

# Agradecimentos

---

Ao Professor Doutor Pedro Miguel de Mendonça Rocha pela competência com que orientou esta minha tese e o tempo que generosamente me dedicou transmitindo-me os melhores e mais úteis ensinamentos, com paciência, lucidez e confiança. Pelo acesso que me facilitou a uma pesquisa mais alargada e enriquecedora, pelas condições disponibilizadas no seu laboratório privado e pela sua crítica sempre tão atempada, como construtiva, bem-haja estou-lhe muito, muito grato.

Um sentido agradecimento à Professora Doutora Maria José de Oliveira Geraldês e ao Professor Doutor Nuno José Ramos Belino do Departamento de Ciências e Tecnologia Têxteis – UBI, por esta colaboração que certamente irá dar muitos frutos no futuro.

Agradeço ao Marco, Rui, João, Rodrigo pela compreensão, pela motivação e por estarem sempre presentes.

Ao Rodrigo, Rui, Tiago, à malta da Orquestra Académica e a todo o pessoal do laboratório Dr Brito Rocha.

E finalmente ao meu país.

Um grande bem haja.

## Resumo

---

Tem havido um grande esforço da parte da indústria têxtil no desenvolvimento de novos materiais têxteis multifuncionais, entre eles, os têxteis antimicrobianos despertaram grande interesse sendo vista uma grande potencialidade nestes produtos, que para além de protegerem o têxtil, protegem ainda o consumidor. Com o intuito de obter produtos cada vez mais eficientes, duradouros e seguros, já se desenvolveram uma grande variedade de fibras, têxteis e acabamentos antimicrobianos que diferem entre si em termos de actividade biológica, desempenho e durabilidade. Foram desenvolvidos diversos testes qualitativos e quantitativos para avaliar a actividade antimicrobiana em materiais têxteis. Este trabalho científico teve como objectivo a continuação do trabalho de análise das técnicas de avaliação da actividade antimicrobiana iniciado em 2007, onde se fez uma descrição detalhada das técnicas qualitativas, tanto a nível teórico como a nível prático. Neste projecto, foram alvo as técnicas avançadas quantitativas, que permitem a obtenção de resultados mais rigorosos. A falta de um documento onde são expostos as várias normas usadas no mundo inteiro incentivou este trabalho, fez-se uma comparação entre elas e realizaram-se em laboratório, com o objectivo de obter um documento que sirva de guia para posteriores investigações nesta área. Neste mesmo projecto foram usadas amostras comerciais de referência para comparação de resultados, e amostras cedidas pelo Departamento de Ciências e Tecnologia Têxteis da Universidade da Beira Interior para uso em ambiente hospitalar. As amostras provenientes da investigação do D.C.T.T. da UBI não mostraram actividade antimicrobiana nos testes qualitativos de difusão em agar, mas mostrou alguma actividade antibacteriana num dos testes quantitativos. Com uma amostra tratada com o antimicrobiano Ultra-fresh (guardada durante dois anos) obtiveram-se excelentes resultados em todos os testes efectuados.

# Abstract

---

There has been a great effort from the textile industry to develop new multifunctional textile materials, among them the antimicrobial textile aroused great interest and great potential for these products, which in addition to protect the textile, protect the consumer too. In order to obtain more efficient products, durable and safe, it has been developed a variety of fibers, textiles and antimicrobial finishes that differ in terms of biological activity, performance and durability. Several tests were developed to evaluate the antimicrobial activity of textile materials, qualitative and quantitative. This scientific work was intended to continue the work of analysis techniques for evaluating the antimicrobial activity on textiles started in 2007, which gave a detailed description of qualitative techniques, both theoretical and practical level. In this project, were focused on quantitative techniques, which allow obtaining more accurate results. The lack of a document where they are exposed to various standards used worldwide encouraged this work, there was a comparison between them and were held in laboratory with the aim of obtaining a document that serves as a guide for further investigations in this area. In this project were used commercial samples as reference for results comparison, but also samples from the Textile Science and Technology Department, of Universidade da Beira Interior – Covilhã-PT for medical use. Samples from the investigation of DCTT of UBI showed no antimicrobial activity on agar diffusion qualitative tests, but showed some antibacterial activity in the quantitative tests. A sample treated with Ultra-fresh (stored for two years) antimicrobial treatment obtained excellent results in all tests.

## Siglas e Abreviaturas

---

*E. coli* - Escherichia coli

*K. pneumoniae* - Klebsiella pneumoniae

*S. aureus* - Staphylococcus aureus

AATCC - American Association of Textile Chemists and Colorists

ISO - American Association Standardization Organisation

ASTM - American Society for Testing and Methods

JIS - Japan International Standard

p.ex. - por exemplo

CFU - Colony-forming unit

TSA - Tryptone soya agar

TSB - Tryptone soya broth

D.C.T.T. - Departamento de Ciências e Tecnologia Têxteis

UBI – Universidade da Beira Interior

# Índice Geral

---

1.	Fundamentos teóricos .....	2
1.1.	Introdução histórica .....	2
1.2.	Microrganismos nos materiais têxteis .....	3
1.3.	Mecanismo de degradação microbiológica de fibras .....	4
1.4.	Compostos antimicrobianos nos materiais têxteis.....	6
1.5.	Requisitos para um tratamento antimicrobiano.....	7
1.6.	Métodos de aplicação de compostos antimicrobianos nos materiais têxteis. ....	12
1.7.	Nanotecnologia nos têxteis .....	14
1.8.	Mecanismos de acção dos compostos antimicrobianos.....	16
1.9.	A importância do tratamento antimicrobiano em têxteis .....	19
1.10.	Importância dos têxteis hospitalares.....	19
1.11.	Importância dos têxteis cirúrgicos.....	21
1.12.	Têxteis hospitalares antibacterianos .....	24
1.13.	Têxteis antimicrobianos à base de partículas de prata.....	25
1.13.1.	A prata como agente antibacteriano .....	25
1.13.2.	Efeito antibacteriano das nanopartículas de prata nos têxteis.....	28
1.13.3.	Problemas associados ao uso da prata .....	30
1.14.	Têxteis antimicrobianos à base de triclosano.....	31
1.15.	Caracterização dos tratamentos antimicrobianos utilizados no estudo .....	32
1.15.1.	Tratamento antimicrobiano a base de triclosano.....	32
1.15.2.	Tratamento antimicrobiano a base de iões de prata .....	33
1.15.3.	Tratamento antimicrobiano a base nanopartículas de prata.....	34
1.16.	Metodologias de estudo de actividade antimicrobiana em têxteis .....	34
1.16.1.	Metodologias qualitativas .....	36
1.16.2.	Metodologias quantitativas: .....	37
1.16.3.	ISO 20743:2007 .....	38
1.16.4.	AATCC Method 100 -"Assessment of Antibacterial Finishes on Textiles" .....	38
1.16.5.	ASTM E2149 - Antimicrobial Surface Test - "Determining the Antimicrobial Activity of Immobilized Antimicrobial Agents Under Dynamic Contact Conditions" .....	39

1.16.6.	JIS Z 2801: 2000 - "Antibacterial products-Test for Antibacterial activity and efficacy" .....	41
1.16.7.	ASTM E-2180 - Standard Test Method for Determining the Activity of Incorporated Antimicrobial Agent(s) In Polymeric or Hydrophobic Materials .....	42
2.	Objectivos .....	45
3.	Procedimento.....	47
3.1.	Estudo prévio às estirpes.....	47
3.1.1.	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	47
3.1.2.	<i>E. coli</i> .....	47
3.2.	Caracterização das amostras .....	47
3.3.	Avaliação da actividade antimicrobiana de têxteis segundo o método NP EN ISO 20645:2005.....	49
3.3.1.	Princípio do método .....	49
3.3.2.	Material e reagentes.....	49
3.3.3.	Preparação das amostras.....	49
3.3.4.	Culturas de bactérias.....	50
3.3.5.	Preparação do inóculo .....	50
3.3.6.	Procedimento de teste.....	50
3.3.7.	Controlos.....	51
3.3.8.	Esquema.....	51
3.3.9.	Análise de resultados.....	52
3.4.	- Avaliação da actividade antimicrobiana de têxteis segundo o método AATCC 100 com adaptações do método ISO 20743.....	53
3.4.1.	Princípio do método .....	53
3.4.2.	Material e reagentes.....	53
3.4.3.	Preparação das amostras.....	54
3.4.4.	Culturas de bactérias.....	54
3.4.5.	Preparação do inóculo .....	54
3.4.6.	Procedimento .....	54

3.4.7.	Esquema.....	55
3.4.8.	Contagem de células.....	56
3.4.9.	Contagem em placa e diluições em série.....	56
3.4.10.	Determinação da eficiência antibacteriana.....	57
3.5.	Avaliação da actividade antimicrobiana de têxteis segundo o método ASTM E- ASTM E 2149.....	58
3.5.1.	Princípio do método.....	58
3.5.2.	Material e reagentes.....	58
3.5.3.	Preparação das amostras.....	58
3.5.4.	Culturas de bactérias.....	59
3.5.5.	Preparação do inóculo.....	59
3.5.6.	Procedimento.....	59
3.5.7.	Contagem de células.....	60
3.5.8.	Determinação da eficiência antibacteriana.....	60
3.5.9.	Esquema.....	61
3.6.	Resultados:.....	63
3.7.	Resultados dos testes qualitativos (ISO 20645:2005).....	63
3.8.	Resultados dos testes quantitativos.....	70
3.8.1.	AATCC 100.....	70
3.8.2.	ASTM.....	72
4.	Discussão.....	75
4.1.	Amostra para teste.....	<b>Erro! Marcador não definido.</b>
4.2.	Inóculo.....	<b>Erro! Marcador não definido.</b>
4.3.	Condições de exposição.....	<b>Erro! Marcador não definido.</b>
4.4.	Método de contagem.....	<b>Erro! Marcador não definido.</b>
4.5.	Manuseamento dos dados.....	<b>Erro! Marcador não definido.</b>
5.	Conclusões.....	99
6.	Perspectivas futuras.....	100
7.	Bibliografia.....	102



# Índice de figura

---

Figura 1 - Estrutura morfológica das bactérias Gram-positiva e Gram-negativa.....	4
Figura 2 - Diagrama representativo de vários tratamentos antimicrobianos .....	9
Figura 3 - Comportamento da célula microbiana quando exposta a uma agente letal .....	16
Figura 4 - Exemplo de um antibiótico que atua como ionóforo.....	17
Figura 5 - Estrutura do 2,4,4-tricloro-2-hidoxidifeniletér.....	31
Figura 6 - Processo de obtenção do acabamento antimicrobiano ISys AG	<b>Erro! Marcador não definido.</b>
Figura 7 - Testes de actividade antimicrobiana em têxteis .....	36
Figura 8 - Esquema representativo do método NP EN ISO 20645 2005 .....	51
Figura 9 - Esquema representativo do método Vial Drop Method for Hydrophilic Textiles .....	55
Figura 10 - Esquema representativo do método pour plate e espalhamento.....	56
Figura 11 - Esquema representativo do método de contagem por diluição .....	57
Figura 12 - Esquema representativo do método ASTM E 2149-01 (shake flask test) .....	61
Figura 13 - Esquema representativo do método ASTM E 2149-01 .....	61
Figura 14- Gráfico da percentagem de redução bacteriana obtida através da norma AATCC-100.....	70
Figura 15 - Gráfico do crscimento bateriano obtido na avaliação da actividade antibacteriana segundo a norma AATCC100.....	70
Figura 16 - Gráfico da percentagem de redução bacteriana obtida através da norma AATCC-100....	72
Figura 17 - Gráfico do crscimento bateriano obtido na avaliação da actividade antibacteriana segundo a norma ASTM E 2149 :01. ....	72
Figura 18 - Processo de avaliação da actividade antimicrobiana em têxteis .....	75
Figura 19 - Desempenho obtido nos têxteis de algodão tratados com ISYS AG .....	77
Figura 20 - Desempenho obtido nos têxteis de 100% Algodão tratados com Ultra-Fresh.....	78
Figura 21 - Cultura das estirpes usadas nos testes em meio cromogénico .....	81
Figura 22 – Métodos para determinação da actividade antimicrobiana em têxteis.....	84
Figura 23 - Curvas de crescimento da população bacteriana em têxteis antimicrobianos .....	85
Figura 24 - Curva característica de crescimento bacteriano .....	86

# Índice de Tabelas

---

Tabela 1 - Diagrama representativo de vários tratamentos antimicrobianos .....	13
Tabela 2 - Exemplos de materiais tratados. ....	35
Tabela 3 - Composição dos 4 tipo de têxteis tratados com acabamentos antimicrobianos e o têxtil não tratado usado como controlo .....	48
Tabela 4 - Avaliação da actividade antimicrobiana (ISO 20645 2005).....	52
Tabela 5 - Resultados obtidos nos ensaios realizados nos materiais têxteis e fibra testados seguindo a norma ISO 20645 2005.....	63
Tabela 6 - Resultados obtidos na avaliação da actividade antimicrobiana da amostra “UBI Azul” seguindo a norma ISO 20645 2005. ....	64
Tabela 7 - Resultados obtidos na avaliação da actividade antimicrobiana da amostra “UBI PES” seguindo a norma ISO 20645 2005. ....	65
Tabela 8 - Resultados obtidos na avaliação da actividade antimicrobiana da amostra “UBI PES/Alg” seguindo a norma ISO 20645 2005. ....	66
Tabela 9 - Resultados obtidos na avaliação da actividade antimicrobiana da amostra “UBI Alg” seguindo a norma ISO 20645 2005. ....	67
Tabela 10 - Resultados obtidos na avaliação da actividade antimicrobiana da amostra “Ultra-fresh” seguindo a norma ISO 20645 2005. ....	68
Tabela 11 - Resultados obtidos na avaliação da actividade antimicrobiana da amostra “Bioguard”seguinto a norma ISO 20645 2005.....	69
Tabela 12 - Resultados obtidos na avaliação da actividade antimicrobiana das amostras seguindo a norma AATCC-100. ....	71
Tabela 13 - Percentagem de redução bacteriana obtida através da norma AATCC-100 .....	71
Tabela 14 - Resultados obtidos na avaliação da actividade antimicrobiana das amostras seguindo a norma ASTM E 2149 -01.....	73
Tabela 15 - Percentagem de redução obtidos através da norma ASTM E 2149 -01.....	73
Tabela 16 - Resultados obtidos na avaliação da actividade antimicrobiana do produto Ultra-Fresh	79
Tabela 17 - Processos aplicados para neutralização de alguns agentes antimicrobianos .....	92
Tabela 18 - Classificação da actividade antibacteriana .....	96
Tabela 19 - Redução bacteriana obtida.....	96

---

# Justificação do trabalho

---

A indústria têxtil apresenta-se cada vez mais competitiva e agressiva, com as marcas, fabricantes e retalhistas a disputarem as preferências dos consumidores. Neste contexto, verifica-se por parte do consumidor, cada vez mais exigente, uma crescente procura de bem-estar, conforto, funcionalidade e segurança; nem sempre preocupado com o preço a pagar por isso.

