranhas, nomeadamente microrganismos potencialmente patogénicos [49-51].

Nos animais invertebrados, mais precisamente nos insetos, os AMPs são produzidos em células do corpo gordo, sintetizados nos hemócitos e armazenados em grânulos presentes no seu interior. Nos animais vertebrados, os AMPs são produzidos em locais que estão em constante contacto com microrganismos, nomeadamente em células epiteliais das mucosas do trato respiratório, gastrointestinal e genito-urinário e em células epiteliais da pele, proporcionando uma barreira física contra a entrada desses microrganismos. No entanto, estes AMPs podem também ser produzidos e armazenados em monócitos, neutrófilos, e mastócitos, células que constituem alguns dos mecanismos efetores não-oxidativos contra potenciais patogénicos. Ou seja, nos vertebrados, os genes que codificam os AMPs, são expressos em numerosos tecidos e em diferentes tipos de células [49].

Desta forma, os AMPs de animais podem ser produzidos constitutivamente ou induzidos em resposta ao ataque de agentes patogénicos. O mesmo é válido para os AMPs de plantas que fazem parte dos mecanismos de defesa das mesmas [49].

Os AMPs naturais são normalmente pequenos péptidos catiónicos, anfipáticos, que apresentam tamanhos, sequências e estruturas variáveis. Estes péptidos exibem um amplo espetro de atividade contra uma vasta gama de microrganismos, incluindo bactérias gram-positivas e gram-negativas, protozoários, leveduras, fungos e vírus envelopados, apresentando uma elevada atividade mesmo a baixas concentrações [51-54].

As características únicas como anfipacidade, hidrofobicidade e carga destes péptidos afetam a atividade antimicrobiana dos mesmos [55]. Normalmente, os AMPs em solução encontram-se desenrolados, enrolando-se na conformação anfipática aquando a interação com as membranas celulares [56]. Assim, a anfipacidade dos AMPs é essencial para o seu mecanismo de ação, porque a região polar carregada positivamente irá possibilitar a atração eletrostática inicial para os componentes carregados negativamente da membrana, e, em seguida, a região apolar dos péptidos irá permear a bicamada lipídica da membrana através de interações hidrofóbicas e de Van der Waals [55, 57]. Portanto, AMPs anfipáticos apresentam uma região formada por resíduos hidrofóbicos (insolúveis em água, porém solúveis em lípidos) e uma região composta, principalmente, por resíduos carregados (solúveis em meio aquoso).

Desta forma, a hidrofobicidade é fundamental pois possibilita aos AMPs inserirem-se no núcleo hidrofóbico da membrana. Enquanto a região carregada permite aos AMPs estabelecerem fortes interações eletrostáticas com os fosfolípidos carregados negativamente.

É esta a principal força motriz para o enrolamento dos péptidos na interface lípido-péptido [55, 57].

Os AMPs podem também adotar conformações e estruturas distintas, incluindo α -hélices anfipáticas, estruturas relaxadas e folhas- β antiparalelas. Os péptidos α -helicoidais anfipáticos são geralmente mais ativos que os péptidos com estruturas secundárias menos definidas. Por conseguinte os péptidos com duas folhas- β antiparalelas são também, frequentemente, muito ativos [55].

Mesmo possuindo uma grande variabilidade na estrutura e na natureza química, a maioria dos AMPs apresenta atividade antimicrobiana sobre as membranas das células-alvo e têm sido considerados uma potencial alternativa aos antibióticos convencionais, pois a sua ampla utilização tem levado os agentes patogénicos associados a patologias humanas, a adquirir resistências [58].

Assim, o desenvolvimento de novos antibióticos com base nos AMPs pode ser uma possível estratégia para resolver o problema da resistência das bactérias aos antibióticos convencionais [57, 58]. Esta possibilidade é considerada porque os AMPs não possuem alvos específicos o que torna a sua ação bastante inespecífica, visando, principalmente, a membrana dos agentes patogénicos carregada negativamente [54]. Desta forma, a resistência aos AMPs implicaria uma organização global de toda a membrana e disposição do agente patogénico rearranjar a membrana celular mantendo a sua viabilidade [57].

1.5.1 Classificação

Diferentes critérios têm sido propostos para a classificar os AMPs. Com esse objetivo, os AMPs podem ser classificados com base na sua origem em AMPs produzidos por organismos eucariotas e AMPs produzidos por organismos procariotas. Além desta classificação podem ser diferenciados em catiónicos e aniónicos de acordo com a carga líquida que apresentam.

Os AMPs catiónicos apresentam uma carga líquida positiva devido a um elevado número de aminoácidos catiónicos, tais como lisina, arginina e/ou histidina. Os AMPs aniónicos ricos em ácido aspártico e glutâmico apresentam uma carga líquida negativa [49, 51]. Contudo, muitas vezes é utilizado zinco (Zn^{2+}) como um cofactor nos AMPs aniónicos. Este catião permite a estes péptidos ultrapassar a carga negativa da superfície da membrana dos microrganismos, obtendo-se uma melhor atividade antimicrobiana [51, 57, 58].

No entanto, a diversidade dos AMPs é tão grande que é difícil agrupá-los numa única classificação. Assim, os AMPs além de poderem ser estruturados de acordo com a sua origem e características bioquímicas, têm sido frequentemente organizados com base nas suas características estruturais em quatro distintas subdivisões [50].

1) Péptidos catiónicos lineares com uma estrutura α -helicoidal: Estes péptidos sem resíduos de Cys assumem uma estrutura desordenada em solução aquosa, estruturando-se em α -hélice quando em contacto com a superfície da bicamada lipídica negativamente carregada. Exemplos de péptidos que adotam esta estrutura são as cecropinas de insetos e o LL-37 humano, figura 1.10 [58].

2) Péptidos catiónicos de estrutura aberta, ricos em resíduos de Cys com uma ou mais ligações dissulfureto (S-S): Estes AMPs contêm resíduos de Cys em posições específicas que lhes conferem estabilidade estrutural. Neste grupo de péptidos destacam-se as defensinas, nomeadamente as defensinas de mamíferos que apresentam uma estrutura antiparalela em folha- β estabilizada por três ligações S-S intramoleculares entre os resíduos de Cys, figura 1.10 [50, 58].

3) Péptidos catiónicos ricos em aminoácidos específicos: Neste ponto os péptidos exibem cadeias longas de estrutura estendida e são caracterizados pela presença de vários resíduos de um mesmo aminoácido, tais como prolina, glicina, histidina, arginina, fenilalanina e triptofano. Exemplos deste grupo de péptidos são histatinas humanas e indolicinas de gado, figura 1.10 [58].

4) Péptidos com estruturas cíclicas: Neste grupo encontramos, nomeadamente, os ciclopéptidos que formam um anel peptídico. Estes péptidos apresentam normalmente resíduos de Cys que desempenham um papel importante na manutenção da estrutura. Exemplos de péptidos que apresentam esta organização são as gramicidinas, figura 1.10 [51, 58].

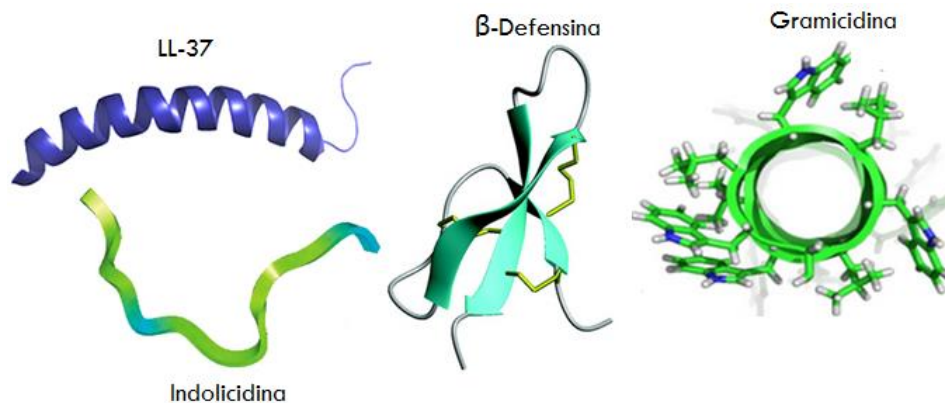


Figura 1.10- Diferentes estruturas dos AMPs. LL 37: Estrutura linear anfipática (adaptado de [59]); β -Defensina: Estrutura em folha- β estabilizada por ligações S-S (adaptado de [60]); Indolicidina: Péptido linear rico em triptofano (adaptado de [53]); Gramicidina: Péptido com estrutura esférica (adaptado de [61]).

1.5.2 Mecanismos de ação

Os AMPs carregados positivamente, na maioria dos casos, atuam destabilizando as membranas carregadas negativamente permeabilizando-as, o que resulta na perda do

conteúdo celular [50, 52]. Assim, os AMPs podem levar à ruptura da membrana e como resultado provocar a lise da célula. Alternativamente, podem interagir com a membrana e levar à formação de poros transitórios [52, 55].

As membranas plasmáticas de organismos procariontes e eucariontes diferem na sua composição [54]. As membranas das células procariontes possuem um elevado conteúdo de fosfolípidos carregados negativamente voltados para o meio extracelular, enquanto a mesma face da membrana plasmática nas células eucariontes é composta maioritariamente por fosfolípidos neutros, como fosfatidocolina (PC) e esfingomielina (SM), estando os fosfolípidos aniônicos, como fosfatidilserina (PS) e fosfatidilglicerol (FG), voltados para o interior da célula, figura 1.11 [49]. Consequentemente, os AMPs raramente são tóxicos para as células eucariontes, o que é devido ao elevado conteúdo de fosfolípidos neutros na membrana plasmática e à presença de colesterol nas membranas alvo. Assim, a presença de colesterol reduz a atividade dos AMPs, devido a uma maior estabilização da bicamada lipídica e/ou às interações entre o colesterol e o péptido [54, 57].

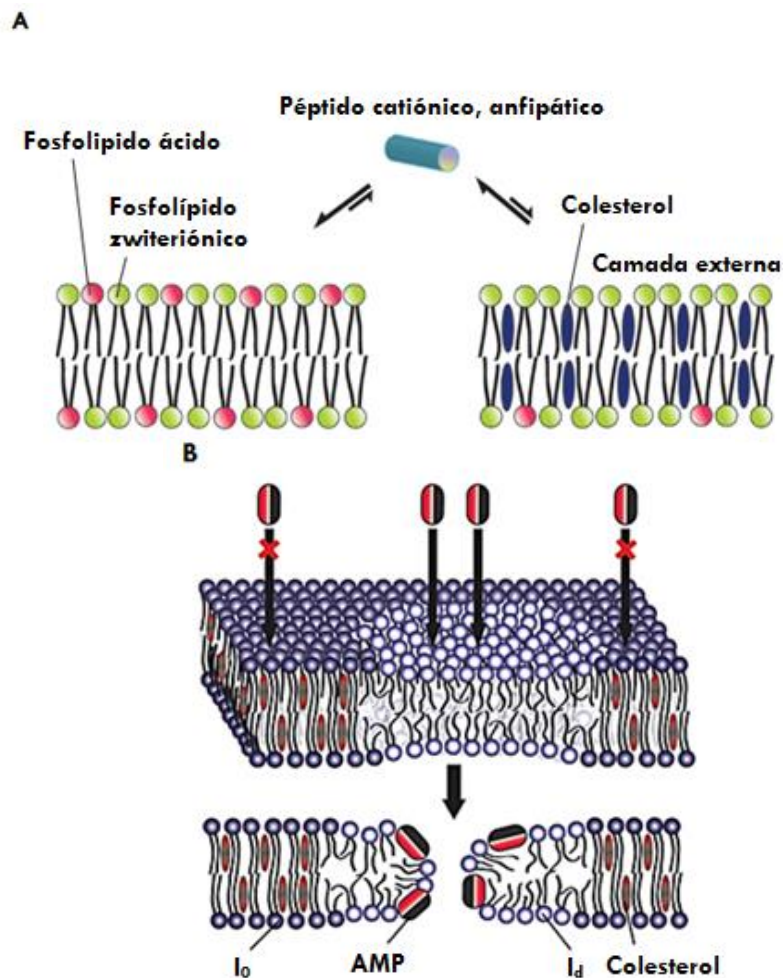


Figura 1.11 - Compreensão do comportamento dos AMPs nas membranas celulares. (A) Representação esquemática do papel do colesterol na seletividade dos AMPs. Encontrando-se à esquerda representada a bicamada fosfolípídica de uma célula procarionte e à direita de uma célula eucariota. (B) Representação do mecanismo de ação de um AMP em uma membrana contendo colesterol. É visível que a presença de colesterol dificulta a permeação da membrana pelo AMP, domínio I_0 . Enquanto, no domínio I_d onde não há colesterol a permeação da membrana por um AMP é conseguida facilmente. Assim, é visível que o colesterol aumenta a coesão e rigidez da membrana (adaptado de [54]).

Alguns modelos propõem que o mecanismo de ação dos AMPs surge de interações eletrostáticas com os fosfolípidos aniônicos da membrana plasmática (PS e FG) e com os grupos fosfato do lipopolissacarídeo (LPS) das bactérias gram-negativas. As bactérias gram-positivas não possuem LPS ou membrana exterior, mas em vez disso, têm uma camada mais espessa de peptidoglicano e os ácidos teicóico e teicurônico, que lhes conferem carga negativa [49, 51, 57]. A carga negativa, contribui para a interação inicial dos péptidos com as membranas e acredita-se que o aumento da força iônica reduz a atividade da maioria dos péptidos devido ao enfraquecimento das interações eletrostáticas.

Apesar disso, o modo preciso de ação dos AMPs ainda permanece desconhecido. A maioria dos ensaios descritos na literatura destaca a formação de poros na membrana bacteriana por quatro modelos: o modelo do tapete, o modelo do barril, o modelo do poro toroidal e mais recentemente o modelo do poro toroidal desordenado. No entanto, alguns AMPs podem atuar em alvos intracelulares, podendo o transporte dos péptidos para o interior da célula ser feito por transporte ativo. Neste caso os péptidos têm múltiplos alvos e podem de igual forma provocar a lise celular [52, 55, 62].

I. Mecanismos de morte por interferência com a membrana

Modelo do Tapete. Os monómeros de péptido, eletrostaticamente atraídos pelos grupos polares aniônicos das cabeças dos fosfolípidos, cobrem paralelamente a superfície da membrana de modo semelhante a um tapete. Quando as moléculas de péptidos saturam a superfície da membrana e uma dada concentração é atingida, o péptido direciona os resíduos hidrofóbicos para o interior da bicamada lipídica. Consequentemente ocorre uma reorganização dos lípidos, o que resulta numa tensão na curvatura da membrana e na formação de um poro transitente. A tensão aumenta à medida que a concentração de péptido na bicamada também e a desintegração da membrana acontece pelo rompimento da sua curvatura, figura 1.12 [49, 55, 58].

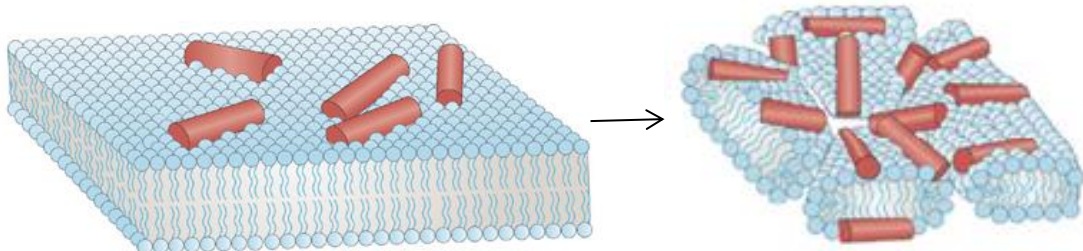


Figura 1.12- Possível mecanismo de ação que ocorre na membrana citoplasmática de bactérias: Modelo do Tapete (adaptado de [62]).

Modelo do barril. Os monómeros de péptido depositam-se paralelamente à superfície da bicamada lipídica, ligando-se preferencialmente às cabeças dos fosfolípidos. Numa

determinada concentração, agregam-se e inserem-se perpendicularmente na bicamada lipídica, formando um poro linear de péptido. Os monómeros de péptido inseridos mantêm as regiões hidrofóbicas em contacto com as regiões apolares da bicamada lipídica, enquanto as regiões hidrofílicas permanecem expostas, circundando o poro, figura 1.13 [49, 55, 58].

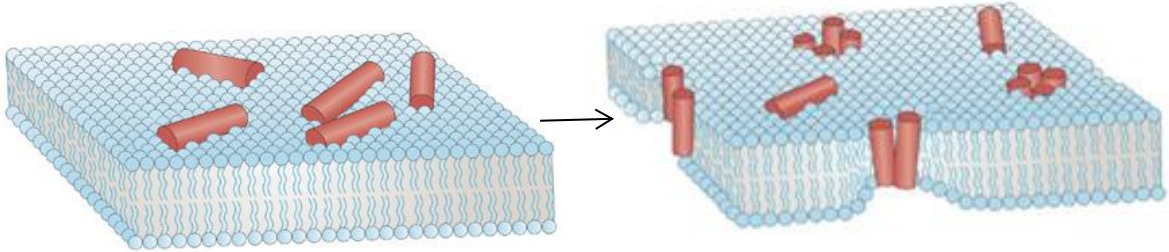


Figura 1.13- Possível mecanismo de ação que ocorre na membrana citoplasmática de bactérias: Modelo do Barril (adaptado de [62]).

Modelo do poro toroidal. Os monómeros de péptido orientados paralelamente na superfície da membrana ligam-se às cabeças polares dos fosfolípidos e, a uma determinada concentração, inserem-se perpendicularmente na bicamada lipídica. Ao se inserirem perpendicularmente na membrana, as monocamadas lipídicas dobrasem-se e um núcleo aquoso, revestido pelos monómeros de péptido inseridos e pelas cabeças dos fosfolípidos, é formado. Este modelo difere do modelo do barril, pois os monómeros de péptido permanecem ligados às cabeças dos fosfolípidos durante a reorganização da bicamada lipídica. Assim, forma-se o poro toroidal como resultado da curvatura provocada na membrana, figura 1.14 [49, 55, 58].

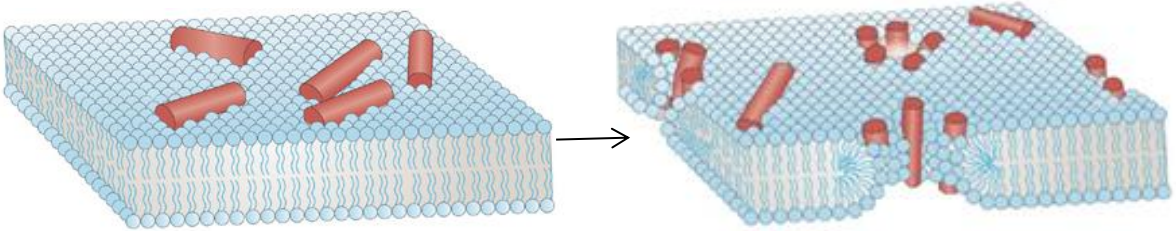


Figura 1.14- Possível mecanismo de ação que ocorre na membrana citoplasmática de bactérias: Modelo do poro toroidal (adaptado de [62]).

Modelo do poro toroidal desordenado. Os monómeros de péptido interagem na bicamada lipídica com os grupos da cabeça dos fosfolípidos e a uma determinada concentração inserem-se na bicamada lipídica. De seguida, aglomeram-se em agregados não estruturados, permitindo a formação de poros transitentes na membrana. O modelo do poro toroidal desordenado assemelha-se ao modelo do poro toroidal, no entanto, os monómeros de péptido não adotam uma orientação específica, figura 1.15 [62].

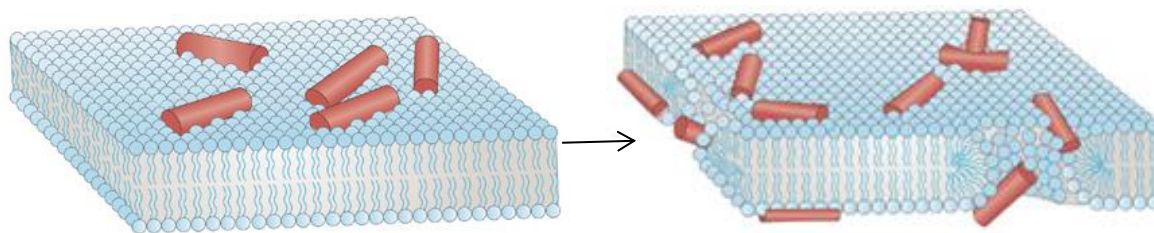


Figura 1.15- Possível mecanismo de ação que ocorre na membrana citoplasmática de bactérias: Modelo do poro toroidal desordenado (adaptado de [62]).

Contudo, foi também proposto um modelo unificador, o modelo de *Shai-Matsuzaki-Huang*. Neste modelo os péptidos ligam-se à superfície da membrana e deslocam os lípidos alterando, a estrutura da mesma. Por conseguinte, com o aumento da concentração de péptido na bicamada, aumenta a tensão superficial e a uma determinada concentração a bicamada acaba por se romper e permitir que os péptidos entrem no interior da célula alvo.

Este modelo é um modelo unificador pois integra os três modelos sugeridos acima: o modelo do tapete, o modelo do barril e o modelo do poro toroidal [63].

II. Mecanismos de morte intracelular

Além dos mecanismos de lise celular por interferência com a membrana, existe uma evidência crescente de que os AMPs podem ser transportados para o interior da célula e interagir com alvos intracelulares. Desta forma, os péptidos podem atravessar a membrana e desenvolver mecanismos especiais para se deslocarem para o citoplasma, penetrando-se e acumulando-se sem permeabilizar a membrana. Uma vez no citoplasma, os péptidos interferem em várias vias metabólicas, como na formação do septo na membrana plasmática. Inibem a biossíntese da parede celular, a síntese de ácidos nucleicos e a síntese de proteínas. Além disso, podem ligar-se ao DNA e a proteínas, inibir a atividade enzimática e ativar autolisinas e fosfolipases, figura 1.16 [49, 52, 55, 58].

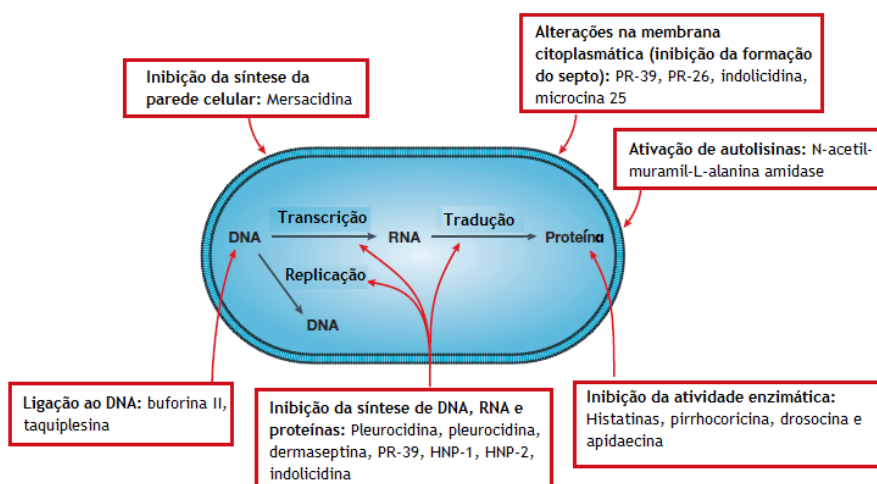


Figura 1.16- Mecanismos de ação intracelulares dos AMPs. Na imagem estão assinalados os principais alvos (adaptado de [55]).

A ligação ao DNA e a inibição da síntese de ácidos nucleicos pelos AMPs é viável devido à carga negativa do esqueleto polianiónico dos ácidos nucleicos [58]. A inibição da atividade enzimática pode ser adquirida por inibição, por exemplo, da atividade de ATPase da chaperonina molecular DnaK. Uma enzima envolvida no fold de proteínas [58]. E a inibição da síntese de peptidoglicano é conseguida porque os AMPs podem atuar na formação de componentes estruturais da parede celular, especificamente na transglicosilação do lípido II [57, 58]. Além disso podem ser induzidas hidrolases que degradam a parede celular [58].

1.6 Produção de AMPs

Os AMPs podem ser isolados diretamente das mais variadas fontes naturais. No entanto, as suas baixas concentrações nos organismos e o facto do processo de isolamento ser demorado e dispendioso, faz com que a extração direta não seja considerada um bom método para produzir AMPs [64].

Nos últimos anos, uma grande variedade de AMPs sintéticos tem surgido. O interesse na utilização destes péptidos visa criar péptidos com características desejáveis, melhorar a seletividade para células microbianas e gerar maior resistência à degradação proteolítica.

Assim, uma alternativa ao isolamento dos péptidos diretamente das suas fontes naturais é a obtenção por síntese química. A síntese química dos péptidos pode ser realizada utilizando duas metodologias diferentes: em solução (síntese clássica) ou na presença de um suporte polimérico (síntese de péptidos em fase sólida; SPFS), permitindo a produção de AMPs naturais e sintéticos [64, 65].

A síntese clássica de péptidos é conseguida utilizando compostos químicos que promovem a formação das ligações peptídicas entre os resíduos de aminoácidos. No entanto, o péptido formado por este processo fica dissolvido nos reagentes utilizados, sendo a etapa de purificação trabalhosa e demorada [65].

Na SPFS, são utilizados polímeros insolúveis, inertes às condições reacionais. Este processo consiste na ligação sequencial dos aminoácidos ao polímero, devendo o primeiro aminoácido da sequência ser capaz de se ligar eficazmente ao suporte polimérico. No final da síntese o polímero é facilmente clivado e separado dos reagentes, sendo obtido o péptido praticamente puro e livre de contaminantes. Além disso, o solvente, os reagentes e quaisquer outros compostos que não permaneçam ligados ao polímero são também eliminados com facilidade por lavagem e filtração. Assim, a vantagem da utilização de polímeros insolúveis reside no final do processo de síntese aquando a purificação [65].

No entanto, a despesa inerente a estes processos de síntese limita a produção dos péptidos, mesmo para aplicações em pequenas quantidades, como é o caso dos ensaios

laboratoriais. Uma das alternativas possíveis é a produção recombinante, que é um método mais eficaz, tendo em consideração o tempo e o custo. Neste caso, os péptidos são expressos heterologicamente em microrganismos resistentes ao AMP a ser produzido, sendo neste caso a escolha do sistema de expressão tida como fundamental. A maioria dos péptidos tem sido produzida usando *Escherichia coli*, pois possui níveis elevados de expressão das proteínas recombinantes, crescimento celular rápido e necessita de um meio de cultura simples [51, 52, 64].