Uma última geração de materiais fibrosos, oferece já algumas das características desejadas pelos consumidores, contudo é importante acompanhar este mercado e tentar desenvolver produtos mais eficientes com maior valor comercial para poder marcar posição no mercado de produção de têxteis funcionais.

Para o desenvolvimento de novos materiais têxteis funcionais, é essencial poder testar o seu desempenho. A Análise da actividade antimicrobiana em materiais têxteis envolve técnicas elaboradas de mic\robiologia, muitas vezes mal aplicadas por técnicos e engenheiros da área da tecnologia têxtil.

Esta tese irá servir de guia para elaboração de testes de análise de desempenho antimicrobiano de têxteis, para auxiliar futuras investigações neste tema.

# Fundamentos teóricos

---

## 1. Fundamentos teóricos

### 1.1. Introdução histórica

A aplicação de agentes antimicrobianos em têxteis é feita desde da antiguidade, quando os egípcios usavam especiarias e ervas para preservar múmias. Os agentes antimicrobianos naturais eram usados para inibir o crescimento de bactérias e bolores nos tecidos (Akira A., 1995; Hiroko K., 1990).

Durante a segunda guerra mundial, os tecidos de algodão eram frequentemente usados para tendas e recobrimentos de camiões. Estes tecidos precisavam de ser protegidos do desgaste causado pelo ataque microbiano (Akira A., 1995). No início da década de 1940, o Quartermaster Corps da armada americana recolheu e compilou dados sobre fungos, leveduras e algas isoladas de têxteis provenientes de áreas tropicais e subtropicais de todo o mundo. O “Conton duck”, o “webbing” e outros tecidos militares foram tratados com misturas de sais clorados, sais de cobre e antimónio que endureceram as telas e lhes dão um odor peculiar. Neste tempo, os efeitos poluentes da aplicação destes materiais e a sua toxicidade não eram levadas em consideração.

Após a segunda guerra mundial, na segunda metade da década de 50, usaram-se fungicidas nas telas de algodão, compostos tal como sais de 8-hydroxyquinoline, o naftenato de cobre, o fluoreto de amónio de cobre e fenóis clorados. Tanto o governo como a indústria tornaram-se mais cientes da poluição ambiental causada por estes compostos.

Pesquisaram-se produtos alternativos. Um trabalho considerável foi feito pelo Southern Regional Research Laboratory of the US Department of Agriculture, the Institute of Textile Technology (ITT), no intuito de modificar o algodão de modo a atribuir-lhe maior resistência e outras propriedades através da acetilação e ciano etilação do algodão.

Estes tratamentos não foram bem aceites no mercado devido ao seu alto custo é a perda de resistência do têxtil no processo. Além disso o crescimento do uso de fibras sintéticas tais como o nylon, acrílicos e poliésteres, que têm uma resistência inerente à degradação microbiana, vieram substituir o algodão em muitos têxteis industriais. A prevenção de ataques microbianos em têxteis tem vindo a ser cada vez mais importante para os consumidores e produtores de têxteis. O interesse em tratamentos antimicrobianos para têxteis tem aumentado nos últimos anos. Os grandes grupos de agentes anti-microbianos para têxteis incluem os organometálicos, fenóis, sais de amónio quaternário

e organossilicones. Para ser bem sucedido no mercado, estes tratamentos têm de ser duráveis e ter uma actividade selectiva contra certos organismos indesejados (Yang Y., 2000). São requeridos aos agentes antimicrobianos segurança, não-toxicidade e biodegradabilidade, e os ingredientes activos usados nos tratamentos antimicrobianos têm de ser registados após ter sido demonstrado a segurança no seu uso (Seong HS, 1999).

O primeiro material têxtil antimicrobiano foi desenvolvido em 1867 por Lister que demonstrou a relação entre o material têxtil e as infecções. Actualmente, estudos de infecções fatais ocorridas em hospitais provocadas por bactérias como *Staphylococcus aureus*, e *Pseudomonas aeruginosa*, demonstram que os materiais têxteis são um vector na proliferação microbiana e na transferência de agentes patogénicos (Sun et al., 2001). Assim sendo, os materiais têxteis antimicrobianos são relevantes no sector hospitalar como medida preventiva da transferência e desenvolvimento dos microrganismos patogénicos e consequentes infecções.

## 1.2.Microrganismos nos materiais têxteis

As espécies presentes nos materiais têxteis são essencialmente bactérias e fungos (Akira et al., 2004). As bactérias são seres microscópicos, com um comprimento ou diâmetro normal de 1 a 2 $\mu$ m. As suas estruturas interiores são dificilmente visíveis e não possuem membrana nuclear, uma característica essencial das algas, dos protozoários e dos fungos, bem como das células dos organismos superiores. As bactérias os primeiros organismos patogénicos a ser identificados, embora actualmente os microbiologistas reconheçam existir fungos, vírus e protozoários igualmente patogénicos. As bactérias são os únicos seres que possuem uma parede celular feita principalmente de um polissacarídeo combinado com proteínas (Asimov, 1987). Essencialmente são conhecidas três formas de bactérias, os bacilos, os cocos e os vibriões. Geralmente, quando as bactérias se multiplicam, desenvolvem-se até ao tamanho máximo e dividem-se em duas células. Algumas são capazes de se mover, outras formam esporos, conseguindo resistir ao aquecimento e à desidratação. Nas bactérias não ocorre a reprodução sexuada, embora exista conhecimento de haver em algumas estirpes um tipo primitivo de união sexual. A maioria das bactérias é heterotrófica, dependem da matéria orgânica como fonte de carbono (Miquel et al., 2003).

Existem duas classes de bactérias, as Gram-positivas e as Gram-negativas, de acordo com a presença de uma ou duas membranas celulares, respectivamente (Figura 1). Esta classificação advém

do nome do patologista Danés Gram, que em 1884, encontrou um método para distinguir as diversas estruturas das membranas celulares das bactérias (Miquel et al., 2003).

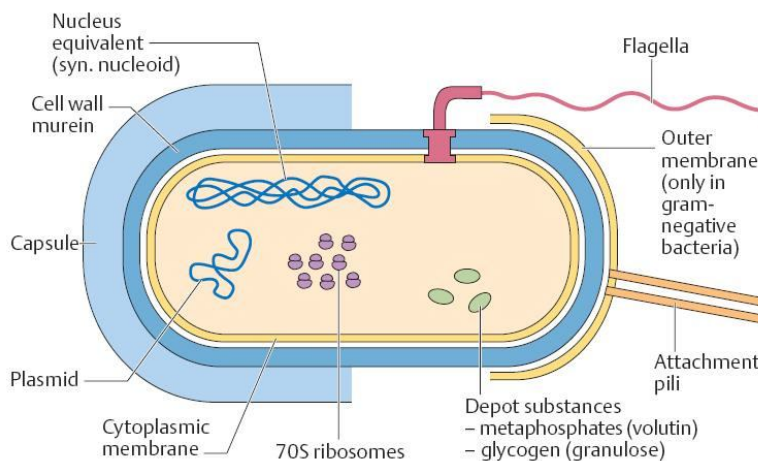


Figura 1 - Estrutura morfológica das bactérias Gram-positiva e Gram-negativa (Kayser, 2005)

Na pele humana encontram-se maioritariamente bactérias Gram-positivas, como as espécies *Staphylococcus* e *Corynebacterium*. As bactérias Gram-negativas, como a *Escherichia coli*, habitam principalmente no intestino grosso. O estudo da estrutura e metabolismo dos fungos é importante para os microbiologistas. O solo normal é rico em fungos de pequenas dimensões e com a forma de pequenos filamentos, que têm várias semelhanças com as plantas. Crescem em filamentos, que posteriormente se ramificam e se propagam através da formação de esporos. Estes microrganismos são relevantes sobretudo nos materiais têxteis em contacto com o solo. No caso da roupa interior, as leveduras assumem muitas vezes o papel de agentes contaminantes que podem provocar infecções (Miquel et al., 2003).

### 1.3.Mecanismo de degradação microbiológica de fibras

O crescimento microbiano nos materiais têxteis depende, naturalmente, da disponibilidade das substâncias nutritivas, nos materiais têxteis e das condições ambientais apropriadas. As fibras celulósicas constituem um óptimo local para a proliferação antimicrobiana pelas suas inerentes características hidrofílicas. A biodegradação da celulose (1,4- $\beta$ -D-glicose) resulta da acção de enzimas de hidrólise da celulose produzidas por bactérias e fungos. Na celulose, as várias unidades

de glicose constituem longas cadeias antiparalelas alinhadas em microfibrilas. As ligações laterais das moléculas estabelecidas por pontes de hidrogénio permitem a formação de regiões cristalinas altamente ordenadas, no interior das microfibrilas, enquanto nas regiões amorfas, não existe ordenamento. Durante o ataque microbiano, actuam três tipos de enzimas que hidrolisam a celulose de forma a libertar a glicose, que é usada como fonte de carbono para o desenvolvimento dos microrganismos. Primeiro, a exoglucanase ou celobiohidrolase, quebra resíduos dissacarídeos (celobiose) de uma forma concertada, nas moléculas terminais não redutoras na região cristalina da celulose. De seguida, a endoglucanase quebra os oligossacarídeos da região amorfa da celulose, numa forma aleatória permitindo depois a uma terceira enzima  $\beta$ -D-glucosidase, hidrolisar a celobiose, celotriose e em menor escala alguns oligossacarídeos da glicose. A quebra hidrolítica da celulose no algodão ou noutras fibras naturais, é contudo, dependente da destruição da cutícula. Só posteriormente à degradação dessa camada é que ocorre a destruição da celulose. As enzimas microbianas, que atacam a cutícula podem ser utilizadas tecnologicamente para alterar algumas das propriedades dos materiais celulósicos. Contudo, o efeito principal destas enzimas é a diminuição do grau de polimerização, com alterações a nível da estrutura química e consequente diminuição na resistência mecânica dos materiais (Kotowa et al., 2004).

O grau de degradação depende largamente do grau de cristalinidade da celulose uma vez que a região amorfa é mais facilmente atacada relativamente à região cristalina. Factores como grau de orientação e o ângulo segundo o qual as fibrilas estão posicionadas em relação ao eixo da fibra, também afectam o processo de deterioração. As fibras de celulose com um elevado grau de orientação são menos susceptíveis ao ataque microbiano. Contudo, a estrutura e morfologia da fibra, as diferenças no comprimento da cadeia e na variação de hemiceluloses, ceras, pectinas e outras substâncias não celulósicas, são determinantes no desenvolvimento microbiano. Essas substâncias são mais susceptíveis ao ataque microbiano, uma vez que, facilitam a entrada dos microrganismos.

A destruição superficial dos materiais têxteis pelos microrganismos é evidenciada pela descoloração e formação de odores desagradáveis. A descoloração pode resultar de substâncias excretadas pelos microrganismos.

O ataque pelas bactérias processa-se desde a superfície da fibra até ao seu interior e está directamente relacionado com elevados níveis de humidade. Das espécies mais comuns realçam-se a *Cytophaga*, *Cellulomonas*, *Cellvibrium*, *Bacillus*, *Clostridium* e *Sprocytophaga*. No que diz respeito aos fungos, após remoção da cutícula, estes penetram através da parede secundária até ao lúmen, local onde se desenvolvem. No algodão, a infecção fúngica inicia e expande-se totalmente nas fibras.