No âmbito da síntese de péptidos outros estudos, com o contributo de ferramentas computacionais, têm sido realizados. Frequentemente têm sido alterados aminoácidos nos péptidos para identificar as posições e os resíduos fundamentais para a atividade. O uso de péptidos mais curtos tem também sido citado pois é vantajoso em termos de produção, custos e tempo de síntese [58].

Por outro lado, alterações sistemáticas das propriedades dos péptidos têm também sido referidas. Com essa finalidade modificações na sequência, na carga, na hidrofobicidade, na anfipacidade e na estrutura conformacional têm sido efetuadas. Estas alterações visam dar informações valiosas sobre a contribuição de cada propriedade para a atividade biológica do péptido [51, 56, 57].

Foram ainda desenvolvidos péptidos chamados quiméricos ou híbridos, formados pela união de partes de péptidos diferentes, com o objetivo de combinar em uma só molécula, as características desejadas, presentes em mais de um péptido. A maioria dos péptidos híbridos pretende aumentar a atividade antimicrobiana, reduzir o espectro de atividade antimicrobiana e reduzir a citotoxicidade para células hospedeiras. Estes péptidos têm sido construídos por síntese química direta do péptido híbrido desejado, ou produzidos como uma proteína de fusão num sistema recombinante apropriado [51].

1.7 AMPs utilizados no presente estudo

Os AMPs destacam-se como agentes promissores devido a algumas características que eles apresentam, como o seu tamanho geralmente pequeno, o seu amplo espectro de ação e a sua baixa toxicidade. No ponto seguinte serão descritos de forma mais detalhada os AMPs utilizados neste trabalho. No entanto, é de referir que, além do seu potencial, os AMPs podem apresentar algumas desvantagens, que apesar de poderem ser ultrapassadas devem ser referidas. Entre essas desvantagens destacam-se o elevado custo que poderá estar envolvido no processo de síntese e produção dos AMPs e o facto de os AMPs poderem ser suscetíveis à proteólise, podendo originar resistências [51, 52, 58, 64].

1.7.1 Cecropina-B

A cecropina-B é um AMP catiónico natural que é encontrado na pupa *Hyalophora cecropia*. À semelhança dos AMPs de insetos a cecropina-B desempenha um papel importante na defesa humoral, sendo em caso de infecção, sintetizada no corpo gordo e, posteriormente, secretada na hemolinfa.

A cecropina-B é um péptido linear com uma estrutura α -helicoidal e não possuiu resíduos de Cys. É um pequeno AMP com apenas 35-39 resíduos de aminoácidos [52].

A atividade antimicrobiana da cecropina-B está estritamente relacionada com a capacidade de formar α -hélices anfipáticas. Assim, quando em contacto com a superfície da bicamada lipídica das células, carregada negativamente, a região polar da cecropina-B, carregada positivamente, rica em resíduos de lisina, facilita a atração eletrostática inicial para os fosfolípidos, carregados negativamente, das células alvo. Desta forma, a cecropina-B irá provocar modificações na estrutura da membrana conduzindo à rutura e libertação do conteúdo celular [52, 66].

A cecropina-B é, assim, um AMP essencial para a resposta imune inata, sendo eficaz na eliminação de patogénicos. Além disso, pode também promover a regeneração de feridas e apresenta um amplo espetro de atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, fungos, parasitas e vírus [52, 66].

1.7.2 [Ala5]-Tritrp7

O [Ala5]-Tritrp7 é um péptido análogo sintético da Tritrpticina que pertence à família das catelicidinas (CAMPs). Este péptido catiónico pequeno resulta da substituição da primeira prolina (Pro), situada na posição cinco da Tritrpticina, por um resíduo de alanina (Ala) (tritrp7). Esta substituição foi estudada para investigar o papel desempenhado por estes resíduos, em específico, nas propriedades estruturais e atividade biológica do péptido nativo [67].

Esta substituição resultou num péptido com maior tendência a adotar uma conformação helicoidal anfipática. Esta conformação facilita a interação do péptido com as membranas microbianas, pois os resíduos polares encontram-se organizados no lado da hélice oposto aos resíduos apolares. Existe, assim, uma melhor organização, permitindo ao péptido ser eletrostaticamente atraído para as membranas bacterianas carregadas negativamente, o que consequentemente melhora a atividade antimicrobiana [67].

O [Ala5]-Tritrp7 é assim um AMP sintético promissor devido às notórias melhorias provocadas na atividade antimicrobiana, pela substituição específica na sequência de

aminoácidos da Trypticina. Além disso, exibe atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas [67].

1.7.3 Cys-LC-LL-37

Os AMPs da família das catelicidinas (CAMPs) são os principais componentes da imunidade inata e atuam diretamente contra infecções microbianas. A família das CAMPs é altamente heterogênea e abrange uma vasta gama de péptidos que variam em comprimento e que apresentam sequências com pouca similaridade e uma marcada diversidade estrutural [68].

As CAMP são caracterizadas por apresentarem uma pró região N-terminal dotada de nenhuma atividade biológica e um C-terminal de grande heterogeneidade que codifica o péptido maduro. Desta forma, as CAMPs são sintetizadas como precursores com um pró-domínio N-terminal grande (94-114 aminoácido) e altamente conservado, conhecido como domínio *Cathelin* ou CLD. Durante o processo de ativação, uma enzima específica remove esse domínio (CLD) e liberta o AMP do C-terminal para exibir a sua função de CAMP [68].

No entanto, apesar dos mamíferos possuírem uma grande diversidade de CAMPs, nos humanos é apenas encontrada uma. A CAMP humana é armazenada como uma pró-forma de 16 KDa, ou seja, como uma pró-catelicidina, nos grânulos secundários dos neutrófilos. A pró-catelicidina é também conhecida como CAP18 humana (hCAP18) e consiste de um CLD N-terminal (hCLD) de 103 resíduos de aminoácidos e de um péptido catelicidina C-terminal, LL-37, de 37 resíduos. Assim, após estimulação, a pró-catelicidina é transformada pela proteinase 3, uma serina-protease proveniente de grânulos azurófilos, em hCLD e no AMP funcional LL-37 [68].

De facto, o LL-37 é um péptido especial, pois apesar de ser sintetizado em humanos e de ser principalmente expresso nos neutrófilos, pode também encontrar-se em outros locais diferentes. Nomeadamente em células sanguíneas, incluindo monócitos e linfócitos, em determinadas células epiteliais escamosas das vias respiratórias, no intestino, vagina, epidídimo, testículo e ainda em queratinócitos em doenças inflamatórias da pele [68].

O LL-37 foi, inicialmente, reconhecido pelo seu amplo espectro de atividade antimicrobiana contra bactérias, fungos e patogénicos virais e por exibir uma estrutura α -helicoidal anfipática após ligação à membrana alvo. A organização do péptido nessa estrutura promove a incorporação e a alteração da membrana celular e leva, conseqüentemente, à libertação do conteúdo celular e à morte da célula [68].

Porém, outras funções biologicamente importantes do péptido humano LL-37 foram posteriormente descobertas. Essas funções adicionais incluem propriedades

imunomoduladoras e quimioestáticas, a estimulação da angiogénese e atividades neutralizantes do LPS.

Desta forma, o amplo espectro de atividade do LL-37, aliado ao facto deste péptido adotar uma estrutura em α -hélices anfipática que facilita a interação com os fosfolípidos aniónicos das células bacterianas alvo, levou a que um péptido sintético fosse desenvolvido com o intuito de aliar o seu importante papel antimicrobiano ao também conhecido efeito antimicrobiano da Cys. Assim, o AMP Cys-LC-LL-37 resultou da adição do resíduo de Cys ao péptido natural LL-37. Esta adição foi conseguida através da utilização de um ligante de seis carbonos (LC) [47, 68, 69].

Assim, a modificação da extremidade de um terminal do péptido LL-37, por adição da Cys, que possui na cadeia lateral grupos -SH livres com capacidade de reagir com os grupos -SH das proteínas presentes na membrana microbiana, teve como intuito melhorar a eficácia antimicrobiana [46].

De facto, este péptido desempenha um papel importante no aumento da atividade antimicrobiana, pois tem a vantagem acrescida de reunir o péptido natural LL-37 e a Cys, cujo efeito antimicrobiano já foi anteriormente comprovado.

Capítulo 2

Objetivos

O principal objetivo deste trabalho consistiu em investigar o potencial de compostos naturais a serem usados como agentes eficazes no tratamento antimicrobiano de materiais têxteis. Estes agentes visam satisfazer a permanente necessidade de se obterem soluções ecológicas e não tóxicas. Para isso irá recorrer-se à utilização de substâncias de natureza peptídica, AMPs, que são defesas naturais de todos os organismos vivos.

A incorporação dos AMPs em materiais têxteis irá permitir avaliar o seu potencial enquanto substâncias eficazes, duráveis e não tóxicas e, principalmente, com reduzida probabilidade de aquisição de resistência por parte das bactérias.

Nesta nova estratégia irão ser utilizados processos biotecnológicos de aplicação simples e rápida, com objetivo de obter uma ação antimicrobiana duradoura, segura e com um amplo espectro de aplicação.

Os objetivos específicos são por conseguinte:

- Avaliar a eficácia da biofuncionalização através da capacidade dos AMPs selecionados se ligarem aos materiais têxteis através de interações iónicas;

- Detetar se os AMPs induzem modificações e danos na superfície das fibras;

- Avaliar o efeito antimicrobiano das amostras têxteis funcionalizadas com os AMPs;

- Avaliar o efeito citotóxico dos AMPs incorporados nos materiais têxteis, de forma a garantir o desenvolvimento eficaz e seguro de um novo método/material antibacteriano.

Capítulo 3

Materiais e Métodos

Os materiais usados no decurso deste trabalho estão descritos na tabela 3.1.

Tabela 3.1- Reagentes e equipamentos de uso corrente em laboratório usados no decorrer do trabalho.

Reagente	Marca	Equipamento	Marca e Modelo
Ácido clorídrico (HCl)	Riedel-deHaen	Aparelho de tingir	Datacolor AHIBA IR
[Ala5]-Tritrp7	AnaSpec	Autoclave	Advantage Lab AL02-03-100
Ácido fosfórico	BDH	Balança analítica	Kern 770
Albumina Sérica Bovina (BSA)	Sigma-Aldrich	Balança analítica	Sartorius CP225D
Cecropina-B	AnaSpec	Câmara de fluxo laminar	Bioair, TopSafe 2.2
Cloreto de sódio (NaCl)	Sigma-Aldrich	Densiómetro (medidor McFarland)	Grant bio DEN-1
Coomassie Brilliant Blue G-250	Sigma-Aldrich	Difracómetro de raio-x	Rigaku DMAX III/C
Cys-LC-LL-37	Eurogenetec	Espetrofotómetro	Datacolor Spectraflash SF300
Detergente ECE	Bayer	Espetrofotómetro	UNICAM 300
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Sigma-Aldrich	Espetrofotómetro FTIR	Thermo-Nicolet is10
Etanol (C ₂ H ₆ O)	Panreac	Estufa	UNICAM 300
Glicil-Glicina	Sigma-Aldrich	Incubador com agitador orbital	Aralab Agitorb 200
Hidróxido de Sódio (NaOH)	Panreac	Leitor de microplacas	Biochrom Anthos 2020
MTT	Sigma-Aldrich	Medidor de pH	Mettler Toledo Seven easy
Mueller Hinton Broth (MHB)	LiofilChem	Placa de agitação	Labinco LD-40
Nutrient Agar (NA)	Cultimed	Vórtex	Heidolph Reax top
Nutrient Broth (NB)	Cultimed		
Soro Fetal Bovino (FBS)	Biochrom		
Tampão fosfato salino (PBS)	Sigma-Aldrich		
Tween-80	Sigma-Aldrich		

3.1 Materiais têxteis

Fibra de lã. O substrato têxtil utilizado neste estudo foi um tecido 100% lã. A lã foi lavada em um banho alcalino a pH=8.5 (2g/l Na₂CO₃) durante 30min, a 60°C, com um detergente não iônico Nekanil 907 (0.3g/l), que possui um bom poder molhante. Após lavagem prévia, a lã foi enxaguada com água destilada e posta a secar à temperatura ambiente. O processo de lavagem é recomendado para eliminar possíveis resíduos de produtos químicos utilizados no acabamento da lã, de forma a evitar falsos positivos relativamente à atividade antimicrobiana. Além disso a lavagem também permite eliminar alguma gordura que possa estar ainda presente na própria fibra e desta forma melhorar a sua hidroflicidade/capacidade de molhagem.

Malha de poliamida 6.6. Neste estudo foi utilizada uma malha de poliamida 6.6 (PA 6.6). A malha de PA 6.6 foi lavada usando um detergente padrão ECE (1g/l) durante 30min a 60°-70°C. Após lavagem prévia, a PA 6.6 foi enxaguada em água destilada e posta a secar à temperatura ambiente. O processo de lavagem teve como objetivo remover quaisquer resíduos de produtos químicos utilizados no acabamento da PA 6.6 e quaisquer manchas existentes no material.

3.2 AMPs

A sequência dos AMPs utilizados é mostrada na tabela 3.2. Os lotes contendo o pó liofilizado de cecropina-B, de [Ala5]-Tritrp7 e de Cys-LC-LL-37 foram armazenados a -20°C. A quando a preparação da solução de péptido o conteúdo presente nos lotes (1mg) foi dissolvido em 1ml de água estéril e uma solução de péptido de 10µg/ml foi preparada. Soluções tampão foram evitadas por interferirem com a atividade dos AMPs.

Tabela 3.2- Sequência de aminoácidos da cecropina-B, [Ala5]-Tritrp7 e Cys-LC-LL-37.

AMPs	Local de produção	Sequência de aminoácidos
Cecropina-B	<i>Hyalophora cecropia</i>	KWKVFKKIEKMGRNIRNGIVKAGPAIAVLGEAKAL-NH ₂
[Ala5]-Tritrp7	Sintético	VRRFAWWPFLRR-NH ₂
Cys-LC-LL-37	Sintético	Cys-LC-LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES-OH

3.3 Determinação da concentração mínima inibitória (MIC)

Por definição o MIC é a menor concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um microrganismo em testes de sensibilidade. Este valor pode ser determinado por diluição em agar ou caldo. Para este trabalho, os valores do MIC foram determinados por um teste de microdiluição em caldo, em placas de 96 poços, de acordo com a norma M07-A6 da CLSI para as estirpes bacterianas *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352) e a sua determinação permitiu-nos estimar a quantidade de péptido a ser utilizada na biofuncionalização dos materiais têxteis.

Inicialmente preparou-se o inóculo através de uma suspensão direta, em água estéril, de colónias selecionadas de uma placa de Nutrient Agar (NA) com 18-24h. Passadas 24h a suspensão bacteriana foi ajustada até atingir uma turbidez correspondente a $1-2 \times 10^8$ CFU/ml, que equivale a 0,5 na escala de McFarland e a partir da suspensão diluída preparou-se a suspensão de trabalho. Para isso 500µl da suspensão bacteriana foram adicionados a 4500µl de meio Mueller Hinton Broth (MHB).

Após preparação da suspensão bacteriana de trabalho, uma solução de péptido de concentração inicial de 10µg/ml foi utilizada como ponto de partida para a realização das sucessivas diluições volumétricas.

A cada poço da placa de microdiluição foi adicionado 50µl de suspensão de trabalho e 50µl de solução de péptido, nas diferentes diluições. Além disso, controlos foram também preparados. Ou seja, aos poços referentes ao controlo positivo foi adicionado apenas suspensão bacteriana, enquanto aos poços referentes ao controlo negativo foi adicionado péptido mais caldo Mueller Hinton. Além do controlo positivo e negativo foi também preparado o controlo do meio contendo apenas caldo Mueller Hinton. Assim, inoculada a placa de microdiluição foi incubada a 37°C durante 24h.

Terminado o período de incubação, avaliou-se o crescimento microbiano, visível através da turbidez da cultura, comparando a quantidade de crescimento nos poços contendo o agente antimicrobiano com os poços do controlo positivo (sem agente antimicrobiano) e todas as determinações foram feitas em triplicado. O MIC corresponderá à concentração mínima de agente antimicrobiano para a qual já não se deteta a olho nu crescimento do microrganismo.

3.4 Processos de biofuncionalização

3.4.1 Processo de biofuncionalização da lã

A incorporação dos AMPs na lã foi executada pelo método de esgotamento (*exhaustion method*). O método consiste na imersão do material têxtil num determinado banho de

incubação, durante o tempo e temperatura necessários para se efetuar o denominado “esgotamento” do banho. Nesta etapa, procedeu-se à incubação das amostras têxteis fazendo variar o tempo de biofuncionalização. A variação deste parâmetro teve como finalidade avaliar a sua influência na absorção do péptido pela lã, uma vez que pode influenciar a difusão e fixação dos AMPs nos locais reativos das fibras.

O processo de biofuncionalização foi realizado numa máquina de tingimento laboratorial, Datacolor AHIBA IR, com um gradiente de temperatura de 2°C. Neste período, as amostras foram mergulhadas numa solução de incubação contendo 3ml de solução de péptido (10µg/ml) e colocadas em tubos próprios para o equipamento, devidamente identificados. Após colocação dos tubos no equipamento programou-se a incubação para um período de tempo de 1h, 2h e 3h, a uma temperatura de 40°C, com uma agitação constante de 15rpm. No final da incubação, todas as amostras foram lavadas num detergente ECE (1g/l), em cinco ciclos de lavagem a 40°C durante 60min, um método adaptado da norma internacional *ISO 105-C06:2010*. De seguida as amostras foram colocadas a secar a 37°C durante aproximadamente 4h.

O procedimento de lavagem foi realizado nas amostras tratadas com os AMPs antes da realização dos ensaios antimicrobianos a fim provar um efeito de biofuncionalização durável. Além disso, a concentração de péptido utilizada (10µg/ml) encontra-se acima dos valores de MIC obtidos, para cada estirpe bacteriana, e foi escolhida de forma a assegurar o efeito antimicrobiano.

3.4.2 Processo de biofuncionalização da PA 6.6

O processo de biofuncionalização da PA 6.6 foi análogo ao descrito em 3.4.1 para a lã, tendo sido, igualmente, programada a incubação para um período de tempo de 1h, 2h e 3h, com uma agitação constante de 15rpm.

A temperatura de incubação foi o único parâmetro alterado uma vez que foi utilizada uma temperatura de 45°C durante o processo. Embora a funcionalização destas fibras seja mais eficaz a temperaturas mais elevadas (80-100°C), a baixa temperatura utilizada teve como objetivo evitar a desnaturação dos AMPs.

3.5 Avaliação da eficácia da biofuncionalização

3.5.1 Teste do reagente de Bradford

A presença do péptido nas amostras funcionalizadas foi determinada utilizando o teste colorimétrico do reagente de Bradford, para deteção dos grupos -NH₂. O método colorimétrico do reagente de Bradford permite determinar a concentração de proteína em solução e consiste na formação de um complexo estável entre o corante, Coomassie brilliant

blue G, e as proteínas em solução. A ligação do corante à proteína desvia o máximo de absorção de 465nm (vermelho) para 595nm (azul) e desta forma o complexo proteína-corante pode ser medido espectrofotometricamente a 595nm [70].

O reagente de Bradford não requer diluição e na preparação do reagente de proteína 100mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 foram dissolvidas em 50ml de etanol 95% e, em seguida, foram adicionados 100ml de ácido fosfórico 85% (w/v). A solução resultante foi diluída com água destilada para 1000ml e antes de ser utilizada foi filtrada em papel de filtro, acondicionada num frasco protegido contra a luz e mantida à temperatura ambiente.

O teste utilizado neste trabalho foi o micro ensaio de Bradford, que difere do ensaio padrão na gama de concentrações utilizada para a preparação das soluções padrão (1-10µg de proteína total em 1ml). A concentração de péptido em solução foi determinada através de uma curva de calibração utilizando como proteína padrão a albumina sérica bovina (BSA). Na preparação dos padrões de BSA concentrações apropriadas foram selecionadas (0, 2,5, 5, 7,5, 10 µg/ml).

Para a análise, a cada tubo contendo 1ml de amostra foi adicionado 1ml de solução de corante. Após agitação e incubação durante 5min à temperatura ambiente a absorvância foi lida num espectrofotómetro UNICAM 300 a 595nm. Como resultado, estimou-se a percentagem de esgotamento (%E) através da diferença da quantidade de péptido em solução antes e após biofuncionalização.

Além disso, a absorção do péptido foi também medida através das mudanças de cor diretamente sobre as amostras têxteis. Ou seja, o teste de coloração para determinação de proteínas nas fibras têxteis resultou de uma adaptação do teste do reagente de Bradford em solução [70]. No processo de coloração as amostras tratadas e respetivos controlos foram mergulhados em 10ml de solução de reagente Coomassie Brilliant Blue G-250 à temperatura ambiente, durante 15min, sobre agitação, para a lã. No caso da PA 6.6, as amostras foram apenas mergulhadas durante 5min sobre agitação. De seguida, as amostras foram lavadas com água destilada para remoção do reagente não ligado à fibra. A medição da cor das amostras foi realizada através de leituras espectrofotométricas no espectrofotómetro Spectraflash SF300 da Datacolor. O equipamento mede a reflectância (R) da amostra a todos os comprimentos de onda da zona do visível e a reflectância pode ser relacionada com a concentração pela equação Kubelka-Munk (3):

$$\frac{K}{S} = \frac{(1-R)^2}{2R} \quad (3)$$

Em que R representa a reflectância e o K e o S o coeficiente de absorção e difusão do meio, respetivamente, pois $K/S = \alpha C$, sendo C a concentração de corante na fibra e α uma constante (Shah e Gandhi, 1990; Völz, 1995).

3.5.2 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR-ATR)

A caracterização da composição química das amostras foi realizada por espectroscopia de infravermelho por transformadas de Fourier (FTIR-ATR). Neste trabalho os espectros de FTIR das amostras de lã antes e após a biofuncionalização com os AMPs foram obtidos com uma resolução de 4cm^{-1} e 32 scans num espectrofotómetro FTIR Thermo-Nicolet is10.

3.6 Avaliação da qualidade do material funcionalizado

3.6.1 Difração de raio-x (DRX)

Para verificar se a biofuncionalização provocou alterações nas características estruturais das fibras, realizou-se uma análise por DRX. Neste trabalho o difractómetro de raio-x utilizado foi o Rigaku modelo DMAX III/C com radiação $K\alpha$ de uma ampola de cobre ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$) operando a 40kV e 30mA. Os difractogramas foram registados a valores de 2θ entre 0 e 50°C . A estrutura cristalina das fibras foi avaliada por comparação dos difractogramas das amostras funcionalizadas com os difractogramas dos respetivos controlos.

3.6.2 Microscopia eletrónica de varrimento (SEM)

As amostras funcionalizadas com os AMPs foram analisadas por microscopia eletrónica de varrimento (SEM) de forma a se avaliar possíveis alterações e danos na morfologia da superfície do material têxtil, após o processo de biofuncionalização. As amostras foram analisadas em um microscópio eletrónico de varrimento HITACHI S2700, operando a 20kV e antes da observação foram revestidas com ouro.

3.7 Avaliação da atividade antimicrobiana

A avaliação do efeito antimicrobiano foi realizada com base na norma japonesa *Industrial Standard JIS L 1902:2002*. Esta norma especifica o método de teste para avaliar a atividade e a eficácia antibacteriana das amostras têxteis funcionalizadas. Este método baseia-se geralmente em dois processos de avaliação, no teste de difusão em agar (qualitativo) e no teste de suspensão (quantitativo), ambos com aplicação sobre *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 11296), estirpes bacterianas selecionadas para este trabalho.

a) Teste de difusão em Agar. O teste de difusão em agar é apenas qualitativo. Neste teste as amostras têxteis com as medidas referenciadas na norma contactam diretamente com uma suspensão de células absorvida em NA.

Na realização do ensaio foi inicialmente preparada em meio Nutrient Broth (NB) uma suspensão direta de colónias selecionadas de uma placa de NA com 18-24h. Essa suspensão foi incubada à temperatura de 37°C e de seguida, procedeu-se à preparação das amostras para o teste em forma de quadrado até 2,8x2,6cm de diâmetro.

Após 18-24h de incubação a suspensão bacteriana foi ajustada para uma concentração final de 1×10^6 - 1×10^7 CFU/ml e de seguida as placas de petri foram preparadas adicionando-se 1ml da suspensão de trabalho e 15ml de NA ainda quente, de forma a efetua-se o espalhamento. Preparadas as placas foram deixadas em repouso durante 30min a 3h para que o agar solidificasse. Quando secas com a ajuda de uma pinça estéril, colocou-se no centro as amostras têxteis funcionalizadas e o respetivo controlo de forma a assegurarem um contacto íntimo com o meio. Por fim, as placas foram incubadas a 37°C, durante 18-24h.

Estando o antimicrobiano incorporado no têxtil este poderá ou não possuir efeito antimicrobiano, assim, para avaliar a atividade antimicrobiana se o agente antimicrobiano se difundir no agar, uma zona de inibição tornar-se-á aparente, halo de inibição, e o seu tamanho fornecerá uma indicação da área sem crescimento detetável. Portanto, após incubação se for visível a formação de uma zona de inibição na área à volta da amostra têxtil funcionalizada o diâmetro de inibição pode ser quantificado a partir da seguinte fórmula:

$$W = \frac{T-D}{2} \quad (4)$$

Onde W é o diâmetro do halo de inibição, T o diâmetro total da amostra e zona de inibição em mm, e D a largura da amostra em mm. É de salientar, no entanto, que não é obrigatória a existência de halo para descrever a atividade antibacteriana de um têxtil, pois pode-se verificar inibição de crescimento bacteriano na zona de contacto com a amostra têxtil.

b) Teste de suspensão. O teste de suspensão, ao contrário do de difusão em agar, fornece valores quantitativos. Neste teste avalia-se a eficácia antimicrobiana pela redução da população microbiana através da contagem do número de microrganismos.

Na realização do ensaio começou por se preparar as amostras teste de acordo com o descrito na norma, em forma de quadrado com 0,4g. O ensaio foi realizado em duplicado para as duas estirpes bacterianas selecionadas: *Staphylococcus aureus* (gram-positiva) e *Klebsiella pneumoniae* (gram-negativa) e para as 0 e 24h. Assim, para o ensaio foram utilizadas 8 amostras funcionalizadas e 8 controlos, respetivamente. Do total de amostras, 4 foram utilizadas para medir o número de bactérias vivas logo após inoculação (T_{0h}) e outras 4 foram utilizadas para medir o número de bactérias vivas após incubação, ou seja, 18h-24h após inoculação (T_{24h}).

Estando as amostras organizadas, preparou-se uma cultura bacteriana em suspensão. Com esse propósito suspendeu-se em 20ml de meio NB um pouco de cultura bacteriana de uma placa de NA com 18-24h e incubou-se num agitador orbital a 37°C por 18-24h a uma agitação constante de 110rpm. Concluído o tempo de incubação a concentração bacteriana do inóculo foi ajustada para $1-2 \times 10^8$ CFU/ml em meio NB, que equivale a 0,5 na escala de McFarland. De seguida fizeram-se sucessivas diluições com o meio NB para ajustar a concentração bacteriana a $1 \pm 0,3 \times 10^5$ CFU/ml.

Preparado o inóculo, foi adicionado aos tubos de Falcon de 50ml a amostra têxtil e em diferentes partes da amostra 200µl da suspensão de trabalho bacteriana foram inoculados. Os tubos referentes às T_{24h} foram incubados por 18-24h a 37°C, enquanto os referentes às T_{0h} foram agitados durante aproximadamente 1min no vortex após adição de 20ml de solução salina 8,5g/l com 2ml/l de surfatante, Tween-80. Depois de agitar no vortex os tubos T_{0h} , 100µl foram retirados e pipetados nos eppendorfs referentes à diluição 10^0 . Desses eppendorfs (diluição 10^0) 50µl foram pipetados e adicionados a 450µl de 8,5g/l NaCl contidos nos eppendorfs referentes à diluição 10^1 , ou seja, por diluições sucessivas utilizando o conteúdo dos eppendorfs referentes às diluições 10^1 , 10^2 , 10^3 , prepararam-se as sucessivas diluições homogeneizando sempre com a pipeta o conteúdo colocado nos eppendorfs. Em seguida, duas gotas de 10µl por cada diluição foram pipetadas nas respetivas placas de petri. As placas foram deixadas a secar em repouso e de seguida incubaram-se a 37°C durante 24h.

Após as 24h procedeu-se ao cálculo do número de CFU/ml, para isso contou-se o número de colónias presentes nas placas (5) e calcularam-se as respetivas médias. Posteriormente realizaram-se os cálculos referentes à percentagem de redução (5).

Por fim, o procedimento efetuado para os tubos referentes às T_{0h} foi repetido para os tubos T_{24h} , deixados a incubar 18-24h.

Assim, a atividade antimicrobiana expressa em percentagem de redução é calculada pela seguinte fórmula (6), comparando o tamanho da população controlo, C, com o tamanho da população relativa às amostras funcionalizadas, A [41].

$$\frac{\text{CFU}}{\text{ml}} = \frac{\text{média das colónias} \times \text{fator de diluição}}{\text{volume plaqueado}} \Leftrightarrow$$

$$\frac{\text{CFU}}{\text{ml}} = \frac{\text{média das colónias} \times \text{fator de diluição}}{10^{-3}} \quad (5)$$

$$\% \text{Redução} = \frac{(C-A)}{C} \times 100 \quad (6)$$

3.8. Citotoxicidade

A análise da citotoxicidade foi realizada pelo método do MTT. O método do MTT (3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) baseia-se na redução dos sais amarelos de tetrazólio por redutases mitocondriais de células metabolicamente ativas. Como resultado, formam-se intracelularmente, cristais azuis de formazano que são solubilizados e posteriormente analisados por espectrofotometria UV/visível. Deste modo, quanto menor for a viabilidade celular, menor será a redução do MTT e menor o sinal espectrofotométrico.

Neste teste as células utilizadas foram fibroblastos dérmicos humanos normais (NHDF), uma vez que os materiais têxteis se destinam a estar em contacto com a pele humana. Os fibroblastos foram semeados em placas de 24 poços (2×10^4 células/poço) em meio de cultura contendo FBS e após 48h de aderência alguns dos poços foram tratados com diferentes concentrações de péptido. Para o péptido Cys-LC-LL-37 foram escolhidas três diferentes concentrações: $5 \mu\text{g/ml}$ que corresponde ao valor de MIC para o *Staphylococcus aureus* e para a *Klebsiella pneumoniae*, $2 \mu\text{g/ml}$ que corresponde a 40% dos valores de MIC e uma concentração duas vezes acima dos valores de MIC, que corresponde à concentração de péptido utilizada no processo de biofuncionalização, $10 \mu\text{g/ml}$. Também para a cecropina-B foram utilizados os valores de MIC obtidos para o *Staphylococcus aureus*: $1.44 \mu\text{g/ml}$ e para a *Klebsiella pneumoniae*: $4.06 \mu\text{g/ml}$, bem como um valor acima do MIC. Esse valor corresponde à concentração utilizada no processo de biofuncionalização, $10 \mu\text{g/ml}$. Assim, após alguns poços terem sido tratados com os AMPs as placas foram incubadas a 37°C , numa atmosfera com CO_2 a 5%, durante 48h. Os poços não tratados foram utilizados como controlo contendo apenas as células aderidas.

Após incubação, removeu-se o sobrenadante dos poços e adicionou-se 200ml de solução de MTT (1mg/ml) em PBS. As placas foram de seguida incubadas durante 4h a 37°C , numa atmosfera de CO_2 a 5%, no escuro de forma a se formarem os cristais de formazano. Em seguida, removeu-se o sobrenadante dos poços e adicionou-se 200ml de DMSO e $20 \mu\text{l}$ de tampão glicil-glicina, para dissolver os cristais de formazano e estabilizar a cor, respetivamente. Os ensaios foram realizados em triplicado e a absorvância de cada poço foi medida a 570nm usando um leitor de microplacas Biochrom Anthos 2020 e a viabilidade celular foi expressa em percentagem de células tratadas viáveis. Estas percentagens foram calculadas por comparação com as células do controlo.

A análise estatística dos resultados da citotoxicidade foi efetuada com recurso ao software IBM SPSS Statistics v.19. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste t de Student, utilizando um intervalo de confiança de 95%. Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Capítulo 4

Resultados e Discussão

Neste trabalho, inicialmente um material têxtil de lã foi funcionalizado com os AMPs, cecropina-B e [Ala5]-Tritrp7, durante 4h, 6h e 24h, com o objetivo de se avaliar pela norma JIS L 1902-2002 o seu efeito antibacteriano em bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) e gram-negativas (*Klebsiella pneumoniae*). Na verdade, verificou-se que 4h é mais que tempo suficiente para que os AMPs se fixem na estrutura do material têxtil. Assim, uma nova estratégia de biofuncionalização foi adotada fazendo variar o tempo de biofuncionalização apenas durante 1h, 2h e 3h. Estes resultados serão apresentados e discutidos de seguida.

Com o mesmo objetivo, o processo de biofuncionalização foi repetido, de forma análoga, para um material têxtil de PA 6.6. No entanto, neste caso os AMPs utilizados no processo de biofuncionalização foram a cecropina-B e o Cys-LC-LL-37. A substituição do péptido [Ala5]-Tritrp7 pelo Cys-LC-LL-37 teve exclusivamente a ver com o facto deste não se encontrar disponível em estoque nem junto do fornecedor. Esta falta deve-se a este péptido ter sido patenteado, o que faz com que não se encontre disponível. Por consequência, para o teste de citotoxicidade, uma vez que o péptido [Ala5]-Tritrp7 estava em falta, o ensaio foi apenas realizado para a cecropina-B e para o Cys-LC-LL-37.

Este trabalho, teve como objetivo desenvolver novos processos antimicrobianos e avaliar e comparar a eficiência dos processos de biofuncionalização, aplicado a um material têxtil de origem natural (lã) e a um material têxtil de origem sintética (PA 6.6).

Assim sendo, o acabamento antimicrobiano aplicado aos materiais têxteis em estudo será analisado em seguida. Este processo foi realizado de forma a controlar e minimizar o aparecimento de infeções, uma vez que pretende diminuir e eliminar os microrganismos potencialmente patogénicos e simultaneamente evitar a deterioração dos materiais têxteis.

4.1 Biofuncionalização antibacteriana da lã com AMPs

4.1.1 Determinação da concentração mínima inibitória (MIC)

A determinação do MIC permitiu-nos estimar a quantidade de péptido a ser utilizada na biofuncionalização dos materiais têxteis, nomeadamente na fibra de lã. Os valores obtidos encontram-se registados na tabela 4.1.1 e serão analisados comparativamente com os já referenciados na literatura.

Tabela 4.1.1 - Valores de MIC obtidos para o *Staphylococcus aureus* e para a *Klebsiella pneumoniae* dos AMPs em estudo.

MIC ($\mu\text{g/ml}$)	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Cecropina-B	1,44	4,06
[Ala5]-Tritrp7	4,58	5,00

A cecropina-B em estudos anteriores mostrou ter atividade preferencial contra as bactérias gram-negativas, com valores de MIC entre 0,5 e 16 $\mu\text{g/ml}$ [71]. Assim, comparando o valor obtido para a *Klebsiella pneumoniae* 4,06 $\mu\text{g/ml}$ com o intervalo previamente referido por Hu *et al.* (2013), conclui-se que este valor está de acordo com o já descrito na literatura. Contudo, a atividade preferencial da cecropina-B contra a bactéria gram-negativa não é visível porque foi também encontrado um valor de MIC de 1,44 $\mu\text{g/ml}$ para o *Staphylococcus aureus*, bactéria gram-positiva. Assim, neste trabalho um valor de MIC bastante baixo foi também obtido para a bactéria gram-positiva em estudo.

Relativamente ao péptido sintético [Ala5]-Tritrp7, na literatura valores de MIC de 20 $\mu\text{g/ml}$ para a *Escherichia coli* e de 4 $\mu\text{g/ml}$ para o *Staphylococcus aureus* foram encontrados por Schibli *et al.* (2006) [67]. Assim é possível concluir que o valor alcançado neste trabalho para o *Staphylococcus aureus* 4,58 $\mu\text{g/ml}$ é muito semelhante ao previamente descrito, mas o valor referente à *Klebsiella pneumoniae* 5 $\mu\text{g/ml}$ é inferior ao anteriormente obtido para a *Escherichia coli* 20 $\mu\text{g/ml}$.

De facto, é visível que os AMPs exibem valores de MIC muito baixos, o que é benéfico comparativamente com outros agentes antimicrobianos incorporados anteriormente em materiais têxteis.

É também importante salientar que os resultados apresentados são válidos pois na análise dos mesmos verificou-se que o controlo negativo que continha apenas péptido e caldo não apresentava crescimento bacteriano e o mesmo se verificou para o controlo do meio. Assim, a inexistência de crescimento no controlo do meio sugere que este não estava contaminado por outras estirpes.

4.1.2 Biofuncionalização

As fibras de lã apresentam grupos funcionais na superfície que a tornam quimicamente reativa. Os principais grupos funcionais que existem naturalmente na estrutura da lã são os grupos amino (-NH₂), carboxilo (-COOH) e hidroxilo (OH-) [72]. Portanto, a reação de ligação terá ocorrido por interações eletrostáticas entre os grupos -NH₂ e -COOH dos AMPs e da lã, já que os AMPs utilizados, [Ala5]-Tritrp7 e cecropina-B, possuem ambos um grupo -NH₂ terminal que facilita a ligação aos grupos -COOH termais da fibra de lã.

4.1.3 Avaliação da eficácia da biofuncionalização

4.1.3.1 Teste do reagente de Bradford

A presença dos AMPs na lã detetada através do teste do reagente de Bradford foi possível pois o reagente Coomassie brilliant blue G tem afinidade específica para os grupos -NH₂ em solução e para a própria lã.

Assim, relativamente ao ensaio de Bradford em solução a concentração de péptido na solução foi determinada através de uma curva de calibração utilizando como proteína padrão a BSA. A curva de calibração obtida foi traçada utilizando concentrações de BSA conhecidas (0, 2,5, 5, 7,5, 10 µg/ml) e encontra-se apresentada abaixo, figura 4.1.1.

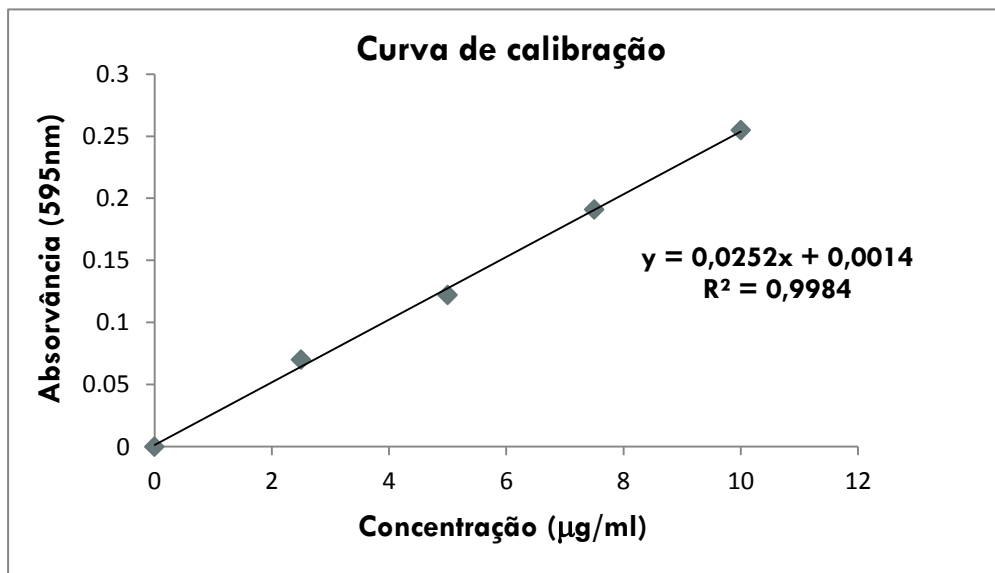


Figura 4.1.1 - Curva de calibração obtida através das soluções padrão de BSA.

Assim, através da equação da curva de calibração ($y=0,0252x+0,0014$) e das absorvâncias lidas a 595nm foi possível determinar a concentração de péptido presente nas soluções de incubação, antes e após incubação, tendo-se verificado que uma coloração azul mais intensa na solução de incubação resultou na existência de uma maior quantidade de péptido em solução e conseqüentemente observou-se menos absorção, difusão e fixação do péptido nos locais reativos da lã. Como resultado, estimou-se também a %E. Esses valores

permitem determinar a absorção do péptido pela fibra pois resultam da diferença entre a coloração inicial e a final da solução, respetivamente antes e após a funcionalização do material têxtil.

Pela tabela 4.1.2 é visível que a absorção do péptido pela fibra de lã, avaliada através da %E, diminui gradualmente com o aumento do tempo de biofuncionalização, para ambos os AMPs. Desta forma, as %E mais elevadas foram obtidas logo após 1h de biofuncionalização sendo de 75% para a cecropina-B e de 65,11% para o [Ala5]-Tritrp7. Este resultado dever-se-á à degradação das proteínas da lã que aumenta com tempo de incubação. Consequentemente, essas proteínas irão passar para a solução de incubação durante a biofuncionalização e influenciar os valores da %E, bem como a concentração real de péptido na solução. Assim, para anular esse efeito foram simultaneamente realizados brancos, amostras tratadas apenas em água. Aquando os descontos dos brancos os resultados não foram muito coerentes pois os valores obtidos foram sistematicamente diferentes de réplica para réplica, o que se deverá à hidrólise não linear das proteínas da lã quando esta é imersa em água.

Tabela 4.1.2 - Resultados espectrofotométricos do ensaio do reagente de Bradford em solução.

	Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	%E
<u>Amostras funcionalizadas com cecropina-B</u>		
1h	2,432	75,68
2h	4,419	55,80
3h	5,208	47,92
<u>Amostras funcionalizadas com [Ala5]-Tritrp7</u>		
1h	3,489	65,11
2h	5,224	47,76
3h	5,634	43,66
Cecropina-B_inicial	10	-
[Ala5] -Tritrp7_inicial	10	-

Desta forma, para superar as limitações obtidas pelo método de Bradford em solução a absorção do péptido pela lã foi medida de forma mais precisa diretamente nas amostras. Pela tabela 4.1.3 é notória a diferença dos valores de reflectância das amostras funcionalizadas em relação ao respetivo controlo. Ou seja, as amostras funcionalizadas, previsivelmente mais escuras, devido à absorção do péptido, refletem menos luz e consequentemente apresentam valores mais baixos de reflectância. Pelo contrário, os valores de K/S são mais elevados para as amostras funcionalizadas pois aumenta a concentração de péptido na fibra e consequentemente as amostras apresentam um aumento na intensidade da coloração azul do corante Coomassie blue. Ou seja, na tabela 4.1.3 diferenças notórias entre os valores de K/S são visíveis para as amostras funcionalizadas, comparativamente com a amostra controlo. Os valores de K/S são maiores para todas as amostras funcionalizadas isto porque houve um

aumento da concentração de péptido na fibra de lã. No entanto, o aumento na intensidade da coloração azul é preferencialmente visível para as amostras funcionalizadas durante 1h.

Em comparação com estudos anteriores realizados por Wang *et al.* (2009) e Monier *et al.* (2010) [73, 74] os resultados obtidos estão em conformidade com os já existentes embora tenham aplicações distintas. Em um estudo já realizado por Monier *et al.* (2010) foi desenvolvido um método para imobilizar a lipase da *Candida rugosa* na fibra de lã e a presença das proteínas enzimáticas na fibra foi caracterizada qualitativamente usando este teste de coloração [74]. Enquanto noutro estudo realizado por Wang *et al.* (2009) [73], o teste de coloração foi utilizado na determinação de lisozimas imobilizadas nas fibras de lã.

É ainda possível verificar que a capacidade de difusão do péptido na fibra é maior para o [Ala5]-Tritrp7. Isto deve-se ao facto deste péptido ser mais pequeno apresentando uma massa molecular de 1875,3 Da, enquanto a cecropina-B apresenta uma massa molecular de 3834,7 Da [67, 71].

Além disso, verifica-se também que os valores de K/S estão de acordo com as %E. De facto, observa-se que após 1h de biofuncionalização os valores de K/S e %E são os mais elevados. Ou seja, a lã funcionalizada durante 1h com a cecropina-B apresenta um valor K/S elevado (5,18) e uma %E também elevada (%E 75). O mesmo se verifica para o [Ala5]-Tritrp7 que apresenta um valor de K/S de 7,06 e um valor de %E de 65,11%. O valor elevado obtido de K/S para a cecropina-B que apresenta na sua composição muitos resíduos de lisina pode estar relacionado com um elevado teor de grupos -NH₂. No entanto, a cecropina-B em termos de tamanho é maior que o péptido sintético [Ala5]-Tritrp7 e apesar deste péptido ter na sua composição resíduos de triptofano, que lhe conferem um carácter hidrofóbico, um valor ainda mais elevado de K/S foi lhe conferido.

Assim, uma vez que ambos os AMPs possuem um grupo -NH₂ terminal, o tamanho será o fator que mais influencia a absorção e difusão dos AMPs na lã, o que é visível pelos valores de K/S.

Além disso, é também perceptível que após 1h de biofuncionalização já há muita absorção. E desta forma 1h será tempo suficiente para que a biofuncionalização ocorra de forma eficaz.

Tabela 4.1.3 -Resultados espectrofotométricos do ensaio do reagente de Bradford na amostra.

Ensaio do reagente de Bradford na amostra/ Lã 610nm	1h	2h	3h
Reflectância (%R)			
▪ Lã não funcionalizada/ Controlo		11,95	
▪ Cecropina-B	8,14	8,29	8,18
▪ [Ala5]-Tritrp7	6,23	6,72	8,30
K/S			
▪ Lã não funcionalizada/ Controlo		3,24	
▪ Cecropina-B	5,18	5,07	5,16
▪ [Ala5]-Tritrp7	7,06	6,48	5,06

4.1.3.2 FTIR-ATR

O espectro de infravermelho obtido para a lã não funcionalizada é mostrado na figura 4.1.2. Tem como características uma banda a $3270,76\text{cm}^{-1}$ devido ao estiramento N-H e uma banda por volta dos $2917,12\text{cm}^{-1}$ correspondente aos grupos $-\text{CH}_2$. A intensidade das bandas associadas à amida I, amida II e amida III aparecem respetivamente a $1635,37\text{cm}^{-1}$, $1539,90\text{cm}^{-1}$ e $1237,64\text{cm}^{-1}$ e estão de acordo com as bandas características do espectro da lã nativa [75].

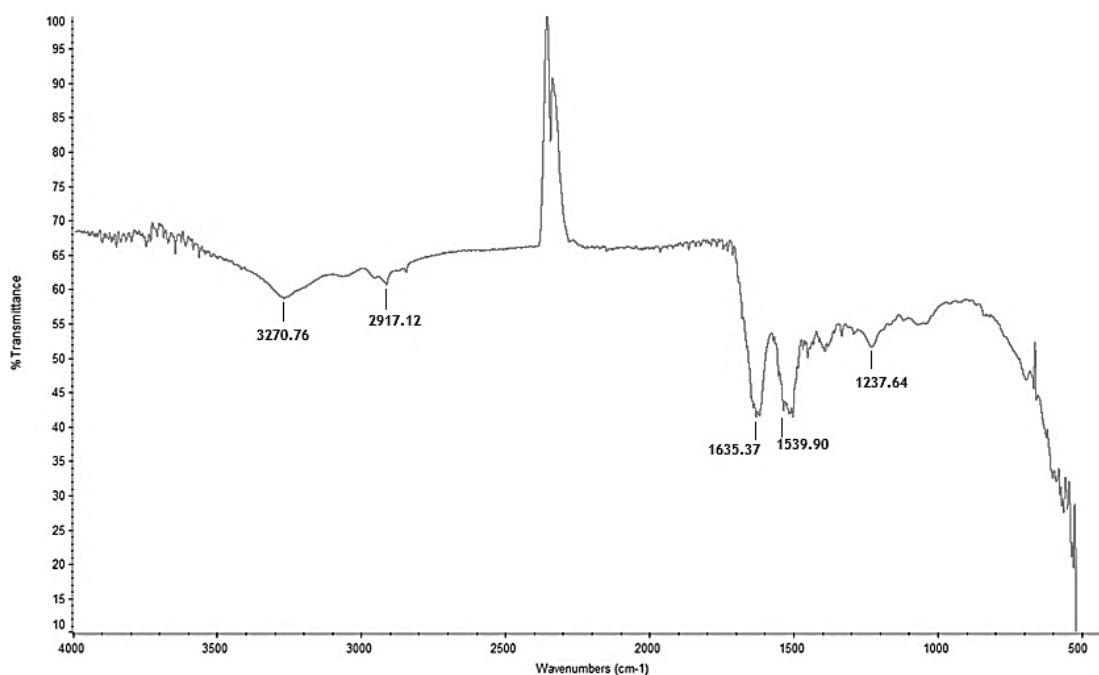


Figura 4.1.2- Espectro FTIR da lã.

Mudanças na composição química da lã seriam esperadas após biofuncionalização da lã com os AMPs. A confirmação da presença dos AMPs na lã deveria ser feita com base nas principais bandas características, ou seja, através dos picos das amidas. No entanto, apesar do espectro da lã não funcionalizada apresentar as bandas características esperadas, quando analisado e comparado com os espectros da lã funcionalizada com os AMPs, cecropina-B e [Ala5]-Tritrp7, nas diferentes condições (1h, 2h, 3h), não se detetaram alterações que permitissem retirar informações capazes de fundamentar a presença dos AMPs, figura 4.1.3. Isto poderá dever-se ao facto da lã ser uma fibra proteica que possui na sua constituição carbono, hidrogénio, azoto e enxofre, ou seja, a composição elementar da lã é idêntica à dos próprios AMPs o que poderá dificultar a deteção de potenciais diferenças. No entanto, deve ainda ter-se em conta a baixa concentração de péptido utilizada ($10\mu\text{g}/\text{ml}$), que poderá inviabilizar a sua deteção.

Assim, pode concluir-se que a análise no FTIR não foi capaz de detetar possíveis alterações na estrutura da lã, a quando a ligação dos AMPs.

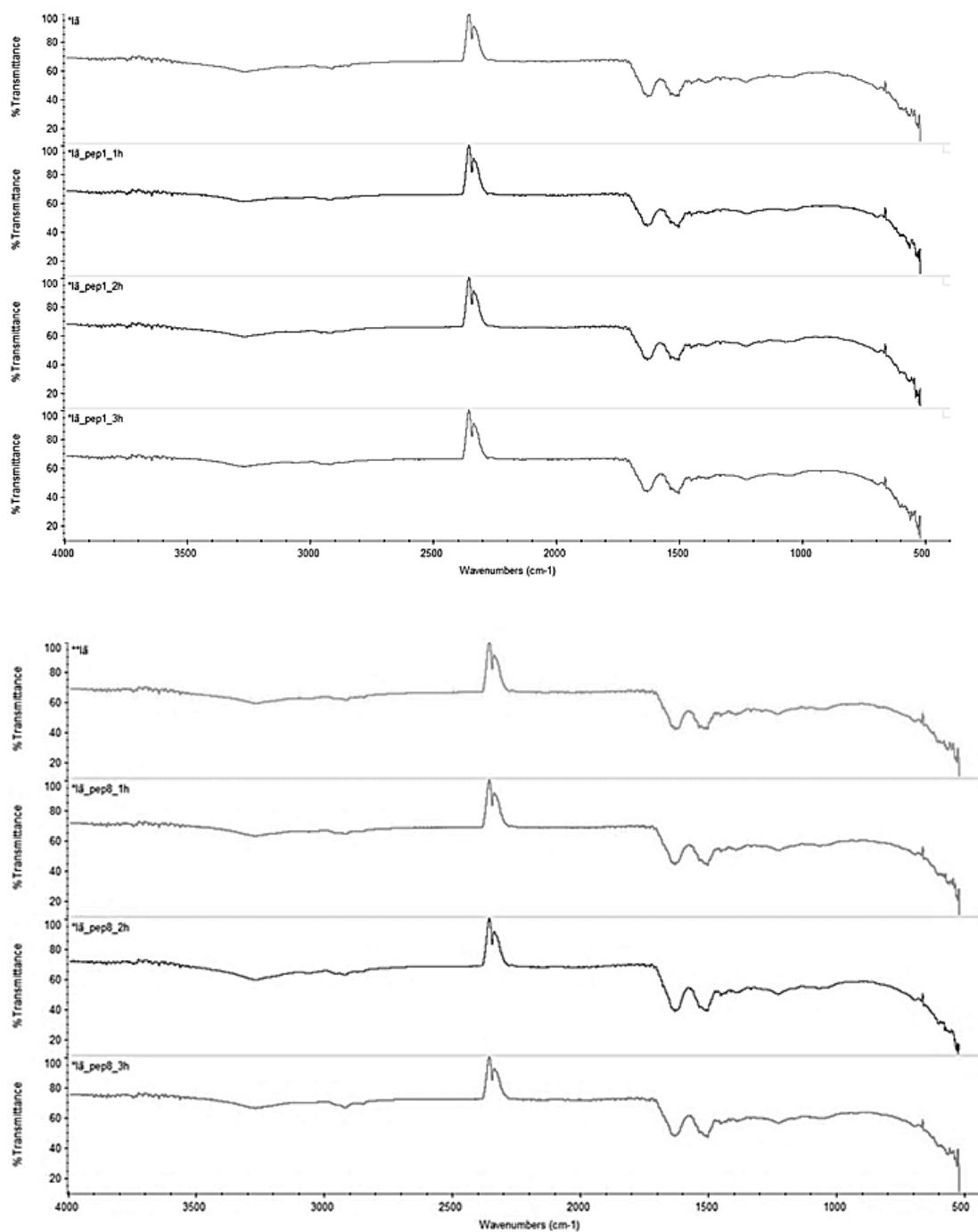


Figura 4.1.3- Espectros FTIR das amostras de lã funcionalizadas com os AMPs. Em cima encontram-se registrados os espectros relativos às amostras funcionalizadas com a cecropina-B e em abaixo os espectros relativos às amostras funcionalizadas com o [Ala5]-Trirp7.