Os esporos alcançam o lúmen da fibra e por quebra da parede originam um crescimento de hyphaes, ocorrendo a formação de mycelium no interior do lúmen. O crescimento do mycelium no interior da fibra, segrega enzimas hidrolíticas que provocam destruição, dando origem a nova formação de esporos num outro local da superfície da fibra, conduzindo à destruição total das fibras de algodão. Entre os fungos envolvidos na degradação dos materiais celulósicos, destacam-se como mais activos os de tipo Chaetomium, Memnoniella, Stachybotrys, Verlicillium, Alternaria, Trichoderma, Penicillium e Aspergillus. Os dois últimos são significativamente importantes, uma vez que incluem espécies que se desenvolvem em condições de fraca humidade relativamente a outros fungos celulíticos. Sob condições de mau armazenamento, a água produzida pelo metabolismo dessas espécies menos exigentes provoca o aumento do grau de humidade do material, dando origem à incrementação do nível de espécies que provocam degradação (Kotowa et al., 2004).

#### **1.4. Compostos antimicrobianos nos materiais têxteis**

Os materiais têxteis são um excelente meio para a proliferação de microrganismos, particularmente bactérias e fungos, devido ao facto de permitirem a retenção ou agirem como fonte de nutrientes para estes seres vivos. Calçado, vestuário desportivo e interior são substratos perfeitos para o crescimento bacteriano e fúngico, uma vez que, são simultaneamente meios húmidos e aquecidos. Materiais sujeitos a exposição exterior prolongada, como “outdoors”, toldos, têxteis-lar, cortinas, vestuário de protecção, geotêxteis, entre outros, também reúnem todas as condições necessárias ao bom desenvolvimento dos microrganismos.

As fibras naturais como o algodão, o linho e a lã são mais susceptíveis ao ataque microbiano que as sintéticas, devido à sua estrutura porosa e hidrofílica que retém água e oxigénio, actuando como fonte alimentar dos microrganismos. Apesar das fibras celulósicas não constituírem uma fonte alimentar directa dos microrganismos, determinados fungos e bactérias segregam enzimas que convertem por hidrólise a celulose em glicose (Purwar et al., 2004). No entanto, as fibras sintéticas, apesar da sua hidrofobicidade, não são totalmente imunes ao ataque microbiano, nomeadamente, as fibras de poliuretano e alguns revestimentos também podem sofrer degradação. Existem ainda produtos de tratamento adicionados durante o processo de fabrico das fibras sintéticas que contribuem para o desenvolvimento microbiano.

A proliferação microbiana provoca nos materiais têxteis inúmeros inconvenientes, nomeadamente, perda de resistência e de alongamento das fibras assim como, descoloração e

alterações no aspecto ou degradação do material. O desenvolvimento dos microrganismos tem também inconvenientes para o próprio utilizador do material. Os microrganismos metabolizam o suor e a urina, por exemplo, e provocam a formação de substâncias que causam mau odor, irritações e mesmo infecções ao consumidor. O metabolismo da bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*, por exemplo, está associado à formação do ácido 3-metil-2-hexenoico, responsável pelo odor do corpo humano e a bactéria Gram-negativa *Proteus vulgaris* é reconhecida pelo metabolismo de ureia a amónia. Assim, o tratamento antimicrobiano nos materiais têxteis tornou-se crucial no combate à proliferação antimicrobiana, permitindo a inibição da degradação dos materiais têxteis e redução da formação dos maus odores.

### **1.5. Requisitos para um tratamento antimicrobiano**

A crescente utilização de materiais antimicrobianos levou a que os critérios de exigência para um tratamento que lhe confira esta propriedade tenham vindo a ser alterados, enfatizando a eficiência e a durabilidade.

Uma vez que a velocidade de desenvolvimento dos microrganismos é normalmente elevada, em condições adequadas, um tratamento antimicrobiano deverá actuar rapidamente, de forma a ser eficaz (Schindler et al., 2005). Para alguns materiais têxteis é exigido um elevado nível de eliminação dos microrganismos, requerendo um agente antimicrobiano de largo espectro de actividade. Para outros, é suficiente uma redução de microrganismos activos. Dependendo do tipo de aplicação, a eliminação dos microrganismos pode ser lenta (horas), ou rápida (segundos). É o caso, por exemplo, de uma cortina separadora usada nos hospitais. Aqui a eliminação dos microrganismos deverá ser lenta, e apresentar um largo espectro de actividade, mantendo a sua actividade durante vários meses. Por outro lado, em materiais como batas cirúrgicas, a eliminação dos microrganismos deve ser rápida, com largo espectro de actividade, mas a durabilidade da actividade pode ser mais reduzida (uma semana), uma vez que na lavagem a actividade pode ser novamente aplicada ou regenerada (Michielsen et al., 2004).

Os compostos antimicrobianos a ser aplicados aos materiais têxteis, devem ser eficientes no que diz respeito à sua actividade antimicrobiana em baixas concentrações, com amplo espectro de actividade antimicrobiana e actuar selectivamente em microrganismos indesejáveis. Devem ainda, cumprir os requisitos exigidos por entidades reguladoras, de forma a serem inofensivos para o produtor e consumidor, e apresentarem um reduzido impacto ambiental. Estes compostos têm ainda

de ser fáceis de aplicar, compatíveis com outros processos químicos envolvidos no tratamento têxtil, de baixo custo e não afectar negativamente as propriedades das fibras. Serem resistentes às condições atmosféricas (luz solar, humidade) e duráveis à lavagem doméstica, à limpeza a seco e à passagem a ferro (Ramachandran et al., 2004; Schindler et al., 2005). Outro dos critérios de selecção para os agentes antimicrobianos é o seu mecanismo de acção. A maioria dos agentes antimicrobianos actuam de forma intracelular, e conseqüentemente, têm de entrar no interior da célula. Alguns, no entanto, actuam por quebra, destruição ou reticulação da parede celular, ou por aumento da sua permeabilidade. Este tipo de agentes antimicrobianos pode actuar no exterior da célula o que permite a sua imobilização na superfície celular. O conhecimento do modo de actuação de um composto antimicrobiano é um factor crucial para a sua aplicação no material têxtil (Michielsen et al., 2004).

Assim, um tratamento antimicrobiano para têxteis tem de cumprir os seguintes objectivos: evitar a infecção por microrganismos patogénicos; controlar a propagação de microrganismos; parar o metabolismo em microrganismos com o intuito de reduzir a formação de odores e de proteger os produtos têxteis de manchas, descoloração e deterioração da qualidade.

Um tratamento antimicrobianos num têxtil pode consistir na::

- Adição de substâncias antimicrobianas à matéria-prima das fibras.
- Modificação envolvendo “grafting” ou outras reacções químicas.
- Tratamentos de têxteis com substâncias activas.

Estas substâncias são fixadas nos materiais do têxtil após um tratamento termal (tingimento, cura) por incorporação nos polímeros e resinas de tratamento.

Os efeitos antimicrobianos resistentes as lavagens são obtidas pela incorporação de microbicidas na solução de matéria-prima que irá originar a fibra, ou através da modificação da própria fibra. Como resultado, o material têxtil fica protegido contra ataques microbianos. No entanto, é necessário que o componente activo seja levado para a célula alvo, pela água por hidrólise, ou pela ruptura do material têxtil. Este é um pré-requisito importante para que o efeito antimicrobiano seja eficaz.

Muitas das substâncias activas sofrem uma redução da sua eficácia ou até uma desactivação como resultado de uma reacção química com a fibra, por isso, esta fibra tratada tem de ser misturada com outras fibras inertes para que não haja este tipo de reacções. Devido á libertação de partículas

antimicrobianos por parte da fibra tratada, esta irá perder o seu poder antimicrobiano ao longo do tempo. Neste caso, a resistência às lavagens é limitada, por isso, tem havido especial interesse neste factor, com o objectivo de prolongar o tempo de vida da fibra antimicrobiana.

Provavelmente, as substâncias com acção antimicrobiana mais antigas são os sais de mercúrio (Cloreto de mercúrio) e prata (nitrato de prata). A introdução da desinfectação anticéptica em feridas e ligaduras com fenol pode ser visto como dos primeiros esforços para combater o grande crescimento bacteriano em têxteis celulósicos adicionando substâncias activas. Mais tarde usaram-se fenóis clorados como o pentaclorofenol e o 2,4,6-triclorofenol em têxteis para tendas e encerrados, no entanto estes já não são usados devido à sua toxicidade. Os mais importantes agentes activos, compostos de amónio quaternários e os produtos baseados em acetato de fenilmercúrio, hexaclorofeno e salicilanido, encontraram uma vasta aplicação como tratamentos. Os tratamentos feitos com estes produtos são menos efectivos na protecção do têxtil contra a sua decomposição (rotting) sob condições desfavoráveis, tal como altas temperaturas e humidade relativa elevada.

Existem grandes vantagens em prevenir a transmissão de organismos patogénicos, inibindo o crescimento microbiano, em neutralizar a decomposição das gorduras e a respiração da pele, sem realmente interferir com a sua formação natural, controlando desse modo o desenvolvimento de odores indesejáveis.

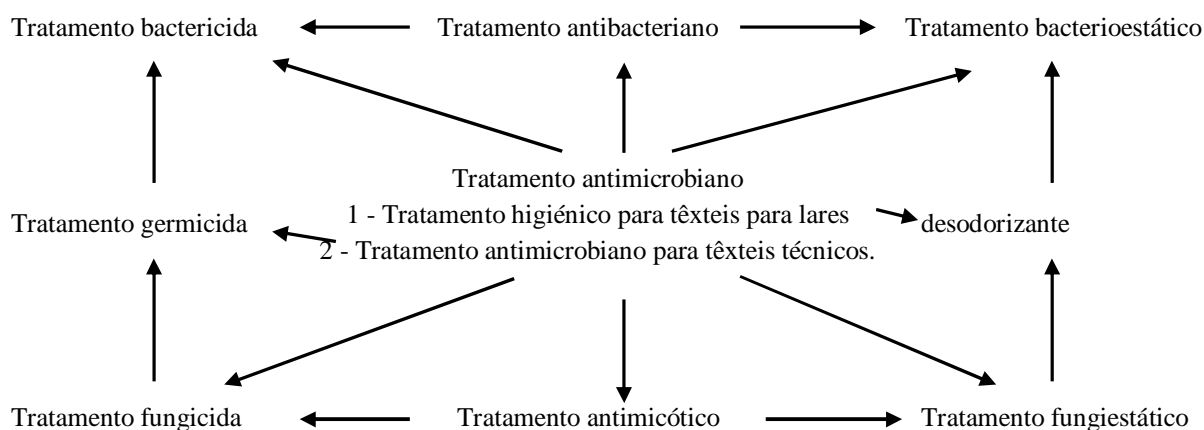


Figura 2 - Diagrama representativo de vários tratamentos antimicrobianos (Ramachandran et al., 2004)

Os tratamentos antimicrobianos devem ser subdivididos nos seguintes tipos (ver imagem 2):

**Tratamento germicida:** tratamentos que destroem germes. São geralmente usados em combinação com tratamentos anti-desgaste;

**Tratamentos higiénicos** (higiene = Ciência que interessada na conservação da saúde): “sanitized finishes”. Eliminação de microrganismos patogénicos pela aplicação de tratamentos apropriados;

**Tratamento antibacterial:** inclui o tratamento bactericida e bacterioestático;

**Tratamento bactericida:** tem como efeito a destruição da bactéria;

**Tratamento bacterioestático:** tem como efeito a inibição do crescimento bacteriano já presentes sem causar a sua destruição;

**Tratamento antimicótico:** tratamento desenhado para matar ou prevenir o crescimento de fungos;

**Tratamento fungicida:** uso de substâncias activas capazes de matar fungos presentes;

**Tratamento fungiestático:** uso de substâncias que têm como efeito a inibição do crescimento de fungos já presentes sem causar a sua destruição dos mesmo ou dos esporos;

**Tratamento algicidal:** o crescimento de algas no têxtil pode ser prevenido pela aplicação de substâncias activas específicas;

**Tratamentos desodorizantes:** tratamentos desenhados para prevenir o desenvolvimento de odores indesejados;

**Tratamentos anti-degradação:** tratamentos desenhados para proteger têxteis contra a acção de bactérias e fungos em condições de armazenamento, isto é, humidade e temperaturas altas.

A finalidade de um tratamento antimicrobiano é:

- Prevenir a transmissão e propagação de um microrganismo patogénico;
- Inibir o aparecimento de odor resultante da degradação microbiana;
- Evitar a degradação da fibra resultante da decomposição devido ao ataque microbiano.

É feita uma distinção entre tratamentos higiénicos em aparelhos e têxteis para lar e tratamentos antimicrobianos para têxteis técnicos. Os requerimentos dados em a) e b) são extremamente importantes para tratamentos higiénicos, o requisito c) é particularmente relevante para o sector dos têxteis técnicos.

Um produto anti-microbiano deve apresentar as seguintes características (Pintado, 2004):

- Não ser tóxico para o homem e ser amigo do ambiente;
- Ser incolor e inodor;
- Ter métodos de aplicação simples;
- Não interferir com corantes e outros tratamentos;

- Não evaporar ao secar e suportar o acabamento térmico;
- Ter longa duração e resistência às lavagens.

As condições para a eficácia dos agentes antimicrobianos são (Pintado, 2004):

- Dimensão da população microbiana;
- Composição da população microbiana;
- Concentração do agente antimicrobiano;
- Duração da exposição;
- Temperatura;
- Envolvente local (Biofilmes, matéria orgânica);
- Compatibilidade com outros agentes;
- Manutenção das propriedades.