Além disso, é de salientar que nos espectros obtidos aparece uma interferência por volta dos $2000\text{-}2500\text{cm}^{-1}$. Esta deve-se à absorção de vapor de água e/ou de dióxido de carbono atmosférico. Para eliminar esta interferência poderia ter sido feita uma correção automática, no próprio equipamento. Ou seja, a supressão da interferência consiste no desconto do efeito da água e/ou do dióxido de carbono. Desconto esse feito de forma automática através de espectros de referência da água e/ou do dióxido de carbono.

4.1.4 Avaliação da qualidade do material funcionalizado

4.1.4.1 Difração de raio-x (DRX)

A análise por DRX neste trabalho foi pensada para detetar possíveis modificações nas características estruturais da lã que se refletem na alteração da própria cristalinidade da fibra.

Os difractogramas das amostras são mostrados na figura 4.1.4 e por análise dos difractogramas registados é possível verificar que o gráfico referente à amostra de lã não funcionalizada exibe um padrão de DRX típico da fibra de lã, exibindo um pico proeminente a $2\theta=20,2^\circ$ e um pico menor a cerca de $2\theta=9,2^\circ$. Estes picos foram atribuídos à conformação da lã em folhas- β e em α -hélices, respetivamente [9].

Comparando a intensidade dos picos a $2\theta=9,2^\circ$ e a $20,2^\circ$ do difractograma da amostra de lã não funcionalizada com os picos dos difractogramas da lã tratada é visível que a intensidade do pico a $2\theta=9,2^\circ$ aumenta no caso da lã tratada em água destilada, amostra teste utilizada para verificar e comparar o simples efeito da água, e no caso das amostras de lã funcionalizadas durante 1h com os AMPs. Este aumento é mais evidente que as mudanças na intensidade do pico a $2\theta=20,2^\circ$, como é mostrado na tabela 4.1.4. Ou seja, a intensidade do pico a $2\theta=9,2^\circ$ foi de 587 para a lã não funcionalizada. Este valor é menor que o obtido para a lã tratada com água destilada, 1127. No entanto, um aumento ainda maior na intensidade foi registado para as amostras de lã funcionalizadas, sendo 1265 para a lã tratada com cecropina-B e 1324 para lã tratada com o [Ala5]-Tritrp7.

Por outro lado, a intensidade do pico a $2\theta=20,2^\circ$ diminuiu para a lã tratada com água: 1069 e para lã funcionalizada com o [Ala5]-Tritrp7: 1181, comparativamente com o valor obtido para a lã não funcionalizada: 1234. No entanto, foi ligeiramente mais elevado para a lã funcionalizada com a cecropina-B: 1353.

Assim, relativamente à amostra tratada com água destilada, o ligeiro aumento na intensidade do pico a $2\theta=9,2^\circ$ é devido à organização das cadeias macromoleculares. Essa organização é causada pelo efeito do inchamento da fibra pela absorção da água. Relativamente às amostras funcionalizadas com os AMPs verifica-se um aumento ténue mas mais notório da intensidade do pico a $2\theta=9,2^\circ$, que confere uma maior cristalinidade à fibra aquando a ligação dos AMPs.

Pelo contrário, relativamente ao pico a $2\theta=20,2^\circ$ a intensidade diminuiu para a lã tratada com água destilada. Esta redução na intensidade do pico provoca uma diminuição na configuração em folhas- β que resulta do efeito da água na organização da fibra de lã. O mesmo efeito é visível para a lã funcionalizada com o péptido [Ala5]-Tritrp7. Este resultado dever-se-á ao facto do [Ala5]-Tritrp7 ser um péptido pequeno que apresenta uma massa

molecular baixa (1875,3 Da), o que faz com que interfira menos na organização da lã [67]. No entanto, apesar da cecropina-B ser também um pequeno péptido é ligeiramente maior que o [Ala5]-Trirtp-7, pois apresenta uma massa molecular de 3834,7 Da [71]. Assim, o ligeiro aumento na intensidade do pico a $2\theta=20,2^\circ$, que revela um ligeiro aumento na configuração em folhas-B dever-se-á à quebra de ligações de hidrogénio da proteína da lã [76].

Estes resultados são consistentes com os obtidos em outros estudos nomeadamente por um trabalho realizado por Eslahi *et al.* (2013) que consistiu em otimizar a hidrólise enzimática das fibras de lã para produzir NPs de lã [77].

Portanto, podemos concluir que apesar de ligeiras modificações nos difractogramas, o procedimento aplicado não causou alterações significativas na composição macromolecular da fibra de lã.

Tabela 4.1.4- Registo das intensidades dos picos a $2\theta=9,2^\circ$ e a $2\theta=20,02^\circ$ da amostra de lã não funcionalizada e das amostras de lã tratadas durante 1h.

	Intensidade	
	$2\theta=9,2^\circ$	$2\theta=20,2^\circ$
Lã não funcionalizada	587	1234
Lã em água destilada_1h	1127	1069
Lã funcionalizada com cecropina-B_1h	1265	1353
Lã funcionalizada com [Ala5]-Trirtp7_1h	1324	1181

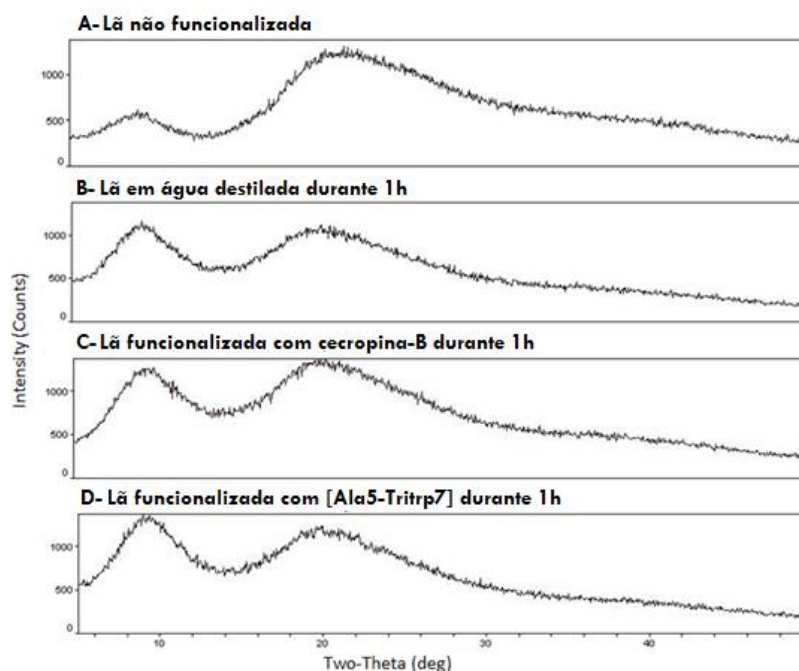


Figura 4.1.4- Espetros de difração de raio-x (DRX) da lã tratada durante 1h. A- Espectro da lã não funcionalizada; B- Lã em água destilada durante 1h; C- Lã funcionalizada com cecropina-B durante 1h; D- Lã funcionalizada com [Ala5]-Trirtp7 durante 1h.

4.1.4.2 Microscopia eletrônica de varrimento (SEM)

Na figura 4.1.5 é possível observar as imagens de SEM da lã não funcionalizada e funcionalizada com os AMPs. Pode verificar-se pelas imagens que não existem diferenças evidentes nem danos na morfologia da superfície da lã, antes e após a biofuncionalização, o que significa que não houve nenhuma degradação ou alteração importante nas fibras de lã.

Resultados semelhantes foram obtidos num estudo realizado por Silva *et al.* (2005) em que a fibra de lã foi tratada com subtilisina e subtilisina-PEG. Neste caso também não foram encontradas alterações significativas na superfície da lã após ter sido pré-tratada com um surfatante não iônico e branqueada [14].

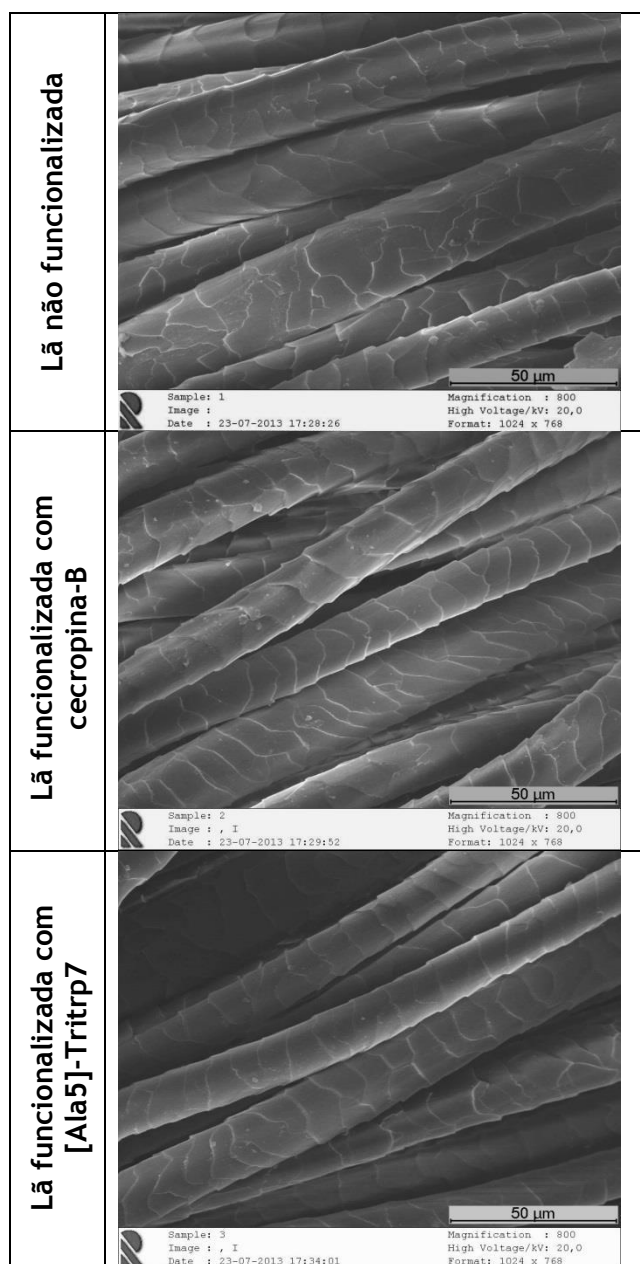


Figura 4.1.5 - Imagens de microscopia eletrônica de varrimento (SEM) da lã não funcionalizada e das amostras de lã funcionalizadas com os AMPs.

4.1.5 Avaliação da atividade antimicrobiana

a) Teste de difusão em Agar

O ensaio qualitativo realizado para as duas estirpes bacterianas: *Staphylococcus aureus* (gram-positiva) e *Klebsiella pneumoniae* (gram-negativa), não apresentou a formação de uma zona de inibição na área à volta das amostras têxteis funcionalizadas durante 1h com a cecropina-B e [Ala5]-Tritrp7. No entanto, na zona de contacto com a amostra têxtil verificou-se inibição de crescimento bacteriano, figura 4.1.6. O controlo negativo por sua vez não demonstrou atividade antimicrobiana o que valida o teste. Este resultado está de acordo com os restantes ensaios, nomeadamente com os valores de K/S pois mais uma vez verifica-se que 1h é tempo suficiente para que a biofuncionalização ocorra de forma eficiente e para que as amostras possuam efeito antimicrobiano.

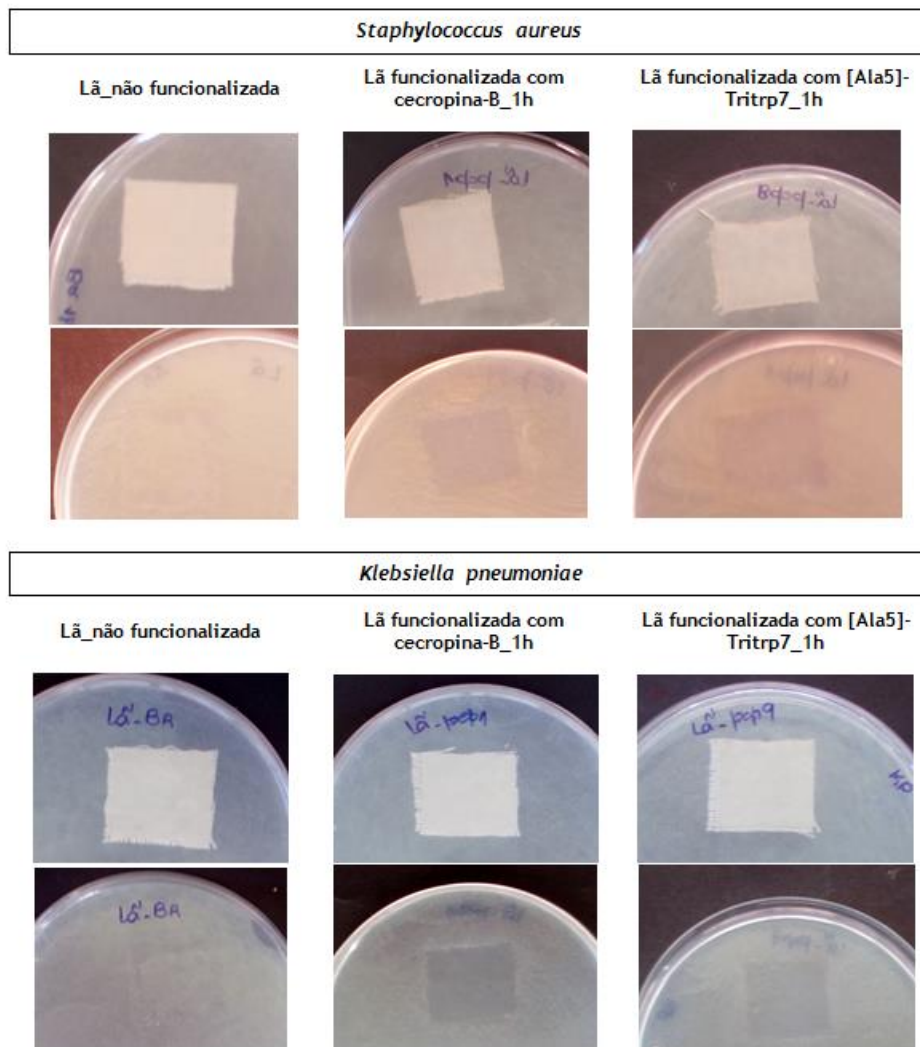


Figura 4.1.6 - Resultados obtidos no teste de difusão em agar: avaliação do efeito antimicrobiano.

b) Teste de suspensão

Como se poder verificar pelos resultados apresentados na tabela 4.1.5 e figura 4.1.7 as amostras funcionalizadas durante 1h com os AMPs cecropina-B e [Ala5]-Tritrp7 apresentam uma maior redução do crescimento bacteriano para as 24h. Assim, para o *Staphylococcus aureus*, após 24h de contacto com as amostras de lã funcionalizadas houve uma redução no crescimento bacteriano de 71,67% para a cecropina-B e de 66,74% para o [Ala5]-Tritrp7, em comparação com a amostra de lã não funcionalizada. Enquanto para *Klebsiella pneumoniae* após 24h de contacto com as amostras de lã funcionalizadas, houve uma redução no crescimento bacteriano de 85,95% para a cecropina-B e de 88,65% para o [Ala5]-Tritrp7, em comparação com a amostra de lã não funcionalizada. Desta forma, é possível concluir que um contacto mais prolongado dos AMPs com as amostras de lã melhora o efeito antimicrobiano.

Efetivamente, relativamente aos resultados às 0h, para o *Staphylococcus aureus* após 0h de contacto com as amostras de lã funcionalizadas, houve uma redução no crescimento bacteriano de 42,03% para cecropina-B e de 58,86% para o [Ala5]-Tritrp7. Similarmente, para a *Klebsiella pneumoniae* após 0h de contacto com as amostras de lã funcionalizadas, houve uma redução no crescimento bacteriano de 76,88% para a cecropina-B e de 66,56% para o [Ala5]-Tritrp7, em comparação com a amostra de lã não funcionalizada. Assim, apesar da redução do crescimento bacteriano ser mais evidente para as 24h é também visível uma diminuição no crescimento bacteriano quando as amostras funcionalizadas com os AMPs contactaram apenas durante alguns minutos com o inóculo. Contudo essa diminuição foi menos evidente o que indica que o efeito antimicrobiano não é completamente imediato.

Assim, estes resultados confirmam mais uma vez que a biofuncionalização da lã durante 1h é suficiente para obter bons resultados relativamente à atividade antimicrobiana e à eficácia da biofuncionalização da fibra de lã com os AMPs.

Em comparação com outros estudos realizados, nomeadamente por Tang *et al.* (2012), em que novas propriedades multifuncionais foram adquiridas pela fibra de lã por combinação de sílica e NPs de prata na sua superfície, podemos verificar que a percentagem de redução de crescimento da *Escherichia coli* (bactéria gram-negativa) foi de 66% e 71% para a lã com prata e para lã com sílica e prata, respetivamente [41]. Estas percentagens, 66% e 71%, comparativamente com as referentes à *Klebsiella pneumoniae* (bactéria gram-negativa) obtidas neste estudo, 85,95% para a cecropina-B e 88,65% para o [Ala5]-Tritrp7, são relativamente inferiores, o que nos permite concluir que a incorporação dos AMPs influencia de forma bastante positiva a atividade antimicrobiana da lã. Por outro lado, a percentagem de redução de crescimento do *Staphylococcus aureus* obtida neste trabalho foi comparada com a alcançada num estudo realizado por Wang *et al.* (2009) de imobilização de lizosimas na lã [73]. E desta forma os valores obtidos 71,67% para cecropina-B e 66,74% para o péptido [Ala5]-Tritrp7 mostraram ser relativamente inferiores ao alcançado no estudo anteriormente realizado por Wang *et al.* (2009) que foi de 80,95% [73]. Assim, apesar de esta diferença ser notória o efeito antimicrobiano que os AMPs provocam na fibra de lã é indiscutível, pois os

AMPs em estudo mostraram ser eficazes uma vez que o efeito antimicrobiano provocado nas amostras de lã mostrou ser duradouro e alcançado com sucesso, mesmo após lavagem.

Tabela 4.1.5- Resultados do teste quantitativo realizado nas amostras de lã funcionalizadas com AMPs durante 1h.

	<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
	t(h)	CFU/ml	%Redução crescimento	t(h)	CFU/ml	%Redução crescimento
Controlo	0h	2,43E+05	-	0h	8,00E+05	-
	24h	5,33E+08	-	24h	3,15E+08	-
Cecropina-B_1h	0h	1,41E+05	42,03	0h	1,85E+05	76,88
	24h	4,09E+08	71,67	24h	4,43E+07	85,95
[Ala5]-Tritrp7_1h	0h	1,00E+05	58,86	0h	2,68E+05	66,56
	24h	3,67E+08	66,74	24h	3,58E+07	88,65

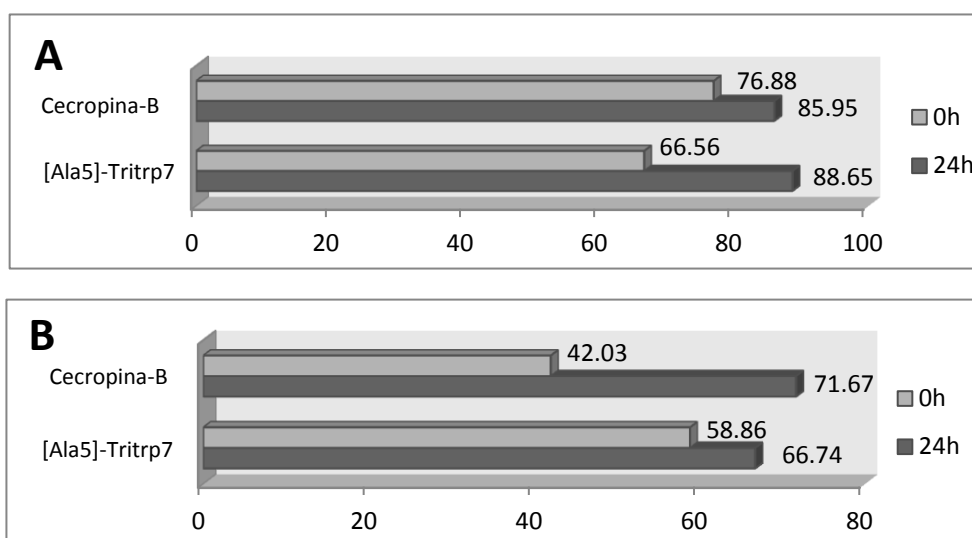


Figura 4.1.7. Resultados obtidos no teste de suspensão: avaliação do efeito antimicrobiano. Representação gráfica das percentagens de redução bacterianas relativas às 0h e 24h para a *Klebsiella pneumoniae* (A) e *Staphylococcus aureus* (B).

A atividade antimicrobiana da cecropina-B está estreitamente relacionada com a capacidade de formar α -hélices anfipáticas. Isto porque a cecropina-B é um péptido catiónico natural, que apresenta uma carga líquida positiva e apresenta múltiplos resíduos de lisina. Estes resíduos são de extrema importância pois facilitam a atração eletrostática inicial para os fosfolípidos carregados negativamente das membranas das células alvo. Por consequência esta ligação à membrana promove o desenvolvimento e a modificação da estrutura da mesma, o que leva à rutura e libertação do conteúdo celular [52, 66, 78].

Por outro lado, o péptido sintético [Ala5]-Tritrp7 resulta da substituição do primeiro resíduo de prolina (Pro) situado na posição cinco da Tritrpticina por um resíduo de alanina (Ala) (Tritrp7). Este péptido foi caracterizado por possuir uma maior aptidão para formar uma

estrutura helicoidal anfipática, que pode facilitar a interação com as células e levar à perda da integridade das mesmas [67]. Esta evidência pode ser a explicação para terem sido obtidas maiores taxas de redução do crescimento bacteriano para este péptido.

Em conclusão, ambos os AMPs foram ligados com sucesso à fibra de lã. Ainda assim, é importante salientar que a opção pela cecropina-B ou pelo [Ala5]-Tritrp7 depende do objetivo do trabalho e nomeadamente do tipo de aplicação pretendida, pois a cecropina-B é eficaz para a eliminação de agentes patogénicos e pode afetar a célula hospedeira de forma a promover a reparação de feridas, o que poderá pontenciar a sua aplicação em *Wound-dressing*. Além disso, apresenta atividade anti-viral e anti-fúngica conhecida. Por outro lado, o [Ala5]-Tritrp7 é um AMP que pertence à família das CAMPs e apresenta atividade antibacteriana eficaz [52, 66, 67, 78].

4.2 Biofuncionalização antibacteriana da PA 6.6 com AMPs

4.2.1 Determinação da concentração mínima inibitória (MIC)

Os valores de MIC obtidos para os AMPs utilizados neste trabalho encontram-se registados na tabela 4.2.1 e serão analisados comparativamente com os já referenciados na literatura.

Tabela 4.2.1 - Valores de MIC obtidos para o *Staphylococcus aureus* e para a *Klebsiella pneumoniae* dos AMPs em estudo.

MIC ($\mu\text{g/ml}$)	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Cecropina-B	1,44	4,06
Cys-LC-LL-37	5,00	5,00

Relativamente à cecropina-B, neste trabalho foram obtidos valores de MIC de 1,44 $\mu\text{g/ml}$ para o *Staphylococcus aureus* e de 4,06 $\mu\text{g/ml}$ para a *Klebsiella pneumoniae*. Estes resultados podem ser comparados aos obtidos em outros estudos.

Um estudo prévio realizado por Hu *et al.* (2013) mostra, entre outros resultados, que a cecropina-B exibe preferencial atividade contra bactérias gram-negativas, com um valor de MIC entre 0,5 e 16 $\mu\text{g/ml}$. Assim, comparando o valor obtido de 4,06 $\mu\text{g/ml}$ para a *Klebsiella pneumoniae* com o intervalo descrito por Hu *et al.* (2013) [71], verifica-se que este valor se encontra de acordo com o intervalo referido (entre 0,5 e 16 $\mu\text{g/ml}$). No entanto, foi também obtido um valor de MIC para o *Staphylococcus aureus* de 1,44 $\mu\text{g/ml}$. Assim, ao se analisar os

resultados, a preferencial atividade da cecropina-B para bactérias gram-negativas não foi verificada obtendo-se um valor de MIC bastante baixo para a bactéria gram-positiva em estudo.