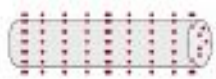


### **1.6.Métodos de aplicação de compostos antimicrobianos nos materiais têxteis.**

Os métodos de aplicação de compostos antimicrobianos podem ser divididos em dois grandes grupos (Andersen, 2005):

- Introdução do composto antimicrobiano na matriz polimérica anterior ou simultaneamente à extrusão, por processos por “melt spinning”, “dry spinning” e “wet spinning”. Este método destina-se a obter fibras intrinsecamente antimicrobianas;
- Aplicação do composto antimicrobiano durante o tratamento dos tecidos e fibras, por processos de impregnação, esgotamento ou revestimento.

Estes métodos, adaptados aos vários tipos de compostos antimicrobianos e substratos, permitem obter produtos têxteis com propriedades antimicrobianas, cumprindo os requisitos de um vasto espectro antimicrobiano e um perfil seguro para o consumidor. No entanto, devido às múltiplas lavagens a que os artigos têxteis são sujeitos ao longo da vida, a durabilidade do tratamento antimicrobiano, é uma exigência fundamental deste tipo de materiais. Assim sendo, o factor de diferenciação do tratamento têxtil encontra-se nas tecnologias que permitem aumentar a permanência do composto antimicrobiano no material têxtil após lavagem. Estas tecnologias podem sumariar-se em três abordagens: libertação controlada, tratamento à superfície da fibra e ligação química à fibra (Mao et al., 2001; 2002). A Tabela 1 relaciona o processo, o substrato e o mecanismo de inserção da funcionalidade com os métodos que actualmente são utilizados para aumento da durabilidade da actividade antimicrobiana nas respectivas fibras.

Tabela 1 - Diagrama representativo de vários tratamentos antimicrobianos (Ramachandran et al., 2004)

Inserção da funcionalidade	Processo	Substrato
<p>Libertação controlada</p> 	<p>Insolubilização de substâncias activas no interior e à superfície da fibra</p> <hr/> <p>Adição de compostos à matriz polimérica</p> <hr/> <p>Microencapsulamento do princípio activo</p>	Fibras Sintéticas
<p>Adsorção à superfície da fibra</p> 	<p>Impregnação com resinas</p> <hr/> <p>Revestimento</p> <hr/> <p>Troca iónica</p>	Fibras Sintéticas e Celulósicas Regeneradas
<p>Ligação química à fibra</p> 	<p>Modificação química da fibra por introdução de grupos reactivos</p> <hr/> <p>Modificação química da fibra por copolimerização de enxerto via química ou fotoquímica</p>	Fibras Celulósicas

As tecnologias que actuam por libertação controlada, nas quais as substâncias activas são libertadas para a superfície do material provocando a destruição dos microrganismos, constituem uma opção viável para as fibras sintéticas, uma vez que os compostos podem ser aplicados antes ou durante os processos de extrusão das fibras. Estas podem ser misturadas posteriormente com as fibras de forma a obter-se um material antimicrobiano. Este método tem a vantagem de originar um produto activo usando uma quantidade mínima de fibras de elevado custo. O objectivo principal deste tipo de tratamento é prevenir a deterioração do próprio material têxtil (Michielsen et al., 2004). Os processos de insolubilização, por aplicação de um composto antimicrobiano, analogamente aos processos por tingimento com corantes dispersos, permitem que o composto antimicrobiano difunda para o interior da fibra. No entanto, estes métodos apresentam limitações no que diz respeito ao consumo do agente antimicrobiano e consequentemente a durabilidade da actividade antimicrobiana. A incorporação de

microcápsulas com o princípio activo antimicrobiano durante os processos de extrusão das fibras ou por revestimento na superfície das fibras é uma metodologia que permite uma duração prolongada da actividade antimicrobiana, durante o ciclo de vida do artigo têxtil, mesmo após lavagens múltiplas (Grabowska et al., 2004, Schindler et al., 2005).

Os materiais têxteis antimicrobianos podem ser obtidos por processos de impregnação que permitem que seja utilizada uma vasta gama de compostos antimicrobianos. Aplicam-se a todas as fibras e são regra geral rápidos e de baixo custo. O desempenho do processo depende em grande medida, da permanência do composto antimicrobiano, que está relacionado com a sua solubilidade. Se o agente for significativamente solúvel em água é rapidamente removido quando sujeito à lavagem. Há substâncias ligantes que são adicionadas para aumentar a sua durabilidade de acção, mas alteram em, grande medida, as propriedades do próprio material têxtil. Este efeito também é observado nos processos por revestimento nas fibras sintéticas (Michielsen et al., 2004). Podem ainda ser utilizados processos por troca iónica, onde são criadas ligações iónicas entre os grupos funcionais do composto antimicrobiano e os locais carregados ionicamente da fibra. Quando o composto antimicrobiano é ligado quimicamente às fibras têxteis há a sua total imobilização e portanto, o processo de inibição ocorre quando existe contacto do microrganismo com a superfície tratada do material têxtil. Esta metodologia permite, obter uma durabilidade da actividade elevada em fibras celulósicas, lã e ainda fibras sintéticas como a poliamida (Mao et al., 2001, 2002).

## 1.7. Nanotecnologia nos têxteis

Os chamados tecidos "inteligentes" ou "funcionais" incorporam hoje uma vasta gama de aplicações da engenharia química, mecânica, e aplicações práticas da nanotecnologia. A nanotecnologia está associada a diversas áreas, como a medicina, electrónica, ciência da computação, física, química, biologia e engenharia de materiais. É uma área promissora, mas que dá apenas os seus primeiros passos mostrando contudo, resultados surpreendentes. Ela surgiu em 1959, quando Feynman defendeu que não existia nenhum obstáculo contra a construção de pequenos dispositivos compostos por elementos muito pequenos, no limite do átomo. (Engo, 2005).

Nos anos 80, o conceito de nanotecnologia foi popularizado por Eric Drexler através do livro "Engines of Creation" (Motores da Criação). Este livro, embora contendo algumas especulações próximas da ficção científica, baseou-se no trabalho sério desenvolvido por Drexler enquanto cientista. Drexler foi o primeiro cientista a doutorar-se em nanotecnologia pelo MIT. A um

bilionésimo do metro corresponde o manómetro, da mesma forma que a um milésimo do metro se designa por milímetro. "Nano" é um prefixo que vem do grego antigo e significa "anão". A nanotecnologia foi desenvolvida para criar e manipular partículas da dimensão de átomos e moléculas. A Tecnologia Nano é a aplicação destas estruturas nano para a obtenção de objectos, elementos e efeitos diversos (Coutinho, 2006).

A possibilidade de manipular átomos individualmente e a sua aplicação na estrutura desejada levou a uma revolução industrial, modificando as formas de produção. Os potenciais benefícios da nanotecnologia são de tal ordem que deram origem a diversas investigações e desenvolvimentos nesta área. A Indústria Têxtil, normalmente vista como uma indústria tradicional, é uma parte muito importante do tecido industrial europeu. O aumento da competição obrigou a uma reestruturação e modernização. A nanotecnologia poderá ser uma das chaves para superar esta competitividade. A nanotecnologia, embora de uma forma muito embrionária, já mostrou que pode ser uma ferramenta para a melhoria do desempenho dos têxteis. A aplicação da nanotecnologia na indústria têxtil ainda é muito recente. Fóruns mundiais ainda são realizados para esclarecer entre os próprios produtores as finalidades deste tipo de tecnologia e a fibra a qual esta vai ser aplicada. Através de materiais nano, muitíssimo pequenos, os fabricantes podem conferir novas propriedades aos tecidos conferindo-lhes novas funcionalidades. A nanotecnologia permite que os tecidos tenham características especiais, como por exemplo, com a aplicação de agentes bactericidas à base de prata, minúsculas cápsulas de agentes hidratantes, desodorizantes, repelentes de insectos e anti-tabaco. Sem a nanotecnologia não seriam possíveis tais aplicações, pois elas ficam entre as fibras dos tecidos. Em escala maior, se partículas fossem aplicadas aos tecidos acabariam influenciando a textura e o toque do tecido, deixando-o áspero (Coutinho, 2006).

De acordo com Frits V. Herbold, 2005, as aplicações têxteis mais promissoras nos próximos anos serão:

- Materiais têxteis com tecnologias electrónicas incorporadas;
- Materiais que ajustam as suas propriedades de acordo com influências internas ou externas;
- Materiais têxteis com maior resistência, anti-estáticos, anti-adesivos ou com protecção UV;
- Micro e nano cápsulas que originam materiais têxteis com fragrâncias, materiais para utilização em aromas e terapias, libertação de fármacos, regulação térmica, e cuidados da pele, etc.

Ao aplicar a nanotecnologia nos têxteis, as nanopartículas podem ser permanentemente presas às fibras e podem ser configuradas para dar ao tecido diversos atributos, de acordo com as condições

ambientais e até monitorar sinais vitais. A incorporação de nanopartículas e nano cápsulas nos têxteis abre um campo inteiramente novo no sentido de melhorar o desempenho das fibras convencionais. As fórmulas físicas das soluções de nanopartículas variam de sólidas até soluções aquosas, pseudo-aquosas, pseudo-emulsões e dispersões. Dependendo de cada aplicação, obtêm-se efeitos mais resistentes e funcionalidades mais acentuadas à lavagem nos materiais têxteis. A figura que se segue mostra um veículo transportador das substâncias nano entre o material têxtil e a pele. Trata-se de cápsulas, que liberam os ingredientes activos por efeitos de temperatura, abrasão ou impacto mecânico.

### 1.8.Mecanismos de acção dos compostos antimicrobianos

O grau de actividade antimicrobiana é diferenciado pelo termo “cida”, que indica destruição significativa dos microrganismos e o termo “estático” que representa a inibição do crescimento microbiano, sem no entanto, existir destruição dos microrganismos. Assim sendo, os tratamentos antimicrobianos que inibem o crescimento e desenvolvimento dos microrganismos são geralmente denominados como biostáticos, bacteriostáticos e fungistáticos, ao invés, os produtos antimicrobianos que destroem os microrganismos, são designados como, biocidas, bactericidas e fungicidas (Ramachandran et al., 2004; Schindler et al., 2005). Os agentes antimicrobianos inibem ou destroem os microrganismos de várias formas. Quando a célula microbiana, (Figura 3), é exposta a um agente letal, são observadas várias alterações no seu comportamento (Miquel et al., 2003).

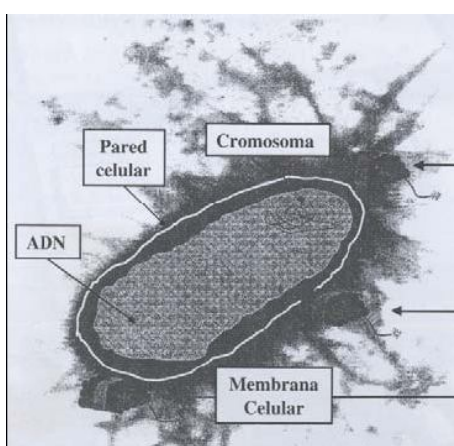


Figura 3 - Comportamento da célula microbiana quando exposta a uma agente letal (Miquel et al., 2003).

Normalmente, uma célula microbiana viva contém uma multiplicidade de enzimas responsáveis pelo seu metabolismo. A membrana citoplasmática semipermeável mantém a integridade do interior celular, controla selectivamente a passagem de substâncias entre a célula e ambiente exterior e é normalmente, o local para ocorrência de reacções enzimáticas. A parede celular actua como uma camada protectora, além de participar em certos processos fisiológicos. A degradação da membrana ou da parede celular pode induzir uma série de modificações, levando à sua ruptura total. A forma como o agente antimicrobiano inibe ou destrói os microorganismos, pode ser atribuída a vários factores, como sendo, degradação da parede celular ou inibição do seu metabolismo, alteração da permeabilidade da membrana citoplasmática, variação do estado físico e químico das proteínas e ácidos nucleicos, inibição da síntese dos mesmos e impedimento da acção enzimática (Purwar et al., 2005). O mecanismo antimicrobiano mais comum, ocorre ao nível da parede celular, sob a forma de:

**Polimixinas:** Ligam-se à membrana, entre os fosfolípídeos, alterando sua permeabilidade (detergentes). São extremamente eficientes contra Gram negativos, pois afetam tanto a membrana citoplasmática como a membrana externa.

**Ionóforos:** Moléculas hidrofóbicas que se imiscuem na Membrana citoplasmática, permitindo a difusão passiva de compostos ionizados para dentro ou fora da célula (Ilustração 4).

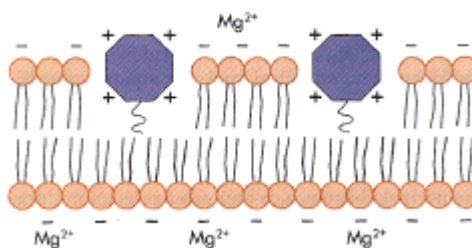


Figura 4 - Exemplo de um antibiótico que atua como ionóforo (Adaptado de Atlas, R.M., Principles of Microbiology, 1997).