Relativamente ao Cys-LC-LL-37 os valores de MIC obtidos foram de 5µg/ml tanto para o *Staphylococcus aureus* como para a *Klebsiella pneumoniae*. Estes resultados mostraram-se ser bastante positivos, pois são relativamente mais baixos quando comparados aos anteriormente descritos para a Cys e para o péptido natural LL-37. Ou seja, num estudo anterior realizado por Krahulec *et al.* (2010) em que o péptido LL-37 foi produzido de forma recombinante em *Escherichia coli* valores de MIC de 7,4µg/ml para *Escherichia coli* e de 10,4µg/ml para o *Staphylococcus aureus* foram obtidos [79]. Esses valores comparados aos alcançados neste trabalho para o péptido sintético Cys-LC-LL-37 são mais elevados, sendo nesse caso necessária uma maior concentração de péptido para que seja adquirido efeito antimicrobiano. Por outro lado, relativamente à Cys valores de MIC de 48mg/ml para a *Klebsiella pneumoniae* e de 6mg/ml para o *Staphylococcus aureus* foram anteriormente encontrados por Caldeira E (2012) [80]. Estes valores são muito mais elevados comparativamente com os conseguidos neste estudo para o péptido Cys-LC-LL-37. No entanto, as concentrações elevadas para a Cys podem dever-se ao facto deste aminoácido em solução aquosa ter capacidade de fazer *crosslinking*. Essa capacidade faz com que uma maior concentração de Cys tenha de ser utilizada para que possua um efeito antimicrobiano. Assim, para se obter propriedades antimicrobianas são necessárias quantidades muito maiores de Cys comparativamente às de péptido e, além disso, quando os AMPs são utilizados existe uma reduzida probabilidade de aquisição de resistência para as bactérias.

Dessa forma, pelos resultados obtidos para as bactérias em estudo é visível que ao combinar em uma só molécula a Cys e o péptido natural LL-37 os valores de MIC são muito mais baixos. Esta aliança será então vantajosa pois uma menor concentração será necessária para que o péptido exiba atividade antimicrobiana.

4.2.2 Biofuncionalização

As fibras de PA 6.6 apresentam grupos amida (-NHCO-) ao longo da sua cadeia e grupos amino (-NH₂) e carboxilo (-COOH) nas extremidades [81]. Estes grupos funcionais que existem naturalmente na estrutura da PA 6.6 tornam-na quimicamente reativa. Portanto, a reação de ligação dos AMPs à fibra de PA 6.6 terá ocorrido por interações eletrostáticas. No caso da cecropina-B, as interações terão ocorrido entre os grupos -NH₂ terminal do péptido e os grupos -COOH terminais da fibra de PA 6.6. Enquanto, a ligação do Cys-LC-LL-37 à fibra de PA 6.6 terá ocorrido entre o grupo hidroxilo (-OH) terminal do péptido com os grupos -NHCO- do polímero. No entanto, para o péptido sintético Cys-LC-LL-37 podem também ocorrer ligações

entre os grupos -NH_2 e/ou -COOH do aminoácido de Cys com os grupos -NH_2 e/ou -COOH existentes nas extremidades da cadeia polimérica.

4.2.3 Avaliação da eficácia da biofuncionalização

4.2.3.1 Teste do reagente de Bradford

A presença dos AMPs na PA 6.6 foi detetada através do teste do reagente de Bradford. Isto porque o principal componente do reagente de Bradford, o corante Coomassie brilliant blue G, tem afinidade específica para os grupos -NH_2 em solução e para a própria PA. Assim, na realização do ensaio de Bradford em solução a coloração azul concedida à solução deve-se a interações eletroestáticas entre os grupos -NH_2 dos AMPs presentes na solução de incubação e os grupos -COOH do corante. O mesmo acontece quando a realização do ensaio na própria amostra, pois no caso da amostra de PA 6.6 não funcionalizada os grupos -NH_2 terminais da fibra ligam-se aos grupos -COOH do corante, enquanto nas amostras funcionalizadas além de haver afinidade para os grupos -NH_2 terminal da própria PA 6.6 existem os grupos -NH_2 dos AMPs ligados, que também têm afinidade para o corante.

Em relação ao ensaio de Bradford em solução, a concentração de péptido em solução foi determinada através de uma curva de calibração utilizando como proteína padrão a BSA. A curva de calibração obtida foi traçada utilizando concentrações de BSA conhecidas (0, 2,5, 5, 7,5, 10 $\mu\text{g/ml}$) e encontra-se apresentada abaixo, figura 4.2.1.

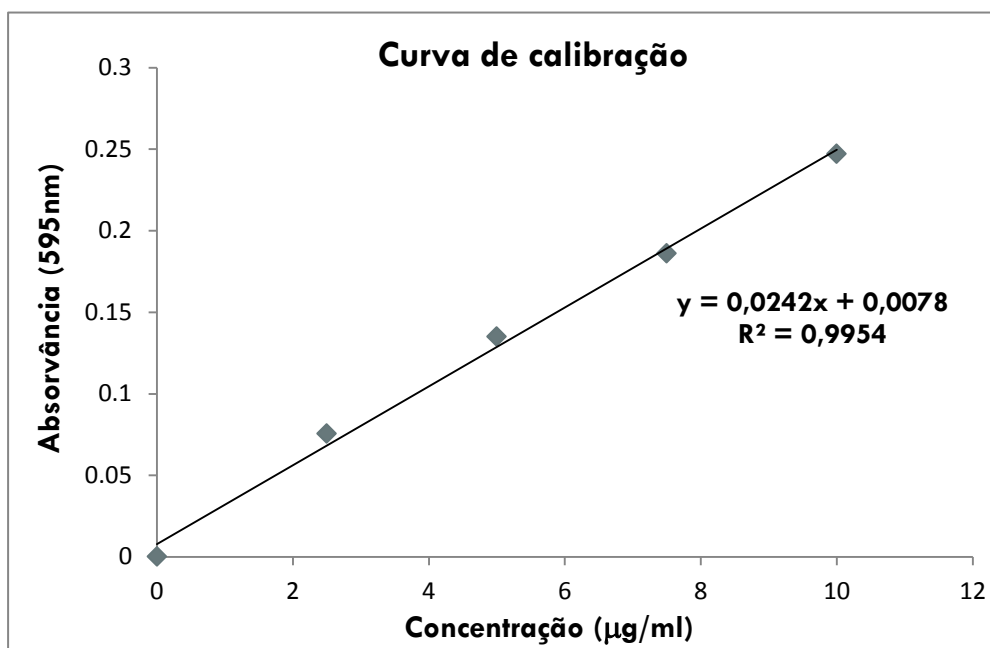


Figura 4.2.1 - Curva de calibração obtida através das soluções padrão de BSA.

Assim, através da equação da curva de calibração ($y=0,0242x+0,0078$) e das absorvâncias lidas a 595nm foi possível determinar a concentração de péptido presente nas soluções de incubação. Desta forma, uma coloração azul mais intensa da solução de incubação evidencia a existência de uma maior concentração de péptido em solução e consequentemente menor absorção, difusão e fixação do péptido na PA 6.6.

Como resultado, foi também estimada a %E através da diferença entre a coloração inicial e final da solução. Esta diferença permite determinar a absorção do péptido pela fibra.

De forma a facilitar a análise e a interpretação dos resultados obtidos, na tabela 4.2.2, encontram-se de forma organizada, os valores das concentrações de péptido presentes nas respectivas soluções de incubação e as respectivas %E.

Tabela 4.2.2- Resultados espectrofotométricos do ensaio do reagente de Bradford em solução.

	Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	%E
<u>Amostras funcionalizadas com Cecropina-B</u>		
1h	4,802	51,98
2h	4,099	59,01
3h	5,008	49,92
<u>Amostras funcionalizadas com Cys-LC-LL-37</u>		
1h	3,438	65,62
2h	2,322	76,78
3h	4,099	59,01
Cecropina-B_inicial	10	-
Cys-LC-LL-37_inicial	10	-

Pela tabela 4.2.2 verifica-se através das %E que a absorção dos AMPs pela fibra após 1h de biofuncionalização apresenta valores bastante positivos para ambos os AMPs, observando-se com o aumento do tempo de biofuncionalização um ligeiro incremento nesses valores. No entanto, após 3h de biofuncionalização, os valores obtidos para a %E diminuíram ligeiramente. Esta diminuição dever-se-á a uma absorção/desabsorção do péptido na amostra têxtil de PA 6.6 com o tempo.

Estes valores foram semelhantes aos obtidos em um estudo anteriormente realizado por Son *et al.* (2007) [29], em que se fizeram variar de forma isolada parâmetros como pH, temperatura e razão de banho, a fim de avaliar a sua influência na biofuncionalização da PA 6.6 com a berberina e otimizar o processo. Ou seja, nesse estudo os valores de %E variaram na generalidade entre os 65-75%, o que está praticamente de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho. Essa ligeira diferença nos resultados dever-se-á ao facto do agente utilizado em ambos os trabalhos ser distinto bem como a concentração utilizada e as condições do processo.

Ainda assim, é possível concluir pelas %E que a capacidade de difusão do péptido na fibra é maior para o péptido Cys-LC-LL-37. Este péptido apesar de apresentar um tamanho similar à cecropina-B, é mais reativo o que facilitará a sua absorção e fixação na PA 6.6. Ou seja, a cecropina-B apresenta um N-terminal básico e um C-terminal aminado que facilita a interação com os grupos -COOH existentes na extremidade da PA 6.6. No entanto, o péptido Cys-LC-LL-37 possui um grupo -OH no C-terminal que pode interagir com os grupos -NHCO- do polímero. Além disso, o aminoácido Cys presente no N-terminal poderá também ser essencial para a ligação do péptido à fibra de PA 6.6, pois os grupos -NH₂ e/ou -COOH do aminoácido podem ligar-se aos grupos funcionais, -NH₂ e/ou -COOH, existentes nos extremos da PA 6.6. Assim, este péptido tem a capacidade de se ligar à superfície da fibra mais facilmente, pois possui uma maior diversidade de mecanismos de interação o que facilita absorção e consequentemente a fixação do péptido na PA 6.6.

No entanto, para avaliar de forma mais precisa a absorção do péptido pela PA 6.6 foi realizado o ensaio de Bradford na própria amostra. Este ensaio permitiu medir a reflectância das diferentes amostras e determinar os valores de K/S. Assim, pela tabela 4.2.3 é possível verificar pelos valores das reflectâncias das amostras funcionalizadas em relação ao respetivo controlo, que as amostras funcionalizadas com os AMPs estão mais escuras e consequentemente apresentam valores de reflectância mais baixos. Pelo contrário, os valores de K/S são mais elevados para todas as amostras funcionalizadas pois aumenta a concentração de péptido na fibra de PA 6.6. O aumento na intensidade da coloração azul, para as amostras funcionalizadas durante 1h, é bastante significativo o que demonstra que já há muita absorção. Por outro lado, podemos também observar que após 3h de biofuncionalização há uma desabsorção do péptido nas amostras. Desta forma, pelos valores de K/S e pelas %E podemos concluir que 1h será tempo suficiente para que a biofuncionalização ocorra de forma eficaz.

Além disso, verifica-se também que os valores de K/S estão de acordo com as %E, observando-se, após 1h de biofuncionalização, uma %E=51,98 e um K/S=3,08 para a cecropina-B e uma %E=65,62% e um K/S=3,18 para o Cys-LC-LL-37.

Assim, ao se comparar os valores de K/S obtidos neste trabalho com os resultados obtidos em um estudo anterior realizado por Son *et al.* (2007) em que foram alcançados valores de K/S aproximadamente, entre 2,44 e 2,97 [29], é visível que existe uma ligeira diferença nos resultados obtidos. No entanto, essa diferença não é significativa, o que permite concluir que neste trabalho os valores de K/S estão em conformidade com os alcançados na biofuncionalização da PA 6.6 com a berberina [29].

Tabela 4.2.3 - Resultados espectrofotométricos do ensaio do reagente de Bradford na amostra.

Ensaio do reagente de Bradford na amostra/ PA 6.6 620nm	1h	2h	3h
Reflectância (%R)			
▪ PA 6.6 não funcionalizada/ Controlo		16,71	
▪ Cecropina-B	12,45	11,70	12,83
▪ Cys-LC-LL-37	12,14	11,66	12,46
K/S			
▪ PA 6.6 não funcionalizada/ Controlo		2,08	
▪ Cecropina-B	3,08	3,33	2,96
▪ Cys-LC-LL-37	3,18	3,35	3,07

4.2.4 Avaliação da qualidade do material funcionalizado

4.2.4.1 Difração de raio-x (DRX)

A PA 6.6 apresenta duas formas cristalinas que são conhecidas como as formas α e β . Na forma cristalina α as cadeias moleculares interagem através de ligações de hidrogénio. As ligações de hidrogénio estabelecem-se entre os grupos laterais -NHCO- das cadeias formando estruturas secundárias (lâminas/folhas). Relativamente à forma cristalina β a formação das estruturas secundárias é similar à forma cristalina α embora difira na posição relativa. Na forma cristalina α cada estrutura secundária movimenta-se sempre no mesmo sentido em relação à anterior, no entanto, na estrutura cristalina β as estruturas secundárias movimentam-se alternadamente para cima e para baixo [82].

A forma cristalina α é mais estável à temperatura ambiente e o padrão típico de DRX da forma α da PA 6.6 apresenta dois picos característicos a $2\theta=20,28^\circ$ e $2\theta=23,02^\circ$, designados como α -01 e α -02, respetivamente. O pico α -01 resulta da distância entre as ligações de hidrogénio que ligam as cadeias, enquanto o pico α -02 resulta da separação das folhas/lâminas ligadas por pontes de hidrogénio [82].

Assim, por observação do difractograma referente à PA 6.6 não funcionalizada, figura 4.2.2, pode verificar-se que os picos característicos da PA 6.6 são evidenciados a $2\theta=20,26^\circ$ e $2\theta=23,1^\circ$ e estão de acordo com o sustentado por outros autores, nomeadamente por Wang *et al.* (2006)[82].

Comparando a intensidade dos picos a $2\theta=20,26^\circ$ e a $2\theta=23,1^\circ$ do difractograma referente à amostra de PA 6.6 não funcionalizada ($I_{(2\theta=20,26^\circ)}=3323$ e $I_{(2\theta=23,1^\circ)}=2916$) com os picos do difractograma da PA 6.6 tratada com água destilada ($I_{(2\theta=20,26^\circ)}=3202$ e $I_{(2\theta=23,1^\circ)}=2736$) é evidente uma ligeira diminuição na intensidade dos picos. No entanto, uma redução um pouco maior na intensidade é observada para o pico a $2\theta=23,1^\circ$, tabela 4.2.4. Esta maior

redução deve-se ao facto da água conseguir colocar-se entre as pontes de hidrogénio, fazendo parte da estrutura do polímero. Assim, a natureza higroscópica das ligações hidrogénio faz com que na presença de água a PA 6.6 funcione como um plastificante, pois a água separa as cadeias moleculares do polímero e conseqüentemente diminui a cristalinidade [31].

Por outro lado, em relação às amostras funcionalizadas com os AMPs, cecropina-B e Cys-LC-LL-37, verifica-se pelos resultados que apresentam um comportamento distinto, tabela 4.2.4. Esta distinção de comportamento poderá dever-se à reatividade dos AMPs e à forma como estes se ligam à fibra de PA 6.6.

Assim, comparando o difractograma da PA 6.6 funcionalizada com a cecropina-B com o difractograma da PA 6.6 não funcionalizada verifica-se uma ligeira diminuição na intensidade de 3323 para 3213, relativamente ao pico a $2\theta=20,26^\circ$. Esta diminuição sugere que este péptido ao se ligar à PA 6.6 provoca uma ligeira alteração na interação entre as lâminas/folhas. Essa diminuição poderá dever-se ao facto deste péptido, que possui um grupo $-NH_2$ terminal, se ligar aos grupos $-COOH$ existentes nos extremos da fibra, o que poderá conseqüentemente provocar ligeiras modificações na estrutura e conseqüentemente na organização da PA 6.6. Além disso, a intensidade do pico a $2\theta=23,1^\circ$ também diminui de 2916 para 2741, o que evidencia que a cecropina-B provoca uma maior separação das folhas/lâminas ligadas por pontes de hidrogénio. Esse decréscimo poderá ser resultado da diminuição do número de ligações de hidrogénio, uma vez que podem ter sido quebradas aquando a ligação do péptido.

Por outro lado, para o péptido Cys-LC-LL-37 verifica-se um ligeiro aumento na intensidade do pico a $2\theta=20,26^\circ$ de 3323 para 3536. Este aumento significa que este péptido interfere menos na organização da fibra e que conseqüentemente aumenta a interação entre as folhas/lâminas da PA 6.6. Este resultado poderá estar relacionado com a reatividade do péptido Cys-LC-LL-37, uma vez que possui no C-terminal um grupo $-OH$ capaz de se ligar às ligações $-NHCO-$ e no N-terminal os grupos $-NH_2$ e/ou $-COOH$ da Cys, capazes de se ligarem aos grupos $-NH_2$ e/ou $-COOH$ existentes nas extremidades da fibra. Assim, uma ligação mais coesa e organizada deste péptido na fibra poderá fazer com que as cadeias se liguem mais fortemente e que conseqüentemente aumente ligeiramente a cristalinidade da PA 6.6. Além disso, quando o péptido Cys-LC-LL-37 se liga à fibra observa-se também uma diminuição na intensidade do pico a $2\theta=23,1^\circ$ de 2916 para 2893. Esta diminuição é menor comparativamente com as outras amostras, no entanto, dever-se-á ao facto do grupo $-OH$ terminal do péptido poder ligar-se às ligações $-NHCO-$. Esta ligação irá então provocar uma ligeira separação das folhas/lâminas ligadas por pontes de hidrogénio.

Assim, neste caso o tamanho dos AMPs não será o fator que mais influencia a absorção e difusão dos AMPs na PA 6.6 pois a diferença de tamanho dos AMPs não é tão significativa (massa molecular da cecropina-B é 3834,7 Da e do Cys-LC-LL-37 4709,7 Da). Neste caso, a diferença nos grupos funcionais e conseqüentemente na reatividade será o fator responsável

por uma melhor absorção e fixação na fibra, que por sua vez irá influenciar, de forma diferente, a cristalinidade da PA 6.6.

Ainda assim, podemos concluir que apesar das ligeiras modificações nos difractogramas, o procedimento aplicado não causou alterações significativas na composição macromolecular da fibra de PA 6.6.

Tabela 4.2.4- Registo das intensidades dos picos a $2\theta=20,26^\circ$ e a $2\theta=23,1^\circ$ da amostra de PA 6.6 não funcionalizada e das amostras de PA 6.6 tratadas durante 1h.

	Intensidade	
	$2\theta=20,26^\circ$	$2\theta=23,1^\circ$
PA 6.6 não funcionalizada	3323	2916
PA 6.6 em água destilada _1h	3202	2736
PA 6.6 funcionalizada com cecropina-B_1h	3213	2741
PA 6.6 funcionalizada com Cys-LC-LL-37_1h	3536	2893

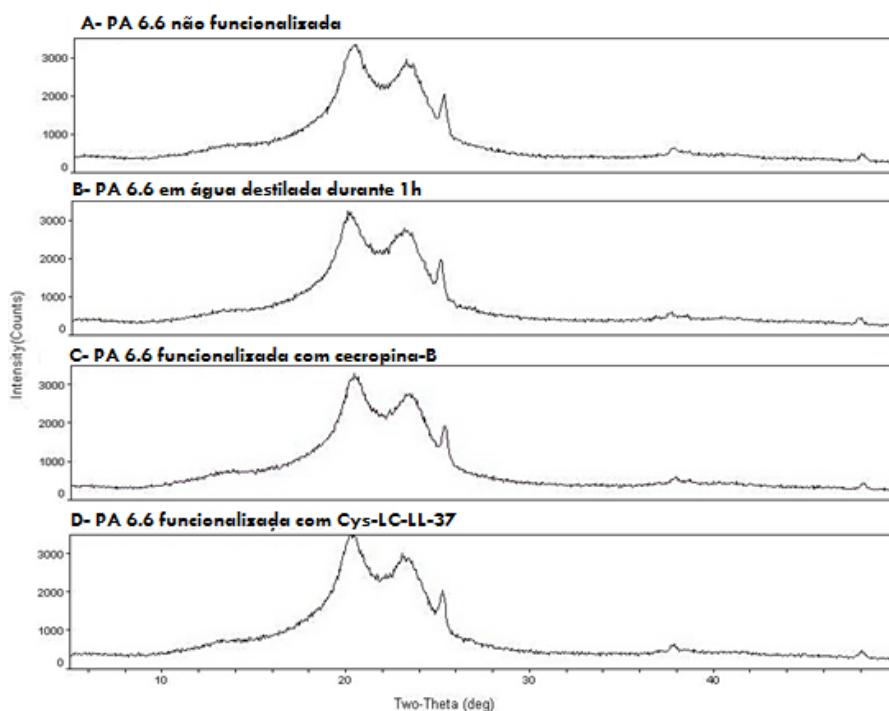


Figura 4.2.2- Espetros de difração de raio-x (DRX) da PA 6.6 tratada durante 1h. A- Espetro da PA 6.6 não funcionalizada; B- PA 6.6 em água destilada durante 1h; C- PA 6.6 funcionalizada com cecropina-B durante 1h; D- PA 6.6 funcionalizada com Cys-LC-LL-37 durante 1h.

4.2.4.2 Microscopia eletrónica de varrimento (SEM)

A microscopia eletrónica de varrimento (SEM) foi utilizada para analisar possíveis modificações na morfologia da superfície da PA 6.6. Analisando as imagens da superfície da fibra de PA 6.6 e da PA 6.6 funcionalizada com os AMPs (cecropina-B e Cys-LC-LL-37) não se

verificam alterações significativas na superfície da fibra, figura 4.2.3. Assim, podemos concluir que a ligação dos AMPs à PA 6.6 não altera nem provoca danos na sua superfície.

Em outro estudo realizado por Xue *et al.* (2010) em que as fibras de PA 6.6 foram revestidas com óxido de zinco (ZnO) a morfologia da fibra de PA 6.6 nativa também mostrou deter uma superfície lisa, o que está de acordo com o obtido no presente estudo [83].

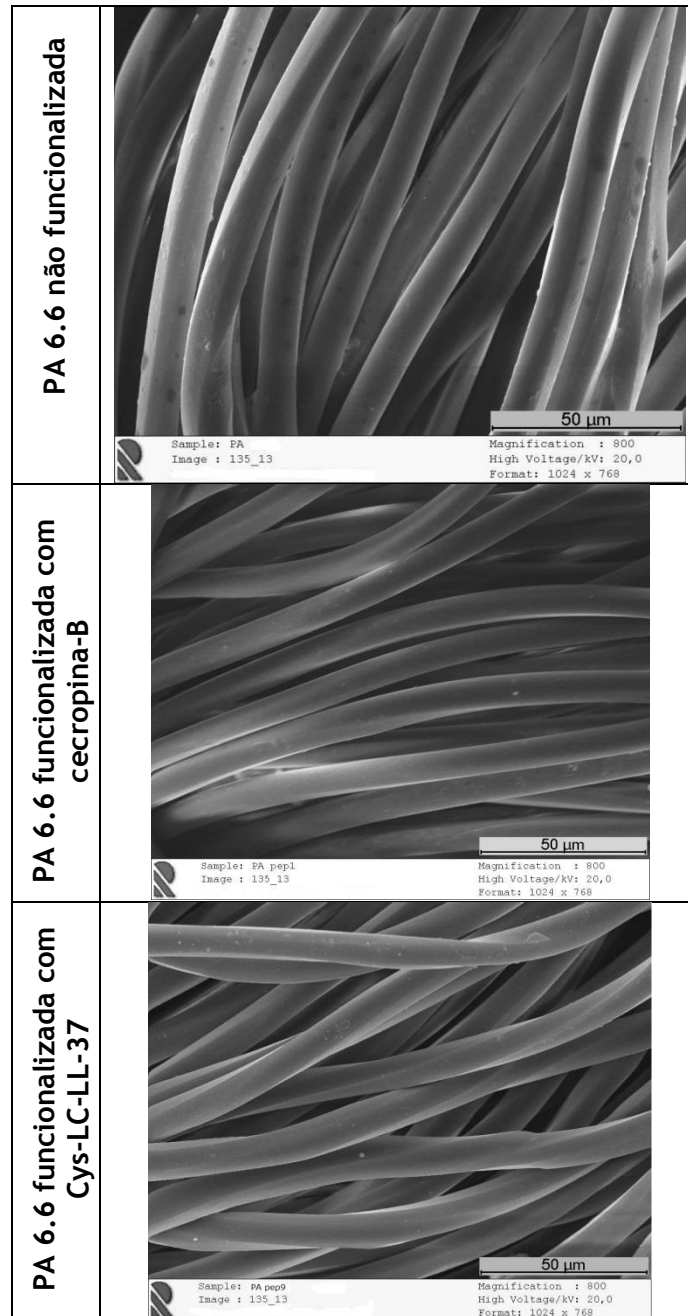


Figura 4.2.3- Imagens de microscopia eletrônica de varrimento (SEM) da PA 6.6 não funcionalizada e das amostras de PA 6.6 funcionalizadas com os AMPs.

4.2.5 Avaliação da atividade antimicrobiana

a) Teste de suspensão

A PA 6.6 funcionalizada com os AMPs mostrou resultados muito positivos na inibição do crescimento bacteriano, como é visível na figura 4.2.4 e tabela 4.2.5.

O ensaio mostrou que para ambas as estirpes 1h é tempo suficiente para inibir o crescimento bacteriano. Observando-se uma redução de crescimento para o *Staphylococcus aureus*, após 24h de contacto com as amostras funcionalizadas, de 68,81% para a cecropina-B e de 73,81% para o Cys-LC-LL-37, em comparação com a amostra de PA 6.6 não funcionalizada. Por outro lado, reduções de crescimento de 85,25% para a cecropina-B e de 87,31% para o Cys-LC-LL-37 foram obtidas para a *Klebsiella pneumoniae*, após 24h de contacto com as amostra funcionalizadas e comparativamente com a amostra de PA 6.6 não funcionalizada. Assim, é possível verificar pelas percentagens de redução bacteriana que para as bactérias em estudo os AMPs exibem um efeito antimicrobiano duradouro nas amostras.

Relativamente aos resultados às 0h, as amostras de PA 6.6 funcionalizadas que contactaram durante alguns minutos com o inóculo apresentaram para o *Staphylococcus aureus* reduções de crescimento de 19,92% para a cecropina-B e de 24,15% para o Cys-LC-LL-37, em comparação com a amostra de PA 6.6 não funcionalizada, enquanto para a *Klebsiella pneumoniae* reduções de crescimento de 26,36% para a cecropina-B e de 38,18% para o Cys-LC-LL-37 foram obtidas comparativamente com a amostra de PA 6.6 não funcionalizada. Assim, apesar da redução do crescimento bacteriano ser mais evidente após 24h de contacto é também visível nos resultados às 0h, em que as amostras funcionalizadas com os AMPs contactaram apenas durante alguns minutos com o inóculo, que existe uma pequena redução no crescimento. Esta observação permite-nos concluir que o efeito antimicrobiano dos AMPs sobre as amostras será quase imediato.