Os compostos antimicrobianos podem ser classificados em dois grandes grupos de acordo com a possibilidade ou não de migrar no material têxtil:

O primeiro grupo actua por um mecanismo convencional de libertação controlada, no qual, a substância é lentamente libertada na superfície da fibra ou no seu interior. Neste tipo de actuação, denominado como “leaching”, o composto antimicrobiano é eficiente, no que diz respeito, à sua actuação na superfície da fibra e no ambiente circundante da mesma. Contudo, como estes compostos migram da superfície da fibra onde foram aplicados para o exterior, o que origina um consumo

significativo do composto, e conseqüentemente uma diminuição da eficácia e durabilidade do tratamento. Acresce o facto, da difusão ou migração do composto para o exterior, originar a ocorrência de interferências com outro tipo de microrganismos indesejáveis provocando multi-resistência, devido à mutação e selecção dos microrganismos. Assim sendo, quando um composto antimicrobiano do tipo “leaching” é aplicado em materiais têxteis em contacto directo com o corpo, existe um risco potencial associado à possível difusão e conseqüentemente absorção do composto pela pele. Desta forma, afecta a flora bacteriana normal da pele, originando alergias, irritações, entre outros efeitos indesejáveis (Ramachandran et al., 2004; Schindler et al., 2005).

O segundo tipo de compostos antimicrobianos consiste em produtos que são quimicamente ligados às superfícies das fibras. Estes compostos afectam o controlo microbiano presente na superfície das fibras, sem possibilidade de libertação ou migração para o ambiente circundante. Devido à sua ligação química com as fibras não perdem a sua eficácia, fornecendo um tratamento permanente que retém a sua funcionalidade durante o ciclo de vida do artigo têxtil. Este tipo de compostos antimicrobianos como não difundem para o exterior, são menos absorvidos pela pele e conseqüentemente potencialmente mais inócuos para o utilizador (Kotowa et al., 2004).

Distinguem-se ainda, duas categorias de actividade passiva e activa antimicrobiana. Os materiais com carácter passivo, não contêm substâncias activas, mas a estrutura da sua superfície (Efeito Lotus) produz um efeito negativo nas condições de vida para o desenvolvimento dos microrganismos. Os materiais com carácter activo contêm substâncias antimicrobianas activas, que actuam sobre ou no interior da parede celular do microrganismo (Ramachandran et al., 2004).

As substâncias antimicrobianas actuam de diferentes formas. No tipo convencional de tratamento, o produto difunde-se e destrói os microrganismos. Este tipo de tratamento mostra uma fraca durabilidade e pode causar problemas para a saúde.

O tipo de tratamento que não se difunde ou bio-estático apresenta uma boa durabilidade e não provoca nenhum tipo de problemas para a saúde. Um grande número de têxteis com tratamentos antimicrobianos funciona por difusão. A taxa de difusão tem um efeito directo na eficácia do tratamento. Um grande número de têxteis com tratamentos antimicrobianos actua por difusão. Estes tratamentos são considerados superficiais no sentido de não serem 100% permanentes, devido à sua natureza difusiva; usualmente, a difusão coresponde à perda de agente activo. Por exemplo, no processo de troca de iões, a libertação de substâncias activas é feita muito mais lentamente comparada à difusão directa e tem uma acção muito mais fraca. É possível no entanto, ter uma quantidade suficiente de substância activa para o tempo de vida do produto (Ramachandran et al., 2004).

## **1.9.A importância do tratamento antimicrobiano em têxteis**

A infestação microbiana apresenta inúmeros problemas para o utilizador do material têxtil. Esta contaminação é normalmente provocada por fungos e bactérias, embora, sob condições de humidade significativa, possa ocorrer o desenvolvimento de algas que actuam como fonte de nutrientes aos fungos e bactérias. Estes microrganismos provocam degradação do próprio material e efeitos indesejáveis, no que se refere à funcionalidade, condições higiénicas e estéticas. Relativamente aos fungos, causam múltiplos problemas nos têxteis, nomeadamente, descoloração, manchamentos e degradação da própria fibra. As bactérias, apesar de não deteriorarem totalmente a fibra, afectam as suas propriedades, provocando maus odores e toques desagradáveis (Schindler et al., 2005).

A diminuição da proliferação microbiana não é conseguida por controlo das condições físicas do meio ambiente, nem mesmo nos processos de lavagem frequentes, à excepção da lavagem à fervura, desaconselhável na maioria dos materiais têxteis. Assim sendo, o tratamento antimicrobiano surge como o potencial meio de controlo da infestação microbiana, uma vez que, diminui/elimina o risco de infecções provocadas pelos microrganismos, nomeadamente, patogénicos. A inibição do metabolismo microbiano reduz a formação de odores desagradáveis no utilizador e protege o material têxtil (Ramachandran et al., 2004; Schindler et al., 2005).

## **1.10. Importância dos têxteis hospitalares**

As Instituições de Saúde, em especial os Hospitais, são entidades complexas, que exigem profissionais e pessoas capacitadas para gerirem e trabalharem em determinados serviços e sectores, no sentido de atingirem o mesmo objectivo: prestar bons serviços aos utentes. Para isso necessitam de uma infra-estrutura de suporte para atingir todas as suas formalidades. Esta infra-estrutura depende de todos os sectores, serviços e secções existentes dentro das Instituições.

A tentativa de conseguir a infra-estrutura necessária ao bom desempenho dos profissionais de saúde originou que, ao longo dos últimos tempos, fosse prestada uma maior atenção à sua segurança e à segurança do paciente (Descarpack,2003).

Os hospitais são o local ideal para as bactérias, vírus e muitos outros microrganismos, poderem ser transmitidos de uma pessoa para outra. Embora a grande maioria das infecções hospitalares possua uma origem endógena, elas transmitem-se principalmente pelo desequilíbrio entre a flora

microbiana normal de um doente e os seus mecanismos de defesa. É um desequilíbrio provocado por determinadas doenças responsáveis pela sua hospitalização, a que se juntam também a utilização de procedimentos clínicos invasivos que constituem portas de entrada a microrganismos cada vez mais resistentes a antibióticos. É relativamente a estas últimas transmissões que podem ser tomadas medidas de forma a dificultar a sua propagação, através de alguns princípios práticos que se podem implantar (Gomes, 2004).

Os materiais têxteis são um bom meio para o crescimento de microrganismos, particularmente as bactérias resistentes, as quais têm causado uma grande preocupação na saúde pública (Takai, et al; 2002). Os materiais têxteis são portadores de bactérias patogénicas, de bactérias geradoras de odores e da maioria dos fungos (Sun; et al; 1998). Isto deve-se à adesão destes microrganismos à superfície destes materiais. Desta forma, a maior parte dos materiais têxteis utilizados em hospitais são condutores e transmissores de infecções e doenças através destes microrganismos. Embora haja falta de evidências directas de infecções causadas pelos têxteis contaminados, as melhores condições de higiene em ambiente hospitalar estão sempre associadas a uma menor contaminação de microrganismos e, assim, a um menor número de infecções. Por conseguinte, as propriedades bactericidas devem constituir uma condição necessária para os têxteis de uso médico (Takai, et al; 2002).

O contágio de doenças tais como o HIV e a Hepatite, através do contacto com materiais contaminados, originou uma forte preocupação para a protecção dos profissionais através do uso de fardamentos e matérias funcionais (Sun; et al; 1998).

O risco de uma infecção nosocomial pode afectar, tanto o paciente, como a equipa hospitalar. Nos pacientes, este risco está associado ao seu estado imunológico, ao tipo de intervenção a que está submetido, ou à falha a nível de esterilidade e higiene do meio envolvente, inclusive ao incorrecto tratamento de manutenção dos têxteis hospitalares. Nos profissionais de saúde, o risco de infecção está associado ao manuseamento de artigos mal higienizados, à falta de equipamento e cuidados de protecção (Sun; et al; 1998).

Apesar do avanço sobre o conhecimento de infecções de origem hospitalar, as que resultam da MRSA (por exemplo, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina) constituem ainda um problema do ponto de vista clínico e a *Pseudomona Aeruginosa* é frequentemente detectada em infecções hospitalares, especialmente nas unidades de cuidados intensivos. Os organismos infecciosos podem ser introduzidos através de outros pacientes ou do pessoal, ou podem ser introduzidos pelo próprio paciente. As bactérias *Staphylococcus* são espalhadas pelo movimento dos artigos contaminados, tais

como roupa de cama, cortinados dos quartos e vestuário de protecção dos enfermeiros. A contaminação generalizada da *Pseudomona* tem sido encontrada em locais húmidos dos hospitais e é frequentemente considerada como sendo transmitida pelo contacto entre as pessoas. Para evitar e controlar a disseminação das infecções hospitalares é necessário eliminar as fontes de infecção e avaliar as vias de transmissão e a susceptibilidade do hospedeiro (Sun; et al; 1998).

Toma-se necessário encontrar formas de prevenir essas infecções, protegendo não só os pacientes mas também os profissionais de saúde. Os materiais têxteis utilizados nos Hospitais, quando usados de forma inadequada, podem funcionar como uma forma de propagação de doenças, infecções e transmissões de micróbios e bactérias. Por este motivo, os cuidados de saúde têm-se tomado aspectos muito importantes na Indústria Têxtil (Sun; et al; 1998).

Actualmente os Hospitais têm bem assente que a inadequada utilização dos materiais têxteis pode gerar impactos negativos ao nível da saúde de todos os envolvidos no ambiente hospitalar. [Mendes, 2003] A utilização de artigos de baixa qualidade, ou com uma inadequada higienização, pode em alguns casos causar infecções ou propagação de doenças (Hardingham, et al; 1994).

A selecção das matérias têxteis nos hospitais deveria ser realizada tendo em conta aspectos de segurança a nível de possíveis contaminações e transmissões de doenças, a nível de higiene, problemas ambientais, bem como os custos que estes produtos acarretam. O processamento dos têxteis dentro dos hospitais deve ser dirigido de forma a que estes não representem um veículo de infecção e contaminação para os pacientes e para todos os envolvidos nesta área. Recentemente, têm sido aceites para utilização clínica muitos produtos têxteis com acabamento antimicrobiano, com vista a impedir a transmissão de doenças. Estes têxteis contêm agentes antimicrobianos tais como prata, cloreto de amónio quaternário e quitano, os quais apresentam actividade antibacteriana contra uma vasta gama de microrganismos (Sun, et al; 2002).

### **1.11. Importância dos têxteis cirúrgicos**

Uma infecção nosocomial existe em todo mundo, tanto nos países desenvolvidos como nos mais pobres. As infecções adquiridas em instituições de saúde estão entre as mais importantes causas de morte e aumento da mortalidade nos doentes hospitalizados. As infecções nosocomiais mais

frequentes são as infecções das feridas cirúrgicas, sendo que a prevalência destas infecções é mais elevada em Unidades de Cuidados Intensivos e Serviços Cirúrgicos e Ortopédicos.

Os custos associados a estas infecções são consideráveis, sendo o prolongamento do internamento o que mais contribui para estes custos. Um estudo demonstrou que o aumento na demora média da hospitalização de doentes com infecção do local cirúrgico foi de 8,2 dias, variando de 3 dias para a cirurgia ginecológica, 9,9 para a cirurgia geral e 19,8 dias para a cirurgia ortopédica. Os internamentos prolongados não só aumentam os custos directos dos pacientes, como também os custos indirectos, nomeadamente a utilização de fármacos, a necessidade de isolamento, o recurso a estudos laboratoriais e outros meios de diagnóstico. A infecção nosocomial leva a problemas que são potencialmente evitáveis (Ducel, et al; 2002).

Na Europa estima-se que o número de mortes provocadas por infecções surgidas nas salas de operações pode atingir 50.000 por ano. Nos últimos anos tem-se feito muito trabalho de pesquisa sobre a preparação da sala cirúrgica, a preparação asséptica das mãos dos cirurgiões, das máscaras cirúrgicas, da esterilização dos instrumentos e suturas. A protecção adequada entre o doente e a equipa cirúrgica pode ser assegurada essencialmente pelas batas e outro vestuário de protecção (Ramos, et al; 2003).

As pessoas são a principal fonte de bactérias na sala cirúrgica, ou seja os funcionários e o paciente. As vias de transmissão destas bactérias são através do ar e por contacto. A concentração de bactérias presentes no ar é proporcional à actividade desenvolvida e número de pessoas presentes, sendo a equipa cirúrgica, a responsável pela dispersão da maioria das bactérias transportadas por via aérea. Estas bactérias irão depositar-se por gravidade na ferida cirúrgica. As fontes secundárias de infecção são aquelas que recebem as bactérias dos reservatórios principais, ou seja as mãos enluvadas, as batas, as máscaras, os campos cirúrgicos e outros instrumentos de cirurgia (Whyte, 1988; Werner, et al; 1991).

As batas dos cirurgiões e os campos cirúrgicos que são utilizados na zona circunjacente à sala cirúrgica são, mais ou menos aceites como adequadas, sem exame prévio. A tradição diz que uma ou mais camadas de vestuário de algodão esterilizado são eficazes como barreira asséptica entre a roupa interior do cirurgião e o campo cirúrgico. Uma ou mais camadas de lençóis de algodão ou toalhas são geralmente consideradas uma barreira eficaz entre uma mesa operatória e os instrumentos esterilizados usados na cirurgia e entre o corpo do paciente (Beck, et al; 1952).