Em relação a um outro estudo realizado por Son *et al.* (2007) em que um corante catiónico designado berberina foi adicionado à PA 6.6 foi possível verificar uma excelente durabilidade da atividade antimicrobiana para este composto. Melhores resultados para a inibição do crescimento bacteriano foram neste caso obtidos, pois percentagens de redução na ordem dos 99,9% foram conseguidas, tanto para o *Staphylococcus aureus* como para a *Klebsiella pneumoniae* [29]. No entanto, apesar da biofuncionalização da PA 6.6 com a berberina ter demonstrado ser muito eficaz pelos resultados obtidos, não significa que os resultados conseguidos no presente estudo não sejam promissores pois as percentagens obtidas para o *Staphylococcus aureus* na ordem dos 68,81% para a cecropina-B e de 73,81% para o Cys-LC-LL-37 foram muito positivas. Bem como as obtidas para a *Klebsiella pneumoniae* de 85,25% para a cecropina-B e de 87,31% para o Cys-LC-LL-37. Assim, os AMPs incorporados nas amostras de PA 6.6 mostraram ser muito eficazes mesmo adicionados em baixas concentrações às amostras (10µg/ml), enquanto no estudo em que a PA 6.6 foi tratada com a berberina 2% *spf* de extrato foi utilizado. Desta forma, uma maior quantidade de

agente antimicrobiano poderá também influenciar a eficácia antimicrobiana e consequentemente aumentar o seu efeito e reduzir o crescimento microbiano [29].

Em outro estudo realizado por Son *et al.* (2003), foram adicionados com sucesso CAQs à PA 6.6, por interação iônica. Os CAQs selecionados apresentaram um efeito antimicrobiano eficaz (~100%) contra a *Escherichia coli* (bactéria gram-negativa) e verificou-se que para uma maior concentração (4 e 6% *spf*) o efeito antimicrobiano dos CAQs foi superior. Além disso, uma melhor ligação dos CAQs na PA 6.6 foi conseguida em condições básicas, pois nessas condições houve uma maior difusão dos sais no polímero. Concluiu-se também que ao lavar repetidamente as amostras a eficácia antimicrobiana se tornou significativamente menor e que o tamanho dos CAQs influenciou a sua ligação na fibra. Assim sendo, a velocidade de difusão de um CAQ de maior tamanho diminui, bem como as interações entre os grupos funcionais e consequentemente o efeito antimicrobiano é menor [81].

Tabela 4.2.5- Resultados do teste quantitativo realizado nas amostras de PA 6.6 funcionalizadas com os AMPs durante 1h.

	<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
	t(h)	CFU/ml	%Redução crescimento	t(h)	CFU/ml	%Redução crescimento
Controlo	0h	5,90E+04	-	0h	2,75E+04	-
	24h	4,20E+08	-	24h	4,00E+08	-
Cecropina-B_1h	0h	4,73E+04	19,92	0h	2,03E+04	26,36
	24h	1,31E+08	68,81	24h	5,90E+07	85,25
Cys-LC-LL-37_1h	0h	4,48E+04	24,15	0h	1,70E+04	38,18
	24h	1,10E+08	73,81	24h	5,08E+07	87,31

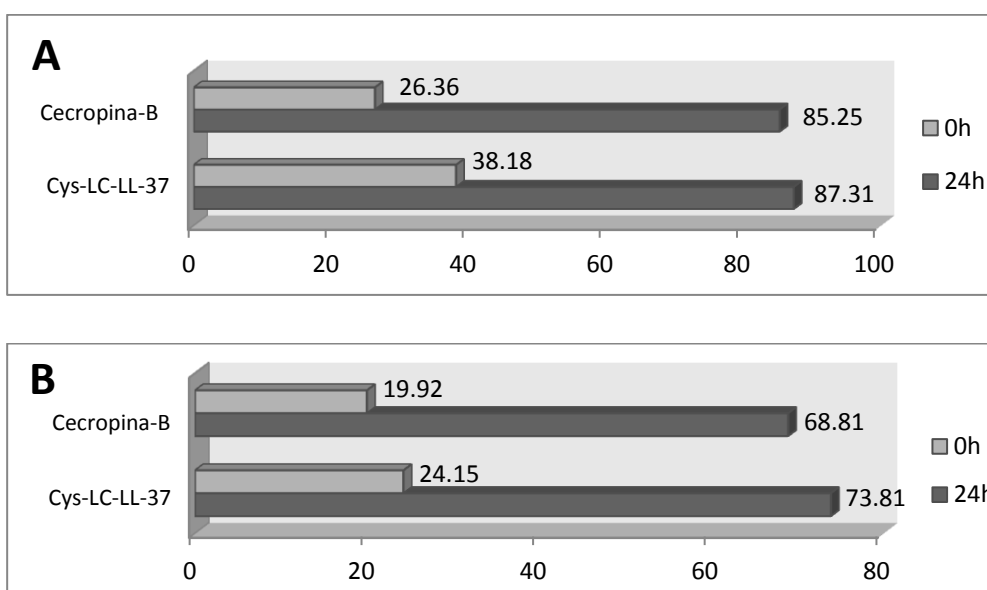


Figura 4.2.4. Resultados obtidos no teste de suspensão: avaliação do efeito antimicrobiano. Representação gráfica das percentagens de redução bacterianas relativas às 0h e 24h para a *Klebsiella pneumoniae* (A) e *Staphylococcus aureus* (B).

A cecropina-B é um péptido rico em resíduos de lisina e assume uma estrutura anfipática em α -hélice. A sua atividade antimicrobiana está estreitamente relacionada com a capacidade de formar α -hélices anfipáticas que facilitam a sua inserção na membrana. Assim, a cecropina-B ao se inserir na membrana provoca alterações na permeabilidade da mesma e consequentemente ocorre a libertação do conteúdo celular e a lise da célula [52, 66, 78].

Por outro lado, o péptido sintético Cys-LC-LL-37, pertencente à família das CAMPs é um péptido anfipático α -helicoidal. Este péptido foi sintetizado como um péptido único pois reúne duas regiões muito reativas, formadas pela Cys e pelo péptido LL-37. Assim, a atividade antimicrobiana deste péptido é resultado da interação de um aminoácido e de um péptido natural, com atividade antimicrobiana anteriormente conhecida. E desta forma, esta união visou aumentar a atividade antimicrobiana, o que pode ser a explicação para terem sido obtidas percentagens de redução bacterianas maiores para este péptido [46, 47, 68, 69].

No entanto, apesar do péptido sintético Cys-LC-LL-37 ser manifestamente mais ativo, o que foi comprovado pelas mais elevadas percentagens de redução, a cecropina-B também apresentou boa atividade antimicrobiana para as bactérias em estudo. Assim, a escolha por um dos AMPs depende da aplicação pretendida, pois cada um possui funcionalidades distintas. A cecropina-B é essencial para a resposta imune inata sendo eficaz na eliminação de agentes patogénicos. Pode afetar a célula hospedeira de forma a promover a reparação de feridas e apresenta atividade anti-viral e anti-fúngica conhecida. Por outro lado, o péptido Cys-LC-LL-37 possui um amplo espectro de atividade. Desempenha um papel importante na primeira linha de defesa contra infeções locais e agentes invasores potencialmente patogénicos, em locais de inflamação e em feridas. É significativamente resistente à degradação proteolítica em solução e além de apresentar atividade antimicrobiana demonstrou desempenhar um papel importante na quimiotaxia, na diferenciação de células dendríticas, na desgranulação dos mastócitos, na secreção de citocinas, na estimulação da angiogénese e na cicatrização de feridas [47, 52, 66, 68].

4.2.6 Citotoxicidade

A figura 4.2.5 apresenta os resultados obtidos pelo teste do MTT para a avaliação dos efeitos citotóxicos dos AMPs nos fibroblastos. Para isso, para cada concentração de AMP utilizada, foram calculadas as percentagens de viabilidade celular, por comparação com os resultados obtidos para as células não tratadas com os AMPs (controlo), tabela 4.2.6.

Pelos resultados obtidos para a cecropina-B é visível um aumento de 1,6% e 0,7% na viabilidade celular, quando os fibroblastos contactaram com a cecropina-B a concentrações de 4,06 μ g/ml e 10 μ g/ml, respetivamente. Contrariamente para a concentração de 1,44 μ g/ml uma diminuição de 3,3% na viabilidade celular foi verificada, comparativamente com o controlo.

Por outro lado, para o Cys-LC-LL-37 observa-se um decréscimo de 0,2% e 0,5% na viabilidade dos fibroblastos para as concentrações de 5,00µg/ml e 10,00µg/ml, enquanto para a concentração de 2,00µg/ml um aumento de 10% na viabilidade celular, comparativamente com o controlo, é observado.

Assim, uma vez que para ambos os AMPs não se verificaram alterações superiores a 30%, podemos concluir que nas condições testadas os AMPs são considerados seguro, pois não apresentaram efeitos citotóxicos, e desta forma podem ser utilizados em contacto com a pele sem causar qualquer reação cutânea [47].

De acordo com um estudo anterior realizado por Suttman *et al.* (2008), verificou-se pelo teste da LDH que a cecropina-B exerce citotoxicidade significativa para células cancerosas da bexiga, no entanto, não afecta fibroblastos benignos [84].

Por outro lado, num estudo realizado por Huang *et al.* (2006) o péptido LL-37 quando utilizado a baixas concentrações ($\leq 10\mu\text{g/ml}$) também não mostrou nenhum efeito tóxico para células epiteliais da córnea humana (HCEC). No entanto, quando testado a concentrações mais elevadas ($>10\mu\text{g/ml}$) tornou-se citotóxico para HCECs [85].

Tabela 4.2.6- Resultados do teste de citotoxicidade (MTT).

	Controlo	Cecropina-B		
		1,44 µg/ml	4,06 µg/ml	10,00 µg/ml
Média	0,224000	0,216667	0,227667	0,225667
% Viabilidade celular	100	96,726	101,637	100,744
	Controlo	Cys-LC-LL-37		
		2,00 µg/ml	5,00 µg/ml	10,00 µg/ml
Média	0,182667	0,201667	0,182334	0,181667
% Viabilidade celular	100	110,401	99,817	99,452

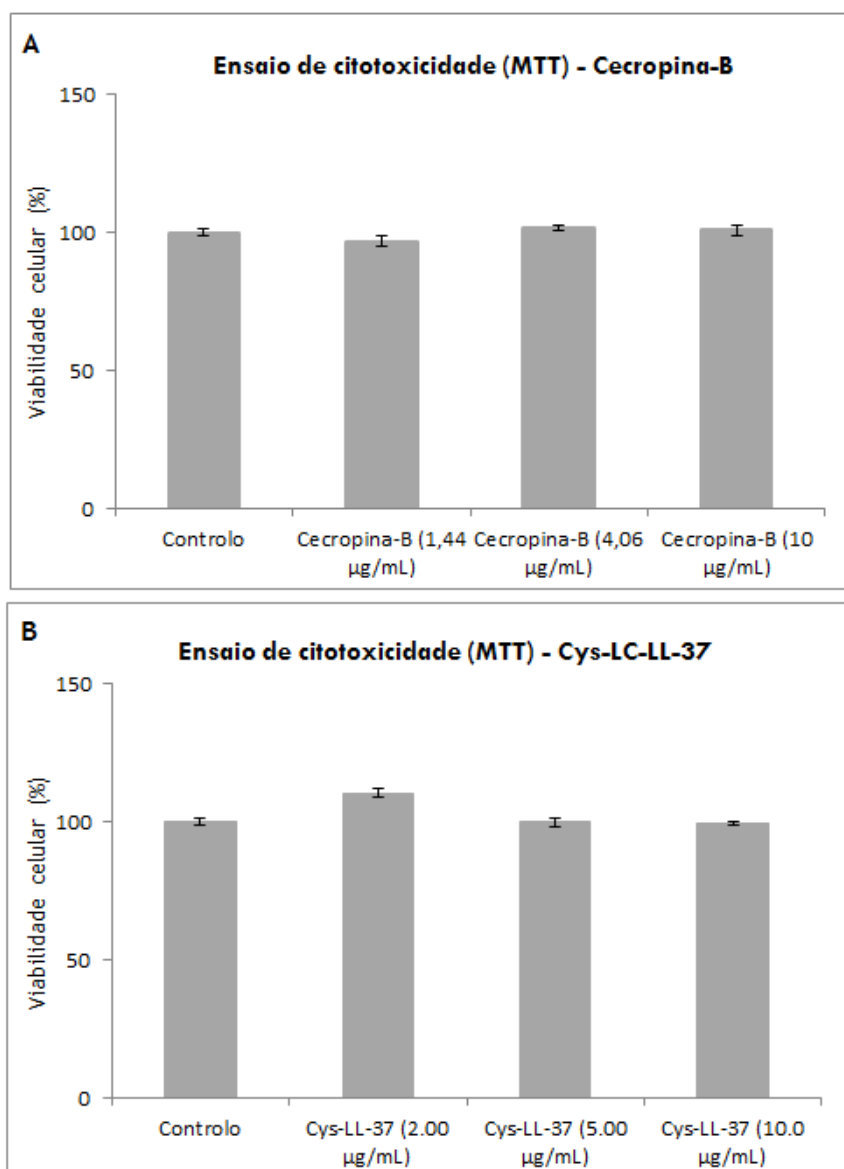


Figura 4.2.5- Resultados obtidos no teste de citotoxicidade (MTT). Percentagens de fibroblastos viáveis quando em contacto com as diferentes concentrações de cecropina-B (A); Percentagens de fibroblastos viáveis quando em contacto com as diferentes concentrações de Cys-LC-LL-37 (B).

4.3 Comparação da eficácia da biofuncionalização antibacteriana da lã e da PA 6.6 com os AMPs

Os materiais têxteis, especialmente de origem natural, como a lã, proporcionam um excelente ambiente para o crescimento de microrganismos, devido à sua ampla área de superfície e à capacidade de reter humidade. No caso da fibra proteica de lã, em determinadas condições, a queratina pode também atuar como fonte de nutrientes e energia para o crescimento de microrganismos. No entanto, materiais de origem sintética, como a PA 6.6, devido à sua hidrofobicidade, são menos suscetíveis ao ataque de microrganismos, contudo não são totalmente imunes ao seu crescimento. Além disso, possuem menos locais reativos e são bastante resistentes a processos de modificação química, incluindo a acabamentos antimicrobianos [34].

Notavelmente, pelos valores de K/S obtidos é visível que uma maior quantidade de péptido foi ligada na superfície da fibra de lã comparativamente com a PA 6.6. Este resultado está em conformidade com o esperado pois a fibra de PA 6.6 é mais resistente a processos de acabamento antimicrobiano, face à sua cristalinidade. No entanto, o efeito antibacteriano testado nas amostras de lã e PA 6.6 funcionalizadas, com aplicação sobre o *Staphylococcus aureus* e a *Klebsiella pneumoniae*, foi semelhante, como foi observado pelas percentagens de redução obtidas.

Capítulo 5

Conclusão

Neste trabalho, os AMPs foram pela primeira vez utilizados, como agentes bioativos, na biofuncionalização de materiais têxteis de origem natural e sintética.

Como previsto, a biofuncionalização da lã e da PA 6.6 com os AMPs, executada pelo método de esgotamento, foi eficaz, o que foi demonstrado pelo teste do reagente de Bradford em solução e na amostra.

Os resultados obtidos mostraram também que as amostras funcionalizadas com os AMPs possuem ação antimicrobiana duradoura. Este resultado é extremamente vantajoso pois um novo acabamento antibacteriano duradouro foi realizado com sucesso e desta forma é uma alternativa ecológica aos agentes antimicrobianos utilizados nos últimos anos, para o mesmo efeito.

Além disso, é de evidenciar que os AMPs não modificaram nem danificaram a superfície das fibras. Esses resultados foram obtidos por DRX, em que possíveis alterações nas características estruturais da lã e da PA 6.6 foram analisadas. Todavia, a morfologia da superfície das fibras foi também visualizada por SEM. As imagens obtidas comprovaram que a ligação dos AMPs às fibras não alterou nem provocou danos na sua superfície.

Por fim, a avaliação da citotoxicidade dos AMPs demonstrou que estes não são tóxicos nas condições testadas e que o risco de irritação quando usados em contacto com a pele é ínfimo.

Assim, pelos resultados, sugere-se que os AMPs são promissores candidatos para a biofuncionalização de materiais têxteis, uma vez que o processo de acabamento antibacteriano utilizado foi realizado com sucesso.

Nos últimos anos, uma atenção especial tem sido dada à utilização de AMPs. Esta atenção especial deve-se ao facto da resistência microbiana aos antibióticos convencionais aumentar a um ritmo alarmante. Portanto, espera-se que os AMPs se tornem no futuro a escolha para combater infeções bacterianas e que sejam uma estratégia para funcionalizar materiais têxteis, de forma a poderem conferir aos materiais atividade antimicrobiana eficaz contra um amplo espectro de microrganismos e abrir novas perspectivas, especialmente na área da saúde.

5.1 Perspetivas futuras

A fim de aperfeiçoar os resultados apresentados neste trabalho, seria importante otimizar o processo de biofuncionalização antimicrobiano. Para isso poderia recorrer-se a um desenho experimental onde se fizesse variar de forma independente os parâmetros que influenciam a absorção dos AMPs pelas fibras. Entre esses fatores destaca-se o pH do banho de incubação, a concentração de AMP, o tempo e a temperatura de incubação.

Seria também pertinente estudar o mecanismo de ação dos AMPs sobre as estirpes selecionadas, utilizando a técnica de citometria de fluxo. Deste modo, seria possível quantificar o estado fisiológico das células através do uso de diversos fluorocromos.

Porém, os testes de avaliação antimicrobiana não são suficientes para que os materiais têxteis funcionalizados com os AMPs sejam comercializados, pois não garantem segurança para o utilizador e conseqüentemente para o ambiente. Desta forma, seria importante concluir os testes de citotoxicidade. Para isso era necessário analisar a biocompatibilidade *in vitro* dos restantes AMPs incorporados nos têxteis e posteriormente, realizarem-se testes *in vivo* para que numa etapa final se averigua-se as possíveis aplicações dos materiais têxteis funcionalizados com os AMPs na área da saúde e higiene.

Capítulo 6

Referências

- [1] Neves JSMF (1982) *Tecnologia Têxtil - Matérias-primas Têxteis*. Porto.
- [2] Gouveia IC (2010) Nanobiotechnology: A new strategy to develop non-toxic antimicrobial textiles. *Formatex*.
- [3] Coman D, Oancea S, Vrîceanu N (2010) Biofunctionalization of textile materials by antimicrobial treatments: a critical overview. *Rom Biotechnol Lett* 15(1):4913-4921.
- [4] Fouda MMG, Abdel-Halim ES, Al-Deyab SS (2013) Antibacterial modification of cotton using nanotechnology. *Carbohydr Polym* 92:943-954.
- [5] MacGregor EA (2002) Biopolymers. In *Encyclopedia of Physical Science and Technology*. Third Edition, Academic Press, pp 207-215.
- [6] Niu M, Liua X, Daia J, Houa W, Xua B (2012) UV-induced grafting of organic-inorganic antibacterial membrane on wool fiber. *Pro Org Coat* 74:622-628.
- [7] Wojciechowska E, Wlochowicz A, Weselucha-Birczynska (1999) Application of Fourier-transform infrared and Raman spectroscopy to study degradation of the wool fiber keratin. *J Mol Struct* 511-512:307-318.
- [8] Ibrahim NA, Abdalla WA, El-Zairy EMR, Khalil HM (2013) Utilization of monochloro-triazine β -cyclodextrin for enhancing printability and functionality of wool. *Carbohydr Polym* 92:1520-1529.
- [9] Fan J, Yu W (2012) High Yield Preparation of Keratin Powder from Wool Fiber. *Fibers Polym* 13:1044-1049.
- [10] Aluigi A, Vineis C, Ceria A, Tonin C (2008) Composite biomaterials from fibre wastes: Characterization of wool-cellulose acetate blends. *Composites Part A* 39:126-132.
- [11] WRONZ (2001) *Wool fibre structure and function (Module 1)*. Introduction to wool and the wool industry. Lincoln, New Zealand.
- [12] Lewis M (2007) *Handbook of Fiber Chemistry*. Third Edition, CRC Press Taylor & Francis Group.
- [13] Meade SJ, Dyer JM, Caldwell JP, Bryson WG (2008) Covalent modification of the wool fiber surface: Removal of the outer lipid layer. *Textile Research Journal* 78(11):943-957.
- [14] Silva CJSM, Prabakaran M, Gübitz, Cavaco-Paulo A (2005) Treatment of wool fibres with subtilisin and subtilisin-PEG. *Enzyme Microb Technol* 36:917-922.
- [15] Amino Acids, Peptides, and Proteins. Chapter five.
- [16] Zahn H, Wortmann F, Wortmann G, Schäfer K, Hoffmann R, Finch R (2005) *Wool*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- [17] Trotman ER (1984) *Dyeing and chemical technology of textile fibres*. Sixth Edition, Oxford verbatim limited, London.
- [18] Cammack R, Attwood TK, Campbell PN, Parish JH, Smith AD, Stirling JL, Vella F (2006) *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology*. Second Edition.

- [19] Wojciechowska E, Wl/ochowicz A, Wesel/ucha-Birczyn'ska A (1999) Application of Fourier-transform infrared and Raman spectroscopy to study degradation of the wool fiber keratin. *J Mol Struct* 511-512:307-318.
- [20] Feughelman M, Danilatos G (1980) The Microfibril Matrix Relationships in the Mechanical Properties of Keratin Fibres. *Textile Res J* 50: 568-574.
- [21] Cao J (2000) Is the α -B transition of keratin a transition of α -helices to β -pleated sheets. Part I. In situ XRD studies. *J Mol Struct* 553:101-107.
- [22] Cao J (2002) Is the α -B transition of keratin a transition of α -helices to β -pleated sheets. II. Synchrotron investigation for stretched single specimens. *J Mol Struct* 607:69-75.
- [23] Chavarria F, Paul DR (2004) Comparison of nanocomposites based on nylon 6 and nylon 66. *Polym J* 45:8501-8515.
- [24] Silva C, Araújo R, Casal M, Güvitz GM, Cavaco-Paulo A (2007) Influence of mechanical agitation on cutinases and protease activity towards polyamide substrates. *Enzyme Microb Technol* 40:1678-1685.
- [25] Silva C (2002) Tratamento Alcalino e Enzimático de Fibras Sintéticas. Dissertação de Mestrado. Universidade do Minho.
- [26] Disponível em: <http://wpage.unina.it/avitabil/testi/Nylon.pdf>. Acedido em 26 de setembro de 2013.
- [27] Oliveira FR (2009) Tingimento da poliamida 6.6 com corantes ácidos, reactivos e directos após modificação superficial com descarga plasmática de Dupla Barreira Dielétrica (DBD). Dissertação de Mestrado. Universidade do Minho.
- [28] Chang H, Chen S, Lin D, Cheng L (2013) Preparation of bi-continuous Nylon-66 porous membranes by coagulation of incipient dopes in soft non-solvent baths. *Desalination* 313:77-86.
- [29] Son Y, Kim B, Ravikumar K, Kim T (2007) Berberine Finishing for Developing Antimicrobial Nylon 66 Fibers: % Exhaustion, Colorimetric Analysis, Antimicrobial Study, and Empirical Modeling. *J Appl Polym Sci* 103:1175-1182.
- [30] Peacock AJ, Calhoun A (2006) Nylons. *Polymer Chemistry: Properties and Applications*. Hanser, pp 339-352.
- [31] Bates PJ, Wang CY (2003) The Effect of Sample Preparation on the Mechanical Properties of Nylon 66. *Polym Eng Sci* 43(4):759-773.
- [32] Disponível em: http://www.joinville.udesc.br/portal/professores/daniela/materiais/aula_10___polimeros.pdf. Acedido em 26 de setembro de 2013.
- [33] Ristić T, Zemljič LF, Novak M, Kunčič MK, Sonjak S, Cimerman NG, Strnad S (2011) Antimicrobial efficiency of functionalized cellulose fibres as potential medical textiles. *Formatex*.
- [34] Gao Y, Cranston R (2008) Recent Advances in Antimicrobial Treatments of Textiles. *Text Res J* 78(1):60-72.
- [35] Ramachandran T, Rajendrakumar K, Rajendran R (2004) Antimicrobial Textiles - an Overview. *IE (I) J-TX* 84:42-47.
- [36] Windler L, Height M, Nowack B (2013) Comparative evaluation of antimicrobials for textile applications. *Int J Environ* 53:62-73.

- [37] Ren X, Kocer HB, Worley SD, Broughton RM, Huang TS (2009) Rechargeable biocidal cellulose: Synthesis and application of 3-(2,3-dihydroxypropyl)-5,5-dimethylimidazolidine-2,4-dione. *Carbohydr Polym* 75:683-687.
- [38] Gao Y, Yu X, Pierlot AP, Denning RJ, Cranston R (2011) A simultaneous antimicrobial and shrink resistance treatment of wool woven fabrics using the polymeric biocide polyhexamethylene biguanide. *J Mater Sci* 46:3020-3026.
- [39] Lin J, Winkelaman C, Worley SD, Broughton RM, Williams JF (2001) Antimicrobial Treatment of Nylon. *J Appl Polym Sci* 81:943-947.
- [40] Perkas N, Amirian G, Dubinsky S, Gazit S, Gedanken A (2007) Ultrasound-Assisted Coating of Nylon 6,6 with Silver Nanoparticles and Its Antibacterial Activity. *J Appl Polym Sci* 104:1423-1430.
- [41] Tang B, Wang J, Xu S, Afrin T, Tao J, Xu W, Su L, Wang X (2012) Function improvement of wool fabric based on surface assembly of silica and silver nanoparticles. *Chem Eng J* 185-186:366-373.
- [42] Demir A, Arik B, Ozdogan E, Seventekin N (2010) A New Application Method of Chitosan for Improved Antimicrobial Activity on Wool Fabrics Pretreated by Different Ways. *Fiber Polym* 11(3):351-356.
- [43] Tseng H, Hsu S, Wu M, Hsueh T, Tu P (2009) Nylon Textiles Grafted with Chitosan by Open Air Plasma and Their Antimicrobial Effect. *Fiber Polym* 10(1):53-59.
- [44] Giri VRD, Venugopal J, Sudha S, Deepika G, Ramakrishna S (2009) Dyeing and antimicrobial characteristics of chitosan treated wool fabrics with henna dye. *Carbohydr Polym* 75:646-650.
- [45] Singh R, Jain A, Panwar S, Gupta D, Khare SK (2005) Antimicrobial activity of some natural dyes. *Dyes Pigments* 66:99-102.
- [46] Kraaij CV, Breukink E, Rollema HS, Bongers RS, Kosters HA, Kruijff B, Kuipers OP (2000) Engineering a disulfide bond and free thiols in the lantibiotic nisin Z. *Eur. J. Biochem.* 267:901-909.
- [47] Gouveia IC, Sá D, Henriques M (2012) Functionalization of Wool with L-Cysteine: Process Characterization and Assessment of Antimicrobial Activity and Cytotoxicity. *J Appl Polym Sci* 124:1352-1358.
- [48] Stathopoulos P, Papas S, Pappas C, Mousis V, Sayyad N, Theodorou V, Tzakos AG, Tsikaris V (2013) Side reactions in the SPPS of Cys-containing peptides. *Amino Acids* 44:1357-1363.
- [49] López-Meza JE, Ochoa-Zarzosa A, Aguilar JA, Loeza-Lara PD (2011) Antimicrobial Peptides: Diversity and Perspectives for Their Biomedical Application. In *Biomedical Engineering, Trends, Research and Technologies*. Chapter twelve.
- [50] Koczulla AR, Bals R (2003) Antimicrobial Peptides: Current Status and Therapeutic Potential. *Drugs* 63(4):389-406.
- [51] Brogden NK, Brogden KA (2011) Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals? *Int J Antimicrob Agents* 38(3):217-225.
- [52] Li Y, Xiang Q, Zhang Q, Huang Y, Su Z (2012) Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides* 37:207-215.
- [53] Hancock REW (2001) Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Infect Dis* 1:156-164.

- [54] Brender JR, McHenry JA, Ramamoorthy A (2012) Does cholesterol play a role in the bacterial selectivity of antimicrobial peptides? *Front Immunol* 3:195.
- [55] Brogden KA (2005) ANTIMICROBIAL PEPTIDES: PORE FORMERS OR METABOLIC INHIBITORS IN BACTERIA? *Nat Rev* 3:238-250.
- [56] Wiradharma N, Khoe U, Hauser CAE, Seow SV, Zhang S (2011) Synthetic cationic amphiphilic α -helical peptides as antimicrobial agents. *Biomaterials* 32:2204-2212.
- [57] Teixeira V, Feio MJ, Bastos M (2012) Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Prog Lipid Res* 51:149-177.
- [58] Laverty G, Gorman SP, Gilmore BF (2011) The Potential of Antimicrobial Peptides as Biocides. *Int J Mol Sci* 12:6566-6596.
- [59] Wolf M, Moser B (2012) Antimicrobial activities of chemokines: not just a side-effect? *Front Immunol* 3:213.
- [60] Ganz T (2003) Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 3:710-720.
- [61] Disponível em: <https://www2.bc.edu/jianmin-gao/rsh.html>. Acedido em 26 de setembro de 2013.
- [62] Melo MN, Ferre R, Castanho MARB (2009) Antimicrobial peptides: linking partition, activity and high membrane-bound concentrations. *Nat Rev Microbiol* 7:245-250.
- [63] Chen L, Gao L, Fang W, Golubovic L (2012) How the Antimicrobial Peptides Kill Bacteria: Computational Physics Insights. *Commun Comput Phys* 11(3):709-725.
- [64] Parachin NS, Mulder KC, Viana AAB, Dias SC, Franco OL (2012) Expression systems for heterologous production of antimicrobial peptides. *Peptides* 38:446-456.
- [65] Kent SBH (1988) CHEMICAL SYNTHESIS OF PEPTIDES AND PROTEINS. *Ann Rev Biochem* 57:957-989.
- [66] Chia T, Wu Y, Chen J, Chi S (2010) Antimicrobial peptides (AMP) with antiviral activity against fish nodavirus. *Fish Shellfish Immun* 28:434-439.
- [67] Schibli DJ, Ngyen LT, Kernaghan SD, Rekdal Ø, Vogel HJ (2006) Structure-Function Analysis of Triterpticin Analogs: Potential Relationships between Antimicrobial Activities, Model Membrane Interactions, and Their Micelle-Bound NMR Structures. *Biophys J* 91:4413-4426.
- [68] Pazgier M, Ericksen B, Ling M, Toth E, Shi J, Li X, Galliher-Beckley A, Lan L, Zou G, Zhan C, Yuan W, Pozharski E, Lu W (2013) Structural and Functional Analysis of the Pro-Domain of Human Cathelicidin, LL-37. *Biochem J* 52:1547-1558.
- [69] Wiradharma N, Khan M, Yong L, Hauser CAE, Seow SV, Zhang S, Yang Y (2011) The effect of thiol functional group incorporation into cationic helical peptides on antimicrobial activities and spectra. *Biomaterials* 32:9100-9108.
- [70] Bradford MM (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- [71] Hu H, Wang C, Guo X, Li W, Wang Y, He Q (2013) Broad Activity against Porcine Bacterial Pathogens Displayed by Two Insect Antimicrobial Peptides Moricin and Cecropin B. *Mol Cells* 35:106-114.
- [72] Ibrahim NA, Khalil HM, El-Zairy EMR, Abdalla WA (2013) Smart options for simultaneous functionalization and pigment coloration of cellulosic/wool blends. *Carbohydr Polym* 96:200-210.

- [73] Wang Q, Fan X, Hu Y, Yuan J, Cui L, Wang P (2009) Antibacterial functionalization of wool fabric via immobilizing lysozymes. *Bioprocess Biosyst Eng* 32:633-639.
- [74] Monier M, El-Sokkary AMA, Sarhan AA (2010) Immobilization of *Candida rugosa* lipase on modified natural wool fibers. *React Funct Polym* 70:122-128.
- [75] Chang J, Zhong Z, Xu H (2012) Multifunctional wool fiber treated with ϵ -polylysine. *J Chem Eng* 29(4):507-512.
- [76] Monier M, Ayad DM, Sarhan AA (2010) Adsorption of Cu(II), Hg(II), and Ni(II) ions by modified natural wool chelating fibers. *J Hazard M* 176:348-355.
- [77] Eslahi N, Dadashian F, Nejad NH (2013) Optimization of enzymatic hydrolysis of wool fibers for nanoparticles production using response surface methodology. *Adv Powder Technol* 24:416-426.
- [78] Jacobi V, Plourde A, Charest PJ, Hamelin RC (2000) In vitro toxicity of natural and designed peptides to tree pathogens and pollen. *Can J Bot* 78:455-461.
- [79] Krahulec J, Hyřšová M, Pepeliaev S, Jílková J, Černý Z, Machálková J (2010) High level expression and purification of antimicrobial human cathelicidin LL-37 in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 88:167-175.
- [80] Caldeira E (2012) Biofuncionalização do algodão com L-Cisteína: estudo do efeito antibacteriano e dos mecanismos de acção contra *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*. Dissertação de Mestrado. Universidade da Beira Interior.
- [81] Son Y, Sun G (2003) Durable Antimicrobial Nylon 66 Fabrics: Ionic Interactions with Quaternary Ammonium Salts. *J Appl Polym Sci* 90:2194-2199.
- [82] Wang H, Shi T, Yang S, Zhai L, Hang G (2006) Crystallization Behavior of PA66/SiO₂ Organic-Inorganic Hybrid Material. *J Appl Polym Sci* 101:810-817.
- [83] Xue C, Wang R, Zhang J, Jia S, Tian L (2010) Growth of ZnO nanorod forests and characterization of ZnO-coated nylon fibers. *Mater Lett* 64:327-330.
- [84] Suttman H, Retz M, Paulsen F, Harder J, Zwergel U, Kamradt J, Wullich B, Unteregger G, Stöckle M, Lehmann J (2008) Antimicrobial peptides of the Cecropin-family show potent antitumor activity against bladder cancer cells. *BMC Urol* 8:5.
- [85] Huang LC, Petkova TD, Reins RY, Proske RJ, McDermott AM (2006) Multifunctional Roles of Human Cathelicidin (LL-37) at the Ocular Surface. *IOVS* 47(6):2369-2380.

Anexos

Anexo I - Artigo submetido: “Novel antimicrobial functionalization process for proteinaceous fibers: Assessment of the effect of cecropin B and [Ala5]-Tritrp7 antimicrobial peptides”.

Novel antimicrobial functionalization process for proteinaceous fibers: Assessment of the effect of cecropin B and [Ala5]-Tritrp7 antimicrobial peptides

Cláudia Mouro¹, Ana P. Gomes¹, Marta Pedrosa², Frederico Nogueira², Isabel C. Gouveia¹

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

² CICS-UBI - Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior (Portugal)

Corresponding author: Isabel C. 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

Keywords: antimicrobial-textiles, antimicrobial-peptides, antimicrobial-agents

ABSTRACT

The use of antimicrobial textiles can significantly reduce the risk of infections. Consequently, a new strategy of using antimicrobial peptides (AMPs) as bioactive agents for the functionalization of textile materials is here described. Cecropin-B and [Ala5]-Tritrp7 AMPs were selected and used in the treatment of wool to give antimicrobial properties. The peptide uptake was determined using the colorimetric assay of Bradford reagent and possible changes in the structural characteristics of the wool were analyzed by X-Ray Diffraction (XRD). Results show that 1h is long enough for the functionalization to occur effectively and that the macromolecular composition of the wool fibers was not influenced by the functionalization process. Moreover, the results for the antimicrobial activity showed that both peptides have a high reduction in bacterial growth being 71.67% for Cecropin-B and 66.74% for [Ala]-Tritrp7, against *Staphylococcus aureus* and 85.95% for Cecropin-B and 88.65% for [Ala]-Tritrp7, against *Klebsiella pneumoniae*.

1. INTRODUCTION

Wool is a natural protein fiber that has been widely used as a high quality textile material. Being lighter, warmer, softer and smoother than other fibers. However, natural wool fiber is not antibacterial and is an excellent substrate for the growth of microorganisms.¹ In addition, under especial conditions of using wool-based materials as for example for geriatric and pediatric applications, in a clinical setting, wool is also a host for the generation and propagation of microorganisms, resulting in fiber damages or even skin irritations.²

Several methods have been developed to give antimicrobial properties to wool. With this aim, many different compounds have been applied in the wool in recent years. Among those compounds, the synthetic organic such as triclosan, quaternary ammonium compounds, polybiguanides, N-halamines; as well as the metals such as silver and those of naturally derived such as chitosan have been the most studied and applied.³ However, antimicrobials for textiles need to fulfill many different criteria including efficacy against a wide range of microorganisms, suitability for textile processing, durability, and a favorable safety and environmental profile.³ To minimize some disadvantages, new and better antimicrobials have been developed. For this purpose a new strategy foresees the use of antimicrobial peptides (AMP) as potential bioactive agents for the functionalization of textile materials. AMPs are an abundant and diverse group of molecules that are produced by many tissues and cell types in a variety of invertebrate, plant and animal species.⁴ These molecules usually display a broad spectrum of activity against pathogenic bacteria and fungi and often, their killing activities extend to enveloped viruses, parasites and sometimes even to cancerous cells.⁵

AMPs are good candidates because they act without high specificity toward a protein target, which reduces the likelihood of induced resistance.⁶ Thus, the potential of AMPs

appear as a solution for the development of microbial resistance's occurring due to overuse of antibiotics.⁷

In this work, Cecropin-B, a natural antimicrobial peptide and [Ala5]-Tritrp7 a synthetic antimicrobial peptides were selected and used in the treatment and production of wool with antimicrobial properties.

Cecropin-B is an inducible antibacterial peptide that is found in the hemolymph of the pupae of *H. cecropia*. Mature cecropin peptides lack cysteine residues, are 35-39 amino acids in length and form α -helices which integrate into the acidic cell membranes of bacteria leading to their disruption.⁸

On the other hand, [Ala5]-Tritrp7 is a synthetic peptide that results of replacing of the first Pro at position 5 in tritripticin by Ala (Tritrp7). The substitution of Pro-5 to Ala in Tritrp7 results in a greater ability to form amphipathic α -helices. Thus, the helical structure of the peptide is key to membrane disruption.⁹

Therefore the aim of this investigation was to assess the ability of the selected antimicrobial peptides bind onto wool fibers through ionic interaction. To authors knowledge this is the first report on the novel strategy of using AMPs as potential antimicrobial agents for textiles. Moreover, surface modifications were characterized by X-ray diffraction (XRD) and the antimicrobial activity tested against *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae* was here reported, along with the evaluation of the minimal inhibitory concentration (MIC).

2. EXPERIMENTAL

2.1 Textile material

The textile substrate used in this work was a 100% Wool fabric. The wool was washed in an alkaline bath pH=8.5 (2g/L Na₂CO₃) for 30 minutes at 60°C with the nonionic detergent Nekanil 907 (0.3g/L), which has a good wetting effect. After prewashing, the wool was rinsed with distilled water and placed to dry at room temperature. The washing process is recommended to remove any residue of chemicals commonly used in the finishing of wool, so that false positives can be avoided in relation to antimicrobial activity. Furthermore washing also eliminates any fat that may still be present in the fiber itself and thereby improve its hydrophilicity/ wettability.

2.2 Peptides

Sequences of the peptides used are shown in Table 1. The lots containing lyophilized powder of Cecropin-B (AnaSpec) and [Ala5]-Tritrp7 (AnaSpec) were stored at -20°C. When the peptide solution was prepared the content present in the lots (1mg) was dissolved in 1mL of sterile water and a stock solution of peptide of 10 μ g/mL was prepared.

2.3 Determination of minimal inhibitory concentration (MIC)

By definition MIC is the lowest concentration of antimicrobial agent that prevents the visible growth of a microorganism on susceptibility testing. This value can be determined by broth or agar dilution. For this work, the MIC values were determined by a broth microdilution test in 96-well plates according to the M07-A6 protocol of the CLSI for bacterial strains *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) and *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352). Initially, the inoculum was prepared, using a direct suspension in sterile water from selected colonies of an agar plate with 18-24h. The suspension was adjusted according to the protocol and a suspension of final concentration $1-2 \times 10^5$ CFU/mL was prepared. For this 10 μ L of bacterial suspension, 990 μ L of Mueller Hinton Broth (MHB) (LiofilChem) were added. After the preparation of the bacterial suspension, a solution of peptide of the initial concentration 10 μ g/mL was used as starting point to perform the successive volumetric dilutions in a ratio of 1:2. To each well of the microdilution plate, 50 μ L of the work suspension was added with 50 μ L solution of peptide in different dilutions. Inoculated microdilution plate was incubated at 35°C for 16-20 hours.

2.4 Functionalization Process

The incorporation of AMPs in the wool was performed using the exhaustion method. This method consists of immersing the textile material in a given incubation bath, during the time and temperature required to achieve the called "exhaustion" effect of the bath. In this step, the textile samples were incubated, varying the functionalization time. The variation of this parameter aimed at assessing their influence on the diffusion and attachment of peptide reactive sites in the fibers. The process of functionalization was conducted in a laboratory dyeing machine, Datacolor AHIBA IR. In this period, the wool samples were dipped in a solution containing 3 mL incubation solution of Cecropin-B and [Ala5] Tritrp7 (10 μ g/mL), a concentration above the MIC value for each strain and peptide in order to ensure the antimicrobial effect, and they were placed in tubes suitable for the equipment, properly identified. After placing the tubes on the machine the incubation was programmed for a period of time of 1h, 2h and 3h at a temperature of 40°C with constant stirring of 15rpm. 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 the AMPs prior to further investigation and assessment of antibacterial activity in order to give evidence of a durable functionalization effect.

2.5 Assessment of the effectiveness of Bio-functionalization

The presence of the peptide at the functionalized samples was determined using the colorimetric assay of Bradford reagent. The colorimetric method of Bradford reagent allows the determination of protein content in solution and consists in forming a stable complex between the dye Coomassie Brilliant Blue G, and the proteins in solution.¹⁰ The performed test was a micro-Bradford assay, which differs from the standard test in the concentration range used to prepare standard solutions (1-10 μ g of total protein in 1mL). The concentration of peptide in the solution was determined by a calibration curve using standard protein such as bovine serum albumin (BSA). In the preparation of BSA standards appropriate concentrations were selected (0, 2.5, 5, 7.5, 10 μ g/mL). For analysis, to each tube containing 1mL of the sample it was added 1 mL of dye. After agitating and incubating for 5 minutes at room temperature, the absorbance was read on a spectrophotometer at 595nm. Then, the exhaustion rate (%E) was estimated through the difference of the amount of peptide in the solution before and after the functionalization. Moreover, the absorption of the peptide was also measured directly through color changes on the textile samples, i.e., the color test to determine the protein content of the peptides from AMPs onto the fibers resulted in an adaptation of Bradford reagent test solution.¹⁰ Briefly, the process of staining the treated samples and their controls consisted of immersing the samples 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 color measurement of samples was performed by spectrophotometer readings in the spectrophotometer Spectraflash SF300 from Datacolor at 595 nm. The device measures the reflectance (R) of the sample at all wavelengths of the visible range and the reflectance can be related with the concentration through the Kubelka-Munk equation (1):

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

Where R is the reflectance and K and S are the absorption and diffusion coefficient of the medium, respectively, because $K/S=\alpha C$, being C the concentration of dye in the fiber, and α a constant (Gandhi and Shah, 1990; Völz 1995).

2.6 Evaluation of antimicrobial activity

The evaluation of the antimicrobial effect was carried out according to the Japanese Industrial Standard JIS L 1902-2002. This protocol specifies the test method for assessing the antibacterial activity and effectiveness of functionalized textile samples. The referred method is usually based on two evaluation processes, the agar diffusion test (qualitative) and the suspension test (quantitative), both with application to *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) and *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 11296), which are the bacterial strains selected for this work.

a) Test Agar diffusion. The agar diffusion test is only qualitative. In this test the textiles samples with the measures referenced in protocol, contact directly with a cell suspension absorbed in Nutrient Agar (Cultimed). The working bacterial suspension adjusted to a final concentration of 1×10^6 - 1×10^7 CFU/mL and the Petri dishes are prepared according with the protocol. When prepared, the petri plates with the functionalized textile samples and the respective control are placed in the center, with the aid of sterile forceps, in order to ensure intimate contact with the medium. Finally, the petri plates are incubated at 37°C for 48 hours. Therefore, after the incubation if it is visible the formation of a zone of inhibition around the functionalized textile samples, the diameter of the inhibition can be measured, following equation (3):

$$(3)W = \frac{T - D}{2}$$

Where W is the diameter of inhibition zone, T is the total diameter of the sample and zone of inhibition in mm and D is the width of the sample in mm. It is noteworthy, however, that it is not mandatory the existence of a halo to describe the antibacterial activity of a textile because it can be verified the inhibition bacterial growth in the contact zone with the textile sample, especially in the case of strong attached antimicrobial agent onto the fibers.

b) Suspension test. The suspension test, unlike the agar diffusion, provides quantitative values. This test evaluates the antimicrobial efficacy by reducing the microbial population through counting the number of microorganisms. For the test it was used 8 functionalized samples and 8 controls, respectively. From the total numbers of samples, 4 were used to measure the number of living bacteria after inoculation, approximately after one hour contact (T_{0h}) and other 4 were used to measure the number of living bacteria after the incubation, that is, 24h after inoculation (T_{24h}). The bacterial concentration was adjusted to $1 \pm 0,3 \times 10^5$ cell/mL with Nutrient Broth. The 50mL Falcon tubes, containing textile samples, were inoculated with 200 μ L of working bacterial suspension. The tubes referring to T_{24h} were incubated for 24h at 37°C, while the ones referring to T_{0h} were shaken in vortex after adding 20ml solution saline 8.5g/L with 2ml/L of surfactant, Tween-80 (Sigma-Aldrich). After shaking on vortex the T_{0h} tubes, successive dilutions were prepared, homogenizing always the content placed in eppendorfs with the pipette. Then two drops of 10 μ L of each dilution were pipetted in the respective Petri plates. The plates were allowed to dry at rest and then incubated at 37°C for 24h. After 24h, it was counted the number of colonies present on the plates and it was calculated the reduction percentage. Finally, the procedure performed for the tubes regarding T_{0h} was repeated to T_{24h} tubes, allowed to incubate for 24h. Antimicrobial activity expressed in percentage reduction is calculated by the following equation (4), comparing the control population size, C, with the population size on the functionalized samples, A.¹¹

$$(4) \%Inhibition = \frac{C - A}{C} \times 100$$

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.

2.7 X-ray diffraction

In order to verify if the functionalization caused alterations in the structural characteristics of the wool fibers, an analysis by X-ray diffraction (XRD) was carried out. In this work the X-ray diffractometer used was the Rigaku model Rigaku DMAXIII/C with radiation $K\alpha$ of one ampoule of copper ($\lambda=1.5406\text{\AA}$) operating at 40kV and 30mA. The diffractograms were recorded at values of 2θ between 0 and 50°C . The crystal structure of the wool fibers was evaluated by comparing the diffractograms of the functionalized wool samples with diffractograms of their respective controls.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Determination of minimum inhibitory concentration (MIC)

The determination of MIC allowed the estimation of peptide to be used in the functionalization of textile material, particularly onto the wool fibers. The calculated values are reported in Table 2 and will be analyzed in comparison with those already reported in the literature. In previous studies, Cecropin-B showed to have preferential activity against gram-negative bacteria, with MIC values between 0.5 and $16\mu\text{g/mL}$.¹² Thus, comparing the value obtained for *Klebsiella pneumoniae*, $4.06\mu\text{g/mL}$, with the range reported in¹², it can be concluded that this value is in agreement with previously described in literature. However, preferential activity of Cecropin-B against gram-negative bacterium is not visible because it was also obtained a MIC value for *Staphylococcus aureus*, gram-positive bacteria, of $1.44\mu\text{g/mL}$, a lower value.

For [Ala5]-Tritrp7 literature shows that MIC values of $20\mu\text{g/mL}$ for *Escherichia coli*¹³ and $4\mu\text{g/mL}$ to *Staphylococcus aureus*¹³, were obtained. Thus, this able to conclude that the value obtained in this research for the *Staphylococcus aureus* $4.58\mu\text{g/mL}$ is very similar to what was previously found, but the value related to *Klebsiella pneumoniae* ($5\mu\text{g/mL}$) is lower to the one obtained for *Escherichia coli* ($20\mu\text{g/mL}$).

Indeed, is visible that both peptides exhibit MIC values very low which is a major benefit in comparison with other antimicrobial agents for textiles. Furthermore, the MIC values show a similar behavior against gram-negative and gram-positive bacteria.

3.2 Effectiveness of Bio-functionalization

Wool fibers have functional groups which make the surface chemically reactive. The main functional groups which occur naturally in wool structure are amino (-NH₂), carboxyl (-COOH) and hydroxyl (OH-) groups.¹⁴ Therefore, the binding reaction occurred by electrostatic interactions between the amino and carboxyl groups of the peptides and wool. This is more important since the selected peptides [Ala5]-Tritrp7 and Cecropin-B both have a terminal amino group which facilitates the binding through the terminal carboxylic sites of wool fibers.

The presence of the peptide on wool was detected by the Bradford assay reagent because Coomassie Brilliant Blue G has specific affinity for the amino groups in solution and for the wool itself. Thus, a more intense blue coloration of the incubation solution, measured on a spectrophotometer at 595nm, shows the existence of a greater amount of peptide in solution and consequently lower absorption, diffusion and attachment of the peptide onto the reactive sites of the wool. From Table 3 it is apparent that the absorption of the peptide by the fiber, measured by % Exhaustion (%E), gradually decreases with the increasing of functionalization time for both peptides being the higher exhaustion rates attained after 1 hour functionalization (75% for Cecropin B and 65.11% for [Ala5]-Tritrp7). This result may be due to the degradation of the wool peptides with incubation time, which occurs in the incubation solution during functionalization. In addition to this disadvantage, obtained values were systematically different from replicate to replicate, even for the control, most probably because there is not a linear peptide hydrolysis of wool when immersed in water. Thus, to overcome the limitations obtained by the method of Bradford in solution, the absorption of the peptide by wool was measured of precise form directly on the samples. Table 4 shows the notorious difference of the K/S values and color intensity of the functionalized samples in comparison to the control. The values of K/S are much higher for functionalized samples at all functionalization times because there was an increasing in peptide concentration in the fiber. Consequently the samples showed an increase in the intensity of the blue color, which is preferably visible for the functionalized samples for 1h. In comparison with previous studies¹⁵ and ¹⁶ the obtained results are in accordance with the existing ones.

In these studies a method was developed to immobilize lipase from *Candida rugosa* on modified natural wool fibers and the presence of the enzymatic proteins on fibers was qualitatively characterized by using this staining test.¹⁶ While in ¹⁵ the staining test was used for determination of the lysozymes immobilized onto wool fibers.

Moreover, the K/S values are in accordance with the exhaustion rates (%E). It was observed that after 1h of functionalization K/S values and %E are higher. I.e, the functionalized wool for 1h with Cecropin-B shows a higher K/S (5.18) value and uptake (%E 75). The same is true for the [Ala5]-Tritrp7 which features a K/S value of 7.06 and %E of 65.11%. The high value obtained for K/S for cecropin-B which has in its composition higher arginine content may be related with the higher content of amino groups in the case of this peptide. However, the cecropin-B in terms of size is greater than the synthetic peptide [Ala5]-Tritrp7 and despite this peptide has in its composition, tryptophan residues, which will

impart a hydrophobic character an even higher K/S was conferred. Thus, since both the AMPs have a terminal amino group, size is the factor that most influences the absorption and diffusion of AMPs in the wool, which is visible by the values of K/S.

Furthermore, it is also apparent that after 1h of functionalization there is already much absorption. And so, 1h is long enough for the functionalization to occur effectively.

3.3 Evaluation of antimicrobial activity

a) Test Agar diffusion. The qualitative assay performed for the two bacterial strains: *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae* did not show the formation of an inhibition zone, i.e., an halo area around of textile samples functionalized for 1h with Cecropin-B and [Ala5]-Tritrp7. However, in the contact zone with the textile sample it was verified inhibition of bacterial growth (Figure 1). The negative control in turn showed no antimicrobial activity, which validates the test. This result is in accordance with the remaining results, particularly with the values of K/S. Once again, it seems that 1h is long enough for the functionalization to occur efficiently and to these samples to give an antimicrobial effect.

b) Suspension test. As it can be seen by the results shown in Table 5 and Figure 2, the samples functionalized with peptides Cecropin-B e [Ala5]-Tritrp7, for 1h, have a greater reduction in bacterial growth after 24h. Thus, for *Staphylococcus aureus* after 24h of contact with the functionalized wool samples there was a reduction of bacterial viability of 71.67% for Cecropin-B and of 66.74% for [Ala5]-Tritrp7 in comparison with the non-functionalized wool sample. While for *Klebsiella pneumoniae* after 24h contact with functionalized wool samples there was a reduction of bacterial viability of 85.95% for Cecropin-B and 88.65% for [Ala5]-Tritrp7 in comparison with the non-functionalized wool sample. Therefore, it is possible to conclude that a longer contact of peptides with the wool samples gives a greater antimicrobial effect and that for the bacteria under study the peptides have a lasting effect.