Na verdade, diversos estudos provaram a veracidade destas hipóteses, sob condição de que "elas estejam secas". Se ficarem húmidas, todas as camadas de roupa se tornarão crivos para a passagem das bactérias. Isto aplica-se no caso de o agente ser água, plasma ou solução salina.

De acordo com Beck, et al, 1952, Colebrook e Hood demonstraram que quando se empregam roupas húmidas, as bactérias da camada externa das roupas passam imediatamente para o interior. É mais do que evidente que a roupa húmida não funciona como barreira contra a contaminação bacteriana. Isto significa que se torna necessário adoptar determinadas alterações técnicas, para evitar este risco. Para evitar este tipo de infecção, está a ser desenvolvida uma norma europeia sobre os requisitos básicos e métodos experimentais para a eliminação e reutilização de materiais para protecção dos pacientes, pessoal cirúrgico e equipamento da sala de cirurgia, ou seja, batas e campos cirúrgicos. Esta rotina destina-se a clarificar a situação no que respeita aos produtos e suas características, definindo os requisitos básicos para os utilizadores e fabricantes de produtos médicos (Beck, et al; 1952).

Dadas as condições cirúrgicas reais, em especial a pressão mecânica e os líquidos usados na cirurgia, é um facto comprovado que a bactéria da pele dos pacientes penetra nas roupas e panos cirúrgicos menos apropriados, que não são antimicrobianos, quando sujeitos a pressão. Assim, as bactérias da pele passam para a equipa cirúrgica através de instrumentos contaminados e luvas cirúrgicas ou através da mesa de operações para a incisão, durante a cirurgia. Por este motivo, terão que ser utilizadas fardamentos e campos suficientemente eficazes na protecção antimicrobiana durante toda a cirurgia. O campo cirúrgico deve englobar todas as áreas expostas à pressão mecânica ou à utilização de fluidos na proximidade da incisão cirúrgica, assim como as áreas onde os instrumentos são colocados (Patel, et al; 1998; Whyte; 1988).

Não devemos subestimar o facto de os mesmos requisitos terem que abranger toda a superfície das batas cirúrgicas, tanto para proteger o paciente, como a equipa cirúrgica. Isto inclui as áreas expostas à pressão mecânica e aos líquidos, - as partes da frente das batas cirúrgicas, as mangas até aos cotovelos e, dependendo do tipo de cirurgia, possivelmente até às cavas (Patel, et al; 1998).

Pelo exposto, torna-se claro que, tanto o paciente, como a equipa cirúrgica, são fontes de infecção muito importantes. O paciente tem que ser protegido de si próprio, por assim dizer, e da equipa cirúrgica.

No futuro, a utilização dos têxteis de algodão e misturas convencionais de algodão/poliéster é incerta, dado que estes poderão não corresponder aos requisitos da nova norma, i.e., resistência à

penetração de microrganismos microbiológicos e de líquidos e libertação de partículas. No entanto, existem batas e panos cirúrgicos de reutilização inovadores, que respeitam os requisitos básicos da norma, feitos em materiais de micro-filamentos que repelem os líquidos, materiais laminados e talvez algum algodão e polyester específico, que tenham sido modificados quimicamente, transformando-os em artigos bactericida.

Cada vez mais, serão exigidos sistemas de garantia de qualidade para dar prova de descontaminação, desinfecção e esterilização dos têxteis cirúrgicos. Processos específicos terão que ser adoptados, afim de se manterem as características dos materiais após o seu reprocessamento. Pelo risco da responsabilidade por si só, a questão de quais os materiais cirúrgicos a utilizar no futuro deve ser avaliada cautelosamente (Patel, et al; 1998).

### **1.12. Têxteis hospitalares antibacterianos**

O contacto entre o corpo e o material têxtil fomenta a sua contaminação, já que nos tecidos, os microrganismos encontram as mesmas condições para a sua proliferação, que encontram na pele (Bohringer, A, 1998).

Vários estudos têm sido desenvolvidos no sentido de que uma intervenção cirúrgica não seja afectada pelas bactérias. Uma das soluções apresentadas é através da utilização de tecidos bactericidas ou antimicrobiais. Com o melhoramento das condições de vida humana desenvolveu-se uma nova área no domínio do acabamento têxtil. O controlo de microrganismos nos tecidos têxteis estende-se a diversas áreas, desde o ambiente hospitalar até às nossas casas. Independentemente do facto dos tecidos serem frutos exclusivamente de fibras naturais ou sintéticas, nem umas, nem outras, oferecem resistência aos fungos patogénicos ou bacterianos. Por este motivo, têm sido desenvolvidos para todos os tipos de tecidos, diversos acabamentos antibacterianos e técnicas de desinfecção. Durante muito tempo, os agentes químicos para controlar os microrganismos iam desde substâncias muito simples, como iões de halogéneo, até aos compostos mais complexos, representados pelos detergentes. Muitos destes agentes têm sido empregues de geração em geração, enquanto outros representam os mais recentes desenvolvimentos (Lee, et al; 2003).

Os agentes antimicrobianos e antibacterianos são substâncias activas que evitam a proliferação de micróbios e bactérias, respectivamente. Desde há muitos anos atrás que estas substâncias têm sido utilizadas. Por exemplo, no Egipto antigo, eram utilizadas para preservar as múmias (Lindemann, 2002).

A necessidade de preservar os tecidos contra manchas e odores levou a que estas substâncias fossem aplicadas nos têxteis. Existe cada vez mais informação demonstrando que a sobrevivência e desenvolvimento de microrganismos nos têxteis podem representar um risco para a saúde, o que reforça ainda mais a necessidade de introduzir nos tecidos as propriedades antibacterianas (Richard, et al; 2005).

Embora já existam diversos acabamentos têxteis bactericidas para vestuário hospitalar, a sua utilização para este fim não foi prontamente aceite.

A gama de bactérias reduzida, pouca durabilidade à lavagem, inibição de segurança inadequada às necessidades actuais, ou uma combinação destes factores, têm impedido a sua utilização. Consequentemente, é necessário um acabamento têxtil seguro e resistente à lavagem, capaz de inibir o desenvolvimento de bactérias e fungos, representando assim uma solução imediata e eficaz para os Hospitais (Richard, et al; 2005).

### **1.13. Têxteis antimicrobianos à base de partículas de prata**

#### **1.13.1. A prata como agente antibacteriano**

A prata é um composto que tem vindo a ser utilizado como um agente antimicrobiano ao longo dos anos. O composto de prata com maior interesse terapêutico hoje em dia é a sulfadiazina de prata (AgSD). No entanto sabe-se que outros compostos de prata são usados actualmente. Em 1000 a.C., apareceu o primeiro registo do uso da prata de forma medicinal, já que se utilizavam recipientes de prata para armazenar a água, pois estes, expostos à luz solar, tornavam a água potável. Já Alexandre Magno (335 a.C.) armazenava a água em recipientes de prata para que esta fosse transportada durante as suas campanhas. Antes de ser usada, esta era fervida e assim garantida a sua potabilidade.

Do ponto de vista terapêutico, é interessante notar que em 1881 Créde publicou uma monografia onde era afirmado que o uso da prata na prevenção das infecções dos olhos era possível. De acordo com Russel e Hugo, 1994, as diversas experiências efectuadas com a prata, levam à conclusão que a prata no seu estado puro não tem qualquer actividade antibacteriana, já que esta característica se deve à libertação de iões  $Ag^+$ . Gíbbard também verificou que o óxido de prata, soluções coloidais de prata e nitrato de prata eram sempre possuidores de actividade antibacteriana (Russel, et al; 1994).

Desde que a prata foi declarada como um anticéptico, tem sido muito utilizado pelas suas propriedades antibacterianas e farmacológicas. Enquanto muitas soluções de prata têm sido aplicadas por técnicas farmacológicas tradicionais, tem aumentado o interesse no uso deste metal como um incorporante dos medicamentos ou vestuário de protecção. No entanto, para este tipo de utilização, é importante perceber a biocompatibilidade deste metal e dos seus derivados.

A biocompatibilidade está dividida em quatro grupos:

- O processo químico e físico da reacção entre a superfície do tecido e do material;
- A corrosão e degradação do material;
- O desenvolvimento e resposta do hospedeiro;
- Os efeitos provocados pelo implante ou pelo contacto (RL, et al; 1989)

A abordagem deste tema em algumas investigações levou à conclusão de que a prata possui diversas propriedades biológicas, inibição da acção das enzimas, propriedades antibacterianas, e um comportamento citotóxico sob algumas condições. Demonstraram ainda que pode ser transportada e armazenada sistemicamente no corpo. Todas estas propriedades podem ser consideradas como respostas activas em termos de implante, concebido para ser incorporado no corpo com uma resposta biológica mínima (RL, et al, 1989).

Demonstraram ainda que a incorporação da prata em medicamentos ou dispositivos médicos pode ser considerada um benefício quando se pretende fazer uso de algumas propriedades biológicas, como por exemplo, o comportamento antimicrobiano (RL, et al, 1989). O composto mais conhecido na medicina usado como agente antimicrobiano, para o tratamento de feridas, trata-se de um creme tópico que contém 1 % de sulfadiazina de prata (como por exemplo a "sulfazine") (Silver, 2003).

Recentemente Incorporou-se sulfadiazina em lenços e gazes utilizadas para tratamento de feridas abertas e queimaduras. Este composto é conhecido por ser absorvido rapidamente pelas feridas (Russel, et a; 1994).

A AgSD promove a rápida cicatrização das feridas e é útil no tratamento de diversas queimaduras e úlceras crónicas de pressão. No sentido de retardar a absorção da prata, foram sintetizados alguns compostos dando origem ao composto AgSD, um sal de prata que difere dos outros sais também de prata pelas suas propriedades físicas. Não reage rapidamente com cloreto ou grupos tiol, ou com proteínas e apresenta uma elevada capacidade antibacteriana (Silver, 2003).

Em 1956 foi introduzido o nitrato de prata como antibacteriano tópico para profilaxias de queimaduras. Foi demonstrada a actividade bactericida contra a *Pseudomona Aeruginosa*. No entanto, outros organismos como a *Klebsiella* mostraram-se resistentes. Comparativamente com a sulfadiazina de prata, esta mostra maior efeito inibidor contra a *Klebsiella*, mas menor contra o *Staphylococcus aureus* (Russel, et al; 1994).

Os polímeros impregnados com prata têm sido utilizados nos dispositivos médicos, tais como, cateteres e válvulas coronárias, no sentido de prevenir o crescimento de biofilmes de bactérias.

Os cateteres impregnados com compostos de prata permitem retardar a formação de filmes microbianos e a infecção nosocomial por bactérias. Os compostos de prata têm sido utilizados em águas de hospitais e de hotéis para controlar agentes infecciosos como, por exemplo, a *Legionella* (Silver, 2003).

A prata foi utilizada para esterilizar a água abordo da estação espacial Russa MIR. As unidades purificadoras de água existentes nos supermercados dos EUA contêm nos filtros um composto de carbono activado e prata. Desta forma pode ser afirmado que a prata é um agente bactericida cujo elevado grau de importância deve ser considerado. Os efeitos adversos do uso de antibióticos para o controlo de uma infecção são o favorecimento do aparecimento de resistências (devido às concentrações sub terapêuticas), consequentemente com custos desnecessários e reacções alérgicas. Existem actualmente no mercado vários pensos contendo anticépticos em que o mesmo é libertado em pequenas doses, de forma contínua, produzindo um efeito antibacteriano sustentado e eficaz no controlo da carga bacteriana, Os principais anticépticos neste contexto são os derivados do iodo e da prata, Tanto um, como o outro, têm um aspecto antibacteriano alargado, boa penetração nos tecidos da ferida e a sua incorporação em pensos permite grande versatilidade, podendo dar resposta a necessidades das feridas como absorção do exsudado, controlo de odor, alívio da dor, etc., Os pensos silvercel, como já foi referido anteriormente, são um exemplo deste tipo de produtos (Yuranova, et al; 2005).

A prata é conhecida pelas suas propriedades “purificantes” há alguns milénios. A prata não só neutraliza a actividade bacteriológica, mas também acelera o processo de cicatrização da pele. A grande vantagem deste é a sua baixa toxicidade. A eficácia da tecnologia dos iões de prata é hoje largamente aplicada numa gama de fibras e tecidos com o objectivo de conferir protecção antimicrobiana. Esta tecnologia pode ser útil na minimização da presença de numerosos tipos de organismos microbianos (Fluhr et al, 2005). As fibras com prata, atacam a estrutura molecular das

bactérias eliminando o hidrogénio do DNA provocando a sua morte. Os iões de prata conseguem eliminar 99% das bactérias em menos de uma hora (Dziworska et al, 2005; Fluhr et al, 2005).

Várias empresas têm desenvolvido materiais antimicrobianos em que o ião prata é aplicado por revestimento na superfície das fibras. Esses materiais apresentam uma elevada actividade antimicrobiana, mas a cor dos artigos finais é afectada negativamente (Michielsen et al., 2004). Os têxteis de prata pura permanecem um artigo dispendioso, pois são feitos através da impregnação de uma solução de nanopartículas de prata fixadas á superfície da fibra por agentes ligantes ou por incorporação dentro da fibra. A fibra de prata oxida ao longo do tempo mas muito lentamente. No entanto, sucessivas lavagens poderão acelerar o processo de degradação causado pela oxidação apesar da permanência da prata mesmo após 250 lavagens. A chave para do sucesso do efeito antimicrobiano das fibras com prata está na limitação da oxidação. Quando a prata está completamente inserida na fibra, a oxidação é muito mais lenta que no caso da prata estar na superfície.