Regarding the results at 0h, for *Staphylococcus aureus* after 0h of contact with the functionalized wool samples there was a reduction of bacterial viability of 42.03% for Cecropin-B and 58.86% for [Ala5]-Tritrp7. Similarly, for *Klebsiella pneumoniae* after 0h of contact with the functionalized wool samples there was a reduction of bacterial viability of 76.88% for Cecropin-B and 66.56% for [Ala5]-Tritrp7 in comparison with the non-functionalized wool sample. Thus, despite the reduction in bacterial growth is apparent to 24h, it is also visible a decrease in bacterial growth, but less intensified indicating that the antimicrobial effect is not completely. These results confirm again that the functionalization of the wool for 1 hour is sufficient to obtain good results related to antimicrobial activity and effectiveness of functionalization.

In comparison with other studies about wool, in which new multifunctional properties were achieved by the combination of silica and silver nanoparticles on its surface, it can be verified that the reduction percentage in growth of *Escherichia coli* (Gram-negative) was 66% and 71%, for wool with silver and for wool with silica and silver, respectively.¹¹ These percentages, 66% and 71%, compared with those related to *Klebsiella pneumoniae* obtained in this study, 85.95% to Cecropin-B and 88.65% for [Ala5]-Tritrp7, are relatively lower, allowing the conclusion that the incorporation of the peptides influence very positively the antimicrobial activity of the wool. Moreover, the reduction percentage in growth of *Staphylococcus aureus* obtained in this work was compared with the one achieved in the study of immobilized lysozymes in wool.¹⁵ Thus, the values obtained in this research, 71.67% for Cecropin-B and 66.74% for [Ala5]-Tritrp7 showed to be relatively lower than the obtained by¹⁵, 80.95% still very effective since the antimicrobial effect that the peptides cause in the wool fiber is very lasting and was successfully achieved.

The antimicrobial activity of Cecropin-B is closely linked to the ability to form amphipathic α -helices, which have a net cationic charge due to the presence of multiple lysine and arginine residues. The formation of α -helices facilitates the interaction with anionic phospholipids of target cells and promotes the development and the modification of the membrane structure, consequently leading to rupture and release of cellular contents.¹⁷ On the other hand, the [Ala5]-Tritrp7, synthetic peptide resulting from substitution of the first proline residue at position 5 of Tritrpticin by a residue of Ala (Tritrp7) was characterized by having a greater ability to form amphipathic α -helices,¹³ promoting an effective cell leaching which may be the cause of the higher reduction rates (growth inhibition) for this peptide.

In conclusion, both peptides were successfully bonded to wool and the option for each one should lie on the type of application. Cecropin-B is effective for pathogen clearance and can affect host cell to promote wound repair with a known antiviral and antifungal activity while [Ala5]-Tritrp7 is a member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides with effective antibacterial activity.^{8,9,13,17}

Finally, this method has several advantages in comparison with the study done with a nontoxic agent-L-cysteine in a previous work¹⁸, once there is needed a much smaller amount of AMPs to obtain antimicrobial properties and because there is a reduced likelihood of the acquisition of resistance by bacteria. In the recent years, an ever-expanding dose of attention has been given to the AMPs. This special attention is due to the fact that the microbial resistance to conventional antibiotics is increasing at an alarming rate.¹⁹

3.4 X-ray diffraction

Chemically, wool can be regarded as a composite material consisting of mainly keratinous protein polymers. Keratin in wool is a mixture of chemically linked amino acids with strong hydrogen and covalent bonds.²⁰ I.e., wool has a composite structure consisting of fibrils with alpha-keratin structure embedded into an intermacrofibrillar matrix.²¹ The keratin macromolecule in wool fiber presents two different crystal structures, which represent two different chain conformations. The conformation of α -helices (α -keratin) is characteristic for wool fiber in its natural state, this is when the fiber is not stretched along its axis. But if wool is stretched, there is a gradual and reversible transformation the α -keratin for β -keratin. β -keratin presents an unstable conformation and when the stretching force disappears the conformation of keratin reverts to α -helices.²² Furthermore, the α -helix is stabilized by intramolecular hydrogen bonds. While, in β -keratin structure, the peptide chains are largely stretched to form what is called a pleated sheet structure and each sheet has hydrogen bonds between the peptide groups of opposing chains, i.e, intermolecular bonds.²³⁻²⁵

Thus, analysis by X-ray diffraction in this work was thought to detect possible changes in the structural characteristics of the wool which are reflected in the fiber crystallinity changes.

The diffractograms of the samples are shown in Figure 3. The graph for non-functionalized wool display the typical X-ray diffraction pattern with a prominent 2θ peak at 20.2° and a minor peak at about 9.2° , which were attributed to the β -sheet and α -helix structure of peptide chains in wool. This result is according to what is sustained by other authors.²⁶

Comparing the intensity of the peaks $2\theta=9.2^\circ$ and 20.2° of the diffractogram the non-functionalized wool sample with the diffractograms of treated wool, it appears that the intensity of the peak at $2\theta=9.2^\circ$ increases in the case of wool immersed in distilled water, a test sample provided to check and compare with the simple water effect, and in case of functionalized wool samples during 1 hour with the two peptides. This increase is more evident than the changes in the intensity peak at $2\theta=20.2^\circ$, as shown in Table 6. I.e, the intensities of the peaks at $2\theta=9.2^\circ$ of 587 obtained for the non-functionalized wool is lower than the one obtained for the wool treated with distilled water, 1127, and an even greater increase in the intensity was recorded for the functionalized wool samples being 1265 for wool treated with Cecropin-B and 1324 for wool treated with [Ala5]-Tritrp7.

On the other hand, the peak intensity at $2\theta=20.2^\circ$ decreases for the water treated wool: 1069 and for functionalized wool with [Ala5]-Tritrp7: 1181, compared with the value obtained for the non-functionalized wool: 1234; being slightly higher for wool functionalized with Cecropin-B: 1353.

Thus, it can be seen that in what concerns to the sample treated with distilled water, a slight increase in peak intensity at $2\theta=9.2^\circ$ was obtained. This effect is due to the organization of macromolecular chains, caused by the swelling effect of fiber because of water absorption. Regarding the functionalized samples with peptide, there is a slight

increase but the intensity of the peak at $2\theta=9.2^\circ$ is more notorious, which results in a higher crystalline fiber, when the peptide is connected. In contrast, in relation with the $2\theta=20.2^\circ$ peak it can be seen that the intensity decreases for the wool with treated distilled water. This decrease causes a reduction in the disorientated β configuration and is a result of the effect that water causes in organization of the wool.²⁶ The same effect is visible for the functionalized wool with [Ala5]-Tritrp7. This result is due to the fact of [Ala5]-Tritrp7 shows a low molecular mass (1875.3)¹³ that interferes less in the organization of wool. Rather, Cecropin-B, being larger (molecular mass of 3834.7)²⁷, led to an increase in the disorientated β configuration, visible by a slight increase in the intensity. This increase may be due to the hydrogen bonding break in the wool protein structure.²⁸ These results are in accordance with those obtained by other studies and in particular by the production of nanoparticles by enzymatic hydrolysis of wool fiber.²⁹

Therefore, in spite of the slight modifications in the diffractograms, the applied procedure did not cause significant changes in the macromolecular composition of wool.

4. CONCLUSIONS

In the present study, the selected peptides showed to be promising candidates for the functionalization of textile materials. The selection of peptides, Cecropin-B and [Ala5]-Tritrp7 was carefully done, paying particular attention to the molecular size and the properties thereof, taking into account their application to proteinaceous fibers. According to the results for the antimicrobial activity it was verified that both peptides have a lasting antimicrobial action and that the macromolecular composition of the wool fibers was not influenced by the functionalization process, as it was seen by XRD spectra.

The present work proposes the implementation of a new antimicrobial process and it is intended to add effective, durable and non-toxic bioactive properties to the wool fibers, which can be used in textiles and other polymeric proteinaceous materials for biomedical applications.

Thus, the use of AMPs as a novel method to give antibacterial property to wool fibers is a novel and successful strategy since it is expected that antimicrobial peptides will become the drugs of choice for emerging bacterial infections in the future.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

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.

6. REFERENCES

1. Niu, M.; Liua, X.; Daia, J.; Houa, W.; Xua, B. *Prog. Org. Coat.* **2012**, *74*, 622-628.
2. Tang, B.; Wang, J.; Xu, S.; Afrin, T.; Xu, W.; Sun, L.; Wang, X. *J. Colloid Interface Sci.* **2011**, *356*, 513-518.
3. Windler, L.; Height, M.; Nowack, B. *Environ. Int.* **2013**, *53*, 62-73.
4. Brogden, K.A. *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 238-250.
5. Nguyen, L.T.; Haney, E.F.; Vogel, H.J. *Trends Biotechnol.* **2011**, *29*, 464-472.
6. Wimley, W.C.; Hristova, K. *J. Membr. Biol.* **2011**, *239*, 27-34.
7. Maróti, G.; Kereszt, A.; Kondorosi, É.; Mergaert, P. *Res. Microbiol.* **2011**, *162*, 363-374.
8. Li, Y.; Xiang, Q.; Zhang, Q.; Huang, Y.; Su, Z. *Peptides* **2012**, *37*, 207-215.
9. Schibli, D.J.; Nguyen, L.T.; Kernaghan, S.D.; Rekdal, Ø.; Vogel, H.J. *Biophys. J.* **2006**, *91*, 4413-4426.
10. Bradford, M.M., *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248.
11. Tang, B.; Wang, J.; Xu, S.; Afrin, T.; Tao, J.; Xu, W.; Sun, L.; Wang, X. *Chem. Eng. J.* **2012**, *185-186*, 366-373.
12. Hu, H.; Wang, C.; Guo, X.; Li, W.; Wang, Y.; He, Q. *Mol. Cells.* **2013**, *35*, 106-114.
13. Schibli, D.J.; Nguyen, L.T.; Kernaghan, S.D.; Rekdal, Ø.; Vogel, H.J. *Biophys. J.* **2006**, *91*, 4413-4426.
14. Ibrahim, N.A.; Khalil, H.M.; Zairy, E.M.R.E.; Abdalla, W.A. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *96*, 200-210.
15. Wang, Q.; Fan, X.; Hu, Y.; Yuan, J.; Cui, L.; Wang, P. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* **2009**, *32*, 633-639.
16. Monier, M.; Sokkary, A.M.A.E.; Sarhan, A.A. *React. Funct. Polym.* **2010**, *70*, 122-128.
17. Jacobi, V.; Plourde, A.; Charest, P.J.; Hamelin, R.C. *Can. J. Bot.* **2000**, *78*, 455-461.
18. Gouveia, I.C.; Henriques, M. *J. Appl. Polym. Sci.* **2012**, *124*, 1352-1358.
19. Giuliani, A.; Pirri, G.; Bozzi, A.; Giulio, A.D.; Aschi, M.; Rinaldi, A.C. *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, *65*, 2450-2460.
20. Horrocks, A.R.; Anand, S.C. *In Handbook of Technical Textiles*; 1sted., Engalnd Cambridge, Woodhead Publishing Ltd. And CRC Press LLC, **2000**, pp. 25.
21. Pakdel, E.; Daoud, W.A.; Wang, X. *Appl. Surf. Sci.* **2013**, *275*, 397-402.

22. Wojciechowska, E.; Wl/ochowicz, A.; Wesel/ucha-Birczyn'ska, A. *J. Mol. Struct.* **1999**, 511-512, 307-318.
23. Feughelman, M.; Danilatos, G. *Text. Res. J.* **1980**, 50, 568-574.
24. Cao, J. *J. Mol. Struct.* **2000**, 553, 101-107.
25. Cao, J. *J. Mol. Struct.* **2002**, 607, 69-75.
26. Fan, J.; Yu, W. *Fibers Polym.* **2012**, 13, 1044-1049.
27. Kulagina, N.V.; Shaffer, K.M.; Ligler, F.S.; Taitt, C.R. *Sens. Actuators, B* **2007**, 121, 150-157.
28. Monier, M.; Ayad, D.M.; Sarhan, A.A. *J. Hazard M.* **2010**, 176, 348-355.
29. Eslahi, N.; Dadashian, F.; Nejad, N.H. *Adv. Powder Technol.* **2013**, 24, 416-426.

Table 1

Peptide	Site of production	Amino acid sequence
Cecropin-B	Silk moth (<i>Hyalophora cecropia</i>) - immune haemolymph	KWKVFKKIEKMGRNIRNGIVKAGPAIAVLGEAKAL-NH ₂
[Ala5] -Tritrp7	Synthetic	VRRFAWWWPFLRR-NH ₂

Table 2

MIC (µg/ml)	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Cecropin-B	1.44	4.06
[Ala5]-Tritrp7	4.58	5.00

Table 3

	Concentration (µg/ml)	%E
Functionalized samples with Cecropin-B		
1h	2.432	75.68
2h	4.419	55.80
3h	5.208	47.92
Functionalized samples with [Ala]-Tritrp7		
1h	3.489	65.11
2h	5.224	47.76
3h	5.634	43.66
Cecropina-B_initial	10	-
[Ala5] -Tritrp7_initial	10	-

Table 4

Assay of Bradford reagent in the sample/ Wool 610nm	1h	2h	3h
Reflectance (%R)			
▪ Non-functionalized wool/ Control		11.95	
▪ Cecropin-B	8.14	8.29	8.18
▪ [Ala5] -Tritrp7	6.23	6.72	8.30
▪ Difference (control- Cecropin-B)	3.81	3.66	3.77
▪ Difference (control- [Ala5] -Tritrp7)	5.72	5.23	3.65
K/S			
▪ Non-functionalized wool/ Control		3.24	
▪ Cecropin-B	5.18	5.07	5.16
▪ [Ala5] -Tritrp7	7.06	6.48	5.06
▪ Difference (control- Cecropin-B)	-1,94	-1.83	-1.92
▪ Difference (control- [Ala5] -Tritrp7)	-3.82	-3.24	-1.82

Table 5

	<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
	t(h)	CFU/ml	%Reducing growth	t(h)	CFU/ml	%Reducing growth
Control/ Non-functionalized wool	0h	2.43E+05	-	0h	8.00E+05	-
	24h	5.33E+08	-	24h	3.15E+08	-
Cecropin-B_1h	0h	1.41E+05	42.03	0h	1.85E+05	76.88
	24h	4.09E+08	71.67	24h	4.43E+07	85.95
[Ala5]-Tritrp7_1h	0h	1.00E+05	58.86	0h	2.68E+05	66.56
	24h	3.67E+08	66.74	24h	3.58E+07	88.65

Table 6

	Intensity	
	$2\theta=9.2^\circ$	$2\theta=20.2^\circ$
Non-functionalized wool	587	1234
Wool in Distilled Water_1h	1127	1069
Functionalized wool with Cecropin-B_1h	1265	1353
Functionalized wool with [Ala5]-Tritrp7_1h	1324	1181

Figure 1

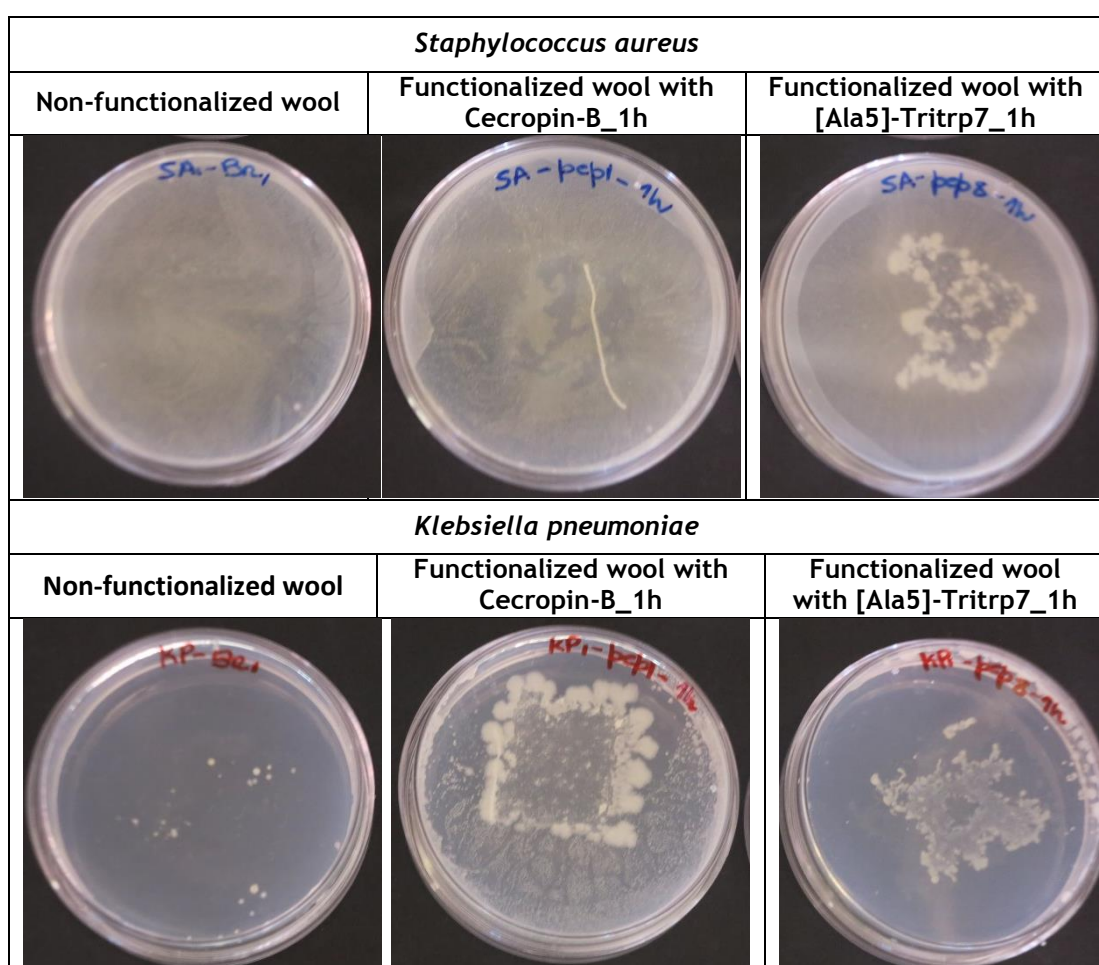


Figure 2

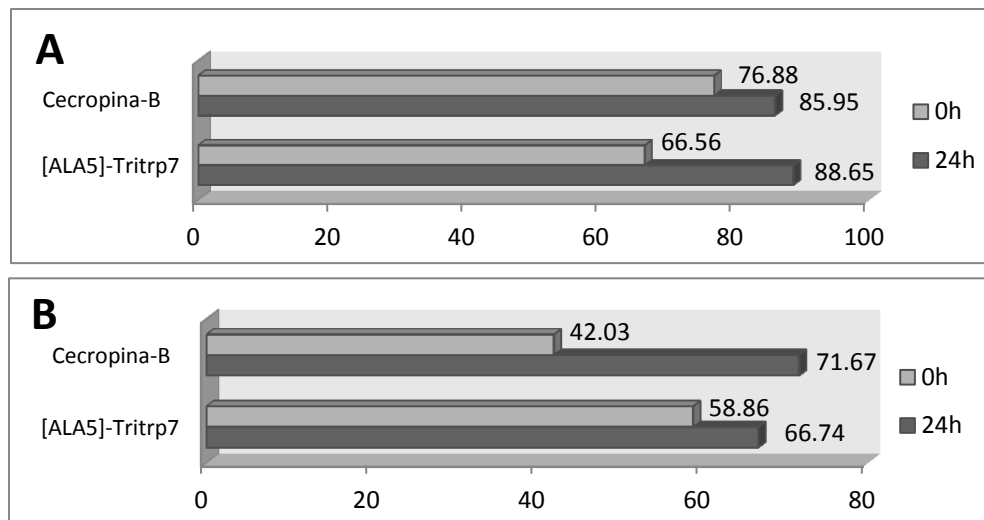
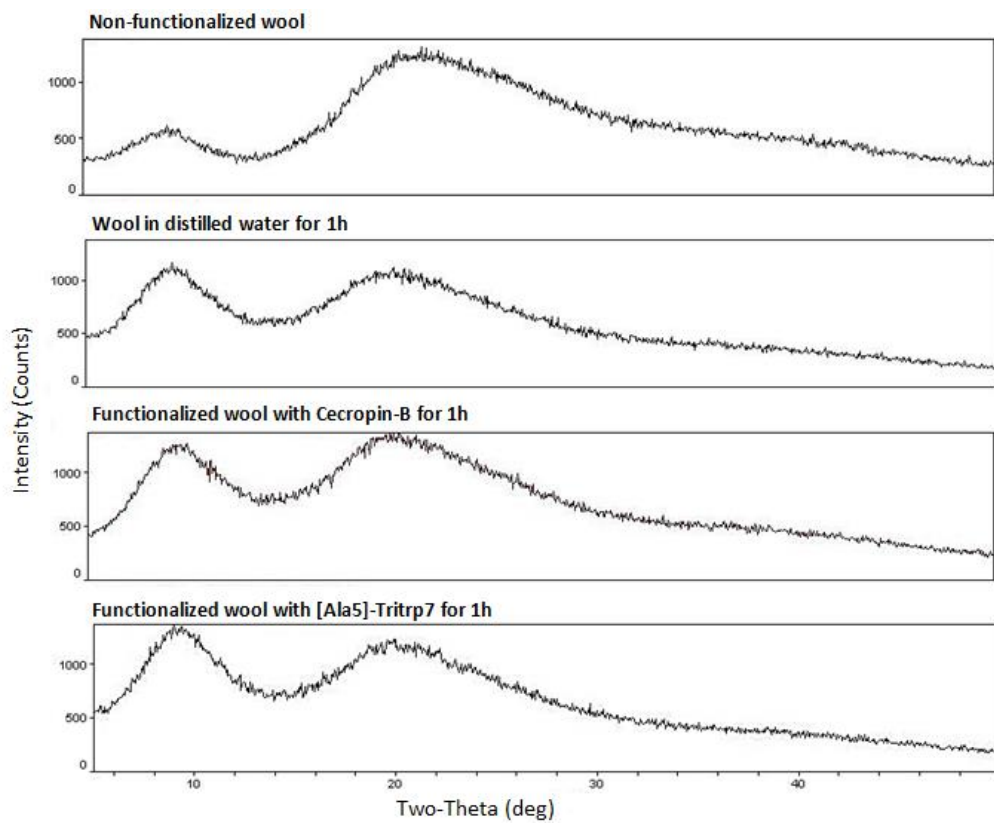


Figure 3



Tables:

Table 1- Amino acid sequences of Cecropin-B and [Ala5] -Tritrp7.

Table 2 - MICs of peptides for *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*.

Table 3 - Results of the assay of Bradford reagent in solution.

Table 4 - Results of the assay of Bradford reagent in the sample.

Table 5 - Test quantitative performed to functionalized wool samples with peptides for 1h.

Table 6- The intensities of the peaks at $2\theta=9.2^\circ$ and 20.02° of non-functionalized wool, wool in distilled water and functionalized wool with peptides.

Figures:

Figure 1- Antibacterial assay: inhibition effect of the functionalized samples with peptides against *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*.

Figure 2- Graphic representation of the reduction percentage in bacterial relative to 0h and 24h for *Klebsiella pneumoniae* (A) and *Staphylococcus aureus* (B).

Figure 3- X-ray diffraction spectra of wool fibers corresponding to treatment during 1h.

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, 6201-001Covilhã, 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-LLGDDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES) 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 submerged 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):

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

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 µg/mL of cys-LC-LL-37, about 40% of the 5.00 µg/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

1. 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
2. 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.
3. 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
4. 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
5. 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
6. 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

7. 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.
8. 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.
9. NCLS M7-A6. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that grow aerobically, 6th ed.
10. Freshney I. Culture of animal cells: a manual of basic technique. 5th ed. New Jersey: Jonh Wiley & Sons, Inc, 2005, Chapters 9, 10, 13, 21 and 22.
11. ISO 105-C06:2010. Textiles - Tests for colour fastness - Part C06: Colour fastness to domestic and commercial laundering.
12. JIS L 1902:2002 (Japanese Industrial Standard). Testing for antibacterial activity and efficacy on textile products
13. 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.
14. 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.
15. Lehrer, R. I. & Ganz, T. Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Curr Opin Immunol* 1999; 11: 23-27.
16. 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.

	%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

Figures

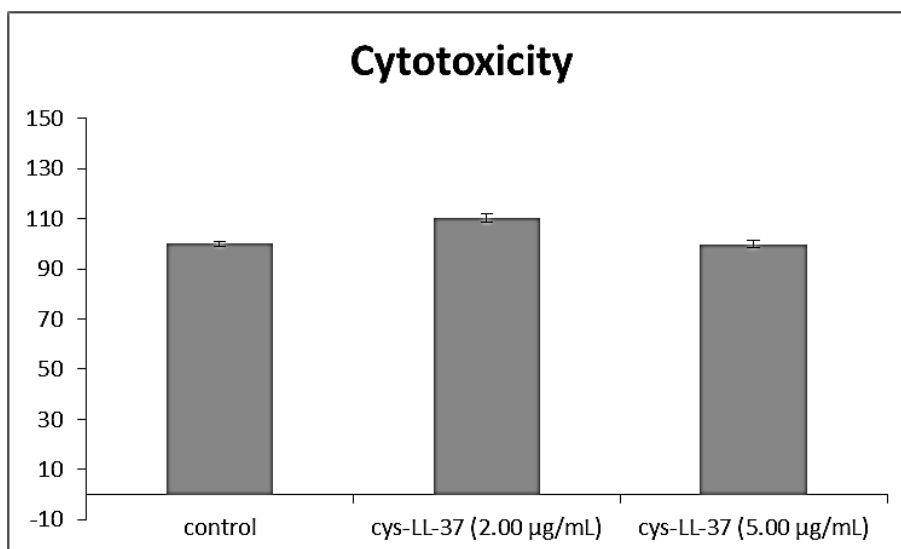


Figure 1. Fibroblasts viability percentage (mean \pm SD) when in contact with two concentrations of cys-LC-LL-37 and the untreated control.