Têm sido usadas impregnações com sais de prata e de zinco em compressas, uma vez que apresentam largo espectro de actividade antibacteriana e inocuidade para o utilizador. A actividade não é rápida mas apresenta uma eficiência prolongada uma vez que o tempo de contacto na superfície húmida da ferida é normalmente longo. Os iões de prata em condições normais de utilização, não são tóxicos, contudo, o seu uso prolongado em feridas, pode causar pigmentação no corpo devido à captação pela pele de quantidades elevadas de ião prata. Embora, a utilização de iões prata se esteja a difundir nos materiais para aplicações médicas o seu modo de acção não causa preocupações, no que diz respeito, à resistência a antibióticos. A resistência à prata não é um processo incomum, por certas espécies bacterianas, mas não parece provável que essa resistência ocorra em utilizações de compressas. A prata apresenta reputação favorável em têxteis médicos, e portanto, formulações baseadas nesta tecnologia são bem aceites pelas entidades reguladoras. As tecnologias para obter fibras sintéticas antibacterianas à base de ião prata, são actualmente produzidas usando nanopartículas e bombardeamento de iões. Apesar de todas estas vantagens, a prata não poderá nunca ser considerado tratamento antimicrobiano de eleição. Infelizmente, não é eficiente contra todos os tipos de bactérias, apesar de se r muito eficiente contra bactérias Gram-positivos responsáveis pelos odores, a prata tem apenas um pequeno efeito contra as bactérias Gram-negativo e na maior parte dos vírus. O principal inconveniente da tecnologia de prata é a sua ineficácia contra fungos (Williams et al., 2005).

### **1.13.2. Efeito antibacteriano das nanopartículas de prata nos têxteis**

A utilização de materiais e sistemas de estruturas nano têm atraído muitas atenções pelas suas potenciais aplicações nas áreas técnicas. Interessa focar neste estudo de caso o campo bactericida dos tecidos têxteis. Tal como foi referido anteriormente, as soluções de aglomerados de prata têm vindo a ser utilizadas no tratamento de infecções, devido às suas propriedades naturais bactericidas e fungicidas. A Química tem revelado que um sedimento de prata não é tóxico relativamente às células humanas in vivo e têm-se registado a sua compatibilidade.

A prata impede o transporte de catiões vitais nos poros das membranas celulares microbiais, afectando o sistema de transferência electrónica, necessária ao metabolismo bacteriano básico. Registou-se ainda que este elemento não dá origem a nenhum problema de criação de resistência bacteriana, tal como acontece com os bactericidas comuns (Yuranova, et al; 2005).

Vários novos agentes antibacterianos dos têxteis à base de soluções de metal ( $\text{CuSO}_4$  ou  $\text{ZnSO}_4$ ) foram recentemente desenvolvidos. O interesse da utilização das propriedades da prata nos tecidos também tem vindo a aumentar (RL, et al, 1989). Os sais de prata têm, no entanto, algumas limitações biológicas para serem utilizados como bactericida. O tamanho do cristal de prata e a dispersão dos aglomerados de prata nos tecidos representariam um problema para a sua adesão nas fibras (Williams, et al; 1994). Diminuindo o tamanho de cristais de prata, a dispersão dos aglomerados de prata e a prata radioactiva, a área de contacto disponível par reacções químicas aumenta. Desta forma a produção de preparados de prata através da nanotecnologia parecem promissores (Yuranova, et al; 2005).

Um dos principais interesses destes materiais nano estruturados é o facto de terem uma área de superfície maior do que os materiais convencionais. Por esta razão, um pequeno número de nano partículas de prata podem perfeitamente dissipar-se para a superfície das fibras impregnadas de soluções coloidais, inibindo assim o crescimento de microrganismos (Lee, et al; 2003).

Os metais pesados são normalmente tóxicos e muito reactivos com proteínas. Crê-se que limitam as moléculas da proteína, o metabolismo celular é inibido e o microrganismo morre. As células bacterianas estão constantemente expostas a situações de pressão e a capacidade de resistência a essas pressões é essencial à sua sobrevivência. A capacidade que os microrganismos têm em se desenvolver na presença do metal pode resultar de mecanismos específicos de resistência. Estes mecanismos incluem a alteração da estrutura química e/ou a toxicidade, alterando o estado de redox dos iões metálicos. No entanto, a prata é tida como não-tóxica, apesar de se considerar que mata muitos e diversos micróbios. Em prospectos informativos, a prata é favorável à pele e não causa irritação (Lee, et al; 2003).

Parte-se do principio que o rápido desenvolvimento da tecnologia de revestimento e dispersão, utilizando nano partículas, irá melhorar as propriedades das suas substâncias. Têm sido efectuados diversos estudos no sentido de dissipar partículas de prata à escala nano, nos tecidos têxteis para criar um efeito antibacteriano.

H.J. Lee, et al, 2003, investigaram o efeito antibacteriano da solução coloidal de nano partículas de prata contra a *Staphylococcus aureus* e a *Klebsiella pneumoniae*, ao introduzi-la nos tecidos têxteis de algodão. Verificaram que as nanopartículas de prata, cujo diâmetro variava de 2 a 5 nm, tinham um efeito antibacteriano em todas as amostras testadas contra as bactérias gram-positivas e gram-negativas. A aplicação das nano partículas de prata foi efectuada através do uso de uma solução coloidal de prata por impregnação, tendo-se obtido bons resultados, apresentando uma eficácia bacteriana com uma durabilidade à lavagem. Vários estudos têm demonstrado que se consegue uma capacidade bactericida eficiente com uma carga de prata muito reduzida (Lee, et al; 2003).

### **1.13.3. Problemas associados ao uso da prata**

A Argiria também designada por argirose ocorre como resultado de uma terapia prolongada com prata. Foi registada pela primeira vez em 1647, tendo sido investigada com maior cuidado em 1934 por Hill e Pillsbury.

Este tipo de problema é caracterizado por urna coloração permanente e irreversível da pele devido aos depósitos de aglomerados de prata. Esta coloração apresenta-se com tons de cinza a preto azulado. Isto acontece pela precipitação da prata nas demites, especialmente em regiões aos redor de folículos de pelo e zonas de transpiração (Silver, 2003). Existe um caso de Argiria registado em 1959, num paciente cuja terapia resultou na coloração da pele. Rosemary Jacobs apresentou de acordo com a maioria dos médicos, o pior efeito da prata quando esta é utilizada em doses exageradas (Russel, et al; 1994).

Esta doença tem sido objecto de investigações e experiências em animais, sendo que alguns autores afirmam que a utilização dos chamados produtos caseiros de prata cuja preparação é geralmente considerada incorrecta pelos produtores de soluções coloidais de prata, podem levar ao aparecimento de Argiria. No entanto, a terapia a laser pode já ser utilizada como uma solução para esses casos (Silver, 2003).

#### 1.14. Têxteis antimicrobianos à base de triclosano.

Um dos tipos de efeitos antimicrobianos mais duráveis é baseado nos derivados de difenil-eter (bisfenil) conhecidos também como 2,4,4'-triclora-2'-hidrox difenil éter ou 5-cloro-2-(2,4-dicloro fenoxilo) fenol (Figura 5). Os produtos de “triclosan” ou triclosano foram usados por mais de 25 anos em hospitais e em produtos de higiene pessoal tais como o sabão, pasta de dentes e desodorizantes antimicrobianos.

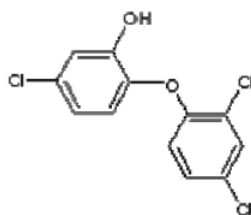


Figura 5 - Estrutura do 2,4,4-tricloro-2-hidoxidifeniletér (triclosano).

É um produto não-tóxico, não é cancerígeno nem sensível com a pele. O triclosano inibe o crescimento dos microrganismos por um mecanismo electroquímico. O composto penetra e rompe a membrana celular, afectando o metabolismo dos microrganismos por inibição da síntese de lipídios (Purwar et al., 2004).

O triclosano quando incorporado dentro de um polímero migra à superfície, onde é ligado. Como não é solúvel, é libertado e inibe continuamente o crescimento das bactérias em contacto com a superfície (Ramachandran et al., 2004). Os produtos comerciais que contêm na sua constituição triclosano, são conhecidos pela sua eficácia antimicrobiana e respectiva durabilidade, em fibras como, poliéster, poliamida e misturas dessas fibras com algodão. No entanto, sabe-se que a sua actividade contra fungos não é tão significativa. O triclosano actua como um corante disperso, difunde-se com uma elevada velocidade de esgotamento para o interior das fibras e durante a utilização do artigo tratado, migra para a superfície por um processo de libertação controlada. Quando os microrganismos são colocados em contacto com o triclosano pode ocorrer resistência, por parte dos microrganismos ao agente, continuando a existir desenvolvimento dos microrganismos (*Staphylococcus aureus*, *Cromobacterium*, *Klebsiella* ou *pseudomonas*) na superfície do material têxtil ou na zona circundante. Devido a esta característica de migração e formação da zona de inibição, Williams e seus colaboradores (2005) detectaram que este composto produz multi-

resistência em consequência do processo de mutação das bactérias, como indicam resultados recentes do aumento da resistência bacteriana em produtos hospitalares, que contêm triclosano. Outra desvantagem da sua aplicação em materiais têxteis está relacionada com a durabilidade da actividade antibacteriana após lavagens. Têm sido desenvolvidas aplicações de triclosano microencapsulado. Usam-se microcápsulas de diferentes polímeros, permitindo uma libertação controlada do triclosano. Estas microcápsulas contendo o triclosano ou outros compostos antimicrobianos insolúveis são posteriormente incorporadas durante o processo de extrusão de fibras ou por revestimentos na superfície das fibras (Grabowska et al., 2004).

A Thompson Research comercializa este produto sob o nome de Ultra fresh. É geralmente acoplado ao têxtil pelo processo de impregnação preferencialmente após o tingimento, devido á fraca resistência do Ultrafresh a altas temperaturas requeridas para o tingimento. A Ciba promove o seu próprio tricloro-2 hidroxil-bifenilo éter chamado Tinosan AM110 que apenas precisa de ser misturado com a solução de tingimento, pois esta versão tolera altas temperaturas.

## **1.15. Caracterização dos tratamentos antimicrobianos utilizados no estudo**

### **1.15.1. Tratamento antimicrobiano a base de triclosano.**

O agente antimicrobiano utilizado, Ultra-Fresh NMV-2, foi fornecido pela firma Horquim, Representações Lda., é uma emulsão aquosa concebida para proporcionar propriedades bacteriostáticas duráveis em artigos de algodão, lã e têxteis sintéticos tais como tecidos para vestuário e têxteis-lar, inibindo o crescimento de bactérias que causam odores.

De acordo com o fabricante, o agente permite um tratamento durável em artigos quando sujeitos a lavagens domésticas. O Ultra-Fresh NM-V2 inibe o crescimento de microrganismos nas superfícies têxteis, nomeadamente, collants, uniformes hospitalares, batas de laboratório, roupa interior, batas e outros vestuários cirúrgico, fardamentos de protecção, revestimentos para paredes, tecidos para estofos, tecidos têxteis-lar, cobertores, cortinas para casa de banho, revestimentos para colchões, lençóis e fronhas para almofadas, material para enchimento de colchões e de almofadas e filtros de ar.

Este produto pode ser aplicado no banho de foulardagem e a temperatura deste não tem qualquer efeito na razão de "pick-up" do tecido relativamente ao produto.

O esgotamento deve ser feito durante 10 a 15 minutos a temperaturas que oscilem entre 38 a 49°C. Pode ser adicionado aos corantes e aos auxiliares usados em procedimentos normais de tinturaria têxtil e proporciona actividades bacteriostáticas duráveis em artigos tingidos e acabados sem ocorrer qualquer alteração no procedimento de tingimento.

### **1.15.2. Tratamento antimicrobiano a base de iões de prata**

O tratamento Sanitized Silver foi desenvolvido e produzido na Suíça, o novo produto é baseado no sal de prata (prata não metálica), que é cientificamente reconhecido como possuindo propriedades anti-microbianas naturais. Como resultado, quando aplicado no tecido como acabamento, o Sanitized Silver actua sobre as membranas celulares das bactérias, impedindo o crescimento e a reprodução das bactérias responsáveis pelo desenvolvimento de odores desagradáveis.

O novo desenvolvimento possui a certificação bluesign e Oeko-Tex 100 (classe I-IV), provando que foi submetido a rigorosos testes de qualidade e respondeu às mais altas exigências. «A Sanitized é uma empresa ecologicamente consciente. Estes certificados de qualidade demonstram que o Sanitized Silver é seguro para as pessoas e o meio ambiente», explica Burnette, químico de formação e com 20 anos de experiência em química têxtil.

Segundo a empresa, o Sanitized Silver melhora o conforto do vestuário e não altera a sensação de suavidade dos tecidos, destinando-se essencialmente para tecidos utilizados na produção de vestuário de desporto, exterior e trabalho. Também se aplica em malhas, como t-shirts, roupa interior e meias. Apresenta uma elevada resistência à lavagem, permitindo 50 ou mais ciclos a 60 °C. O vestuário mantém-se fresco durante mais tempo e pode ser lavado com frequência sem comprometer os benefícios anti-microbianos.

Sendo adequado para todos os tipos de construção de tecidos, o Sanitized Silver oferece maior flexibilidade pela capacidade de se combinar com uma ampla gama de outros acabamentos têxteis e permite um melhor manuseamento, na medida em que é uma solução pronta a usar, não precisando de ser combinado com outros produtos, como um ligante.

No entanto, o Sanitized Silver não é uma nanotecnologia, nem possui nanopartículas de prata. As medições da dimensão e distribuição das partículas verificaram que o Sanitized Silver está fora da gama das nano-partículas (Sanitized.com, 2009).

### 1.15.3. Tratamento antimicrobiano a base nanopartículas de prata

O tratamento iSys MTX/iSys AG é uma combinação produtos inovadora para a obtenção de um acabamento antibacteriano (Figura 6). iSys MTX é um sol orgânico-inorgânico reativo para têxteis, que inclui propriedades ligantes notáveis.

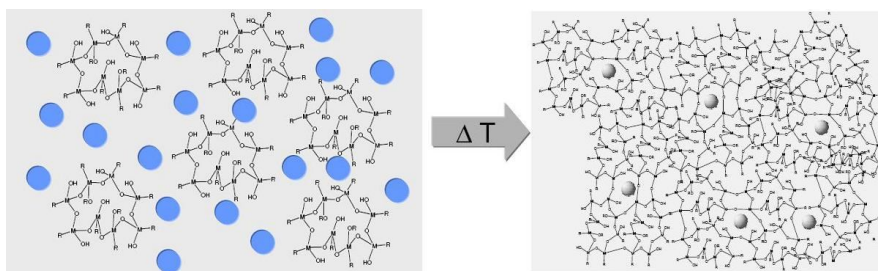


Figura 6 - Processo de obtenção do acabamento antimicrobiano iSys AG (Koch M.; 2006).

Processo sol gel é um processo de obtenção de materiais inorgânicos ou híbridos orgânico-inorgânicos na qual ocorrem as reações de hidrólise e condensação do precursor para a formação de partículas de tamanho coloidal (sol) e posterior formação da rede tridimensional (gel) (Dislich. H.; 1986) Com iSys MTX o processo sol gel torna-se realidade na indústria têxtil. O iSys AG é baseado em prata que é fixada sobre a superfície de fibras por iSys MTX e, portanto, faculta uma protecção duradoura contra bactérias. Além disso, será mostrado que esta matriz sol-gel orgânica-inorgânica oferece muitas possibilidades de outras funcionalidades (Koch M.; 2006).

As vantagens deste produto são:

- Camada funcional, à escala nano, sobre o tecido, com excelente durabilidade.
- Forte efeito antibacteriano
- Aplicação simples, por foudardagem, em quantidades reduzidas
- Alta resistência à lavagem
- Flexibilidade na escolha dos tecidos
- Boa estabilidade do banho
- Tendência a amarelecer muito ligeira
- Pode combinar-se com amaciadores (Koch M.; 2006).

### 1.16. Metodologias de estudo de actividade antimicrobiana em têxteis

Os métodos de avaliação da actividade antimicrobiana nos materiais têxteis, devem ser capazes de avaliar a eficiência do tratamento antimicrobiano, bem como, assegurar que o desempenho do artigo têxtil não será alterado pelo tratamento.

Os compostos antimicrobianos diferem entre si, física e quimicamente, e actuam nos microrganismos segundo diversos mecanismos. Assim sendo, podem ser efectuados vários testes de actividade antibacteriana para avaliar correctamente uma aplicação com estes compostos.

Devido á grande diversidade de materiais e de usos destes, observa-se uma grande dificuldade de desenvolver um só teste que consiga satisfazer todos os requezsitos. Por isso, poderá ser necessária uma cascata de testes básicos e fáceis, para explorar completamente a actividade dada por um determinado artigo/ material (etapa 1), seguido da simulação às condições de exposição (etapa 2) até à avaliação usando o artigo (etapa 3) (Ramachandran, *et al.*, 2004).

É importante ser desenvolvida uma cadeia de testes onde nos primeiros se consiga informação para auxiliar os testes seguintes.

Tabela 2 - Exemplos de materiais tratados.

Produto	Exigências feitas
Têxtil antimicrobiano	Controlo efectivo do crescimento numa vasta gama de microrganismos
Meias	Aumento da frescura, redução do odor, inibição de crescimento bacteriano
“Tights (hosiery)”	Combater o crescimento de fungos que causam “Thursh” e “Pé de atleta”
Toalhas de banho	Prevenir o crescimento bacteriano e manter a higiene da toalha

Como se pode observar na Tabela 2, existem muitas categorias de produtos onde em cada um destes, vários parâmetros podem ser mais importantes que em outros. Num certo têxtil que indica que tem actividade antimicrobiana sob certas condições, é importante mostrar que as bactérias cresceriam num têxtil não tratado sob as mesmas condições. Um bom controlo é a chave para um sucesso nos testes. Do mesmo modo, é importante ter em atenção as condições físicas e químicas da população microbiana do teste, isso para garantir o crescimento e sobrevivência da população. Os testes devem ser capazes de ser reproduzíveis para qualquer espécie e os resultados devem ser suficientes para que a actividade calculada possa ser estatisticamente válida.

Podemos dividir os testes a têxteis antimicrobianos em dois grandes grupos (ver Figura 7), os qualitativos, também conhecidos como testes de difusão em agar, que apenas nos permitem classificar qualitativamente o desempenho do têxtil (bom, mau, suficiente, insuficiente, etc), e os testes quantitativos, que já nos permitem fazer uma quantificação da redução bacteriana quando sujeita ao contacto com o têxtil em questão. Qualquer um dos procedimentos descritos nas normas de testes quantitativos (ISO, ASTM e JIS) aconselham o técnico a realizar primeiro as técnicas qualitativas, para obter uma ideia do desempenho do têxtil, e as características deste, como a difusão do agente antimicrobiano. Os testes qualitativos são fáceis, rápidos e não envolvem grandes custos.

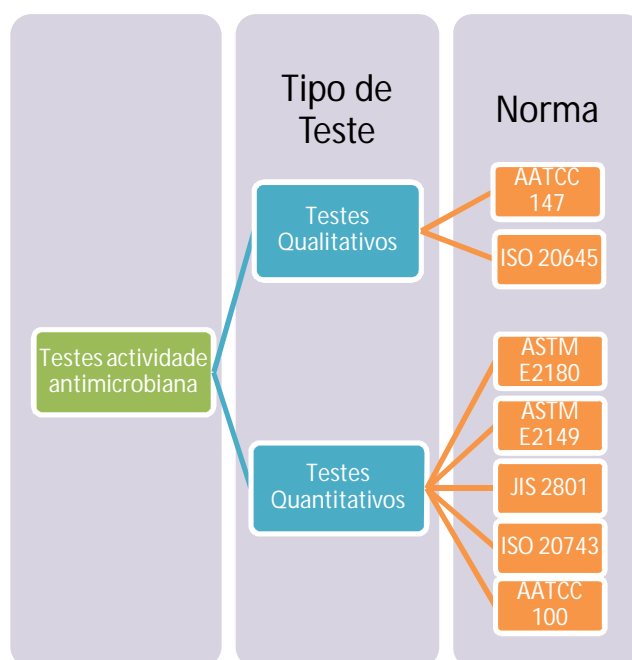


Figura 7 - Testes de actividade antimicrobiana em têxteis

### 1.16.1. Metodologias qualitativas

No primeiro grupo de testes, destacam-se os métodos AATCC 147 e ISO 20645. Nestes métodos, as amostras têxteis são colocadas em placas de agar que foram inoculadas com bactérias e em seguida, incubadas. A intenção é promover um contacto íntimo entre o têxtil e a bactéria/meio de crescimento, que irá resultar na inibição do crescimento na zona adjacente ao têxtil ou em uma área em torno do têxtil, indicando que o agente antimicrobiano tenha-se dissolvido no meio de cultura. Estes métodos são geralmente reconhecido como sendo não-quantitativos, embora potencialmente possam ser usados em ensaios de determinados produtos antimicrobianos da mesma forma que essas técnicas são utilizadas para determinados antibióticos (Hewitt, W; 1989). Isto pode ser útil como uma

ferramenta e despistagem para investigar o efeito da lavagem ciclos etc Estes métodos são amplamente empregadas na indústria têxtil, uma vez que fornecem uma representação gráfica de alta atividade antimicrobiana, embora isso possa levar a equívocos quer da escala de efeito observado (maiores zonas de inibição olhar melhor) e as implicações que a mobilidade de ingrediente ativo poderia ter sobre a vida de serviço. Embora estas técnicas sejam considerados impróprias para "quantificar" o efeito dos efeitos do tratamento antimicrobiano em têxteis, existem alguns casos em que podem fornecer dados mais relevantes que os dados obtidos através duma técnica totalmente quantitativas.

### 1.16.2. Metodologias quantitativas:

Na Figura 8 observa-se que existem pelo menos 5 técnicas que fornecem dados quantitativos sobre o efeito de um tratamento têxtil contra bactérias. Sendo estes possíveis de dividir em dois grupos tal como se pode ver na Figura 8:

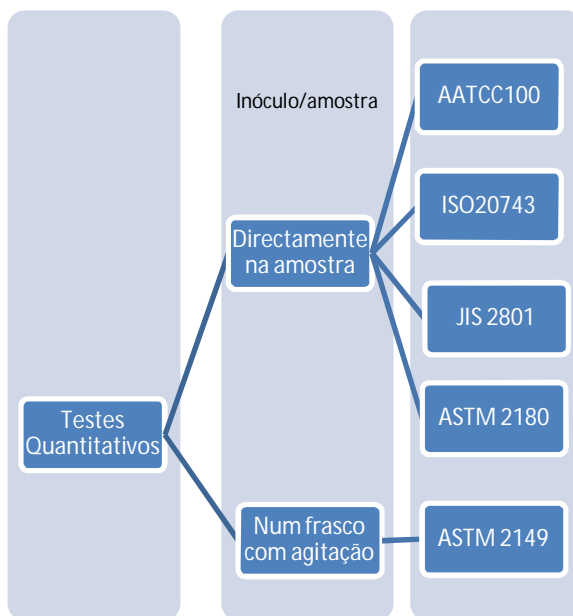


Figura 8 - Testes quantitativos para a determinação actividade antimicrobiana em têxteis

Neste tipo de teste, as amostras são inoculadas com suspensões de bactérias e, em seguida, incubadas por um determinado tempo antes de ser examinado o tamanho da população presente. Os métodos diferem no meio de suspensão, número de repetições, estirpe usada, as condições de incubação, métodos de extração entre outros. Os métodos AATCC-100 e JIS L 1902 aparam ser os mais usados. A norma suíça SN195924 da qual não tivemos acesso, foi baseada na Norma AATCC 100, mas foi modificada para melhorar a repetibilidade e reprodutibilidade do método. Isso resultou

num método mais complexo. Os métodos quantitativos mostram ser mais adequados para determinar as propriedades bactericidas e bacteriostáticas dos têxteis. Embora tivessem sido originalmente desenvolvidas para examinar os efeitos contra bactérias, elas podem ser estendidas para a investigação do impacto sobre leveduras, bem como esporos fúngicos. É possível prever que o método deverá ser alargado para testar contra partículas virais, algas e protozoários. Além disso, estes protocolos podem ser combinados com estudos sobre o envelhecimento (por exemplo, o impacto de ciclos de lavagem) para começar a preencher, pelo menos, alguns dos requisitos dos ensaios de Nível 3.

### 1.16.3. ISO 20743:2007

A norma ISO 20743:2007 é aplicável a todos os produtos têxteis, incluindo tecidos, estofos e material de vestuário, mobiliário doméstico e de diversos bens, independentemente do tipo de agente antibacteriano utilizado (orgânicos, inorgânicos, naturais ou sintéticos), ou do método de aplicação (built-in, pós-tratamento ou enxertia). Com base na sua aplicação e o ambiente em que o produto têxtil irá a ser utilizado, o técnico pode escolher o mais adequado dos seguintes três métodos de determinação da actividade antibacteriana:

- **Método de absorção** (um método de avaliação na qual uma suspensão bacteriana é inoculada directamente aplicada sobre as amostras),
- **Método de transferência** (um método de avaliação em que as bactérias de teste são colocadas em placas de ágar e transferidas para amostras),
- **Método de impressão** (um método de avaliação no teste bactérias que são colocados num filtro e impressos nas amostras).

São também especificados os métodos de contagem em placa e através do ATP (adenosina trifosfato).

### 1.16.4. AATCC Method 100 - "Assessment of Antibacterial Finishes on Textiles"

Utilizado para avaliar quantitativamente a eficácia antimicrobiana de um produto têxtil, quando desafiados com *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*.

O método quantitativo AATCC 100 foi concebido para medir a capacidade de um tecido antimicrobiano para matar ou inibir o crescimento de microrganismos.

O microrganismo de teste é cultivado em meio líquido, a concentração desta suspensão é padronizada. A cultura microbiológica é diluída numa solução nutritiva estéril. O controlo e a amostra de tecido a testar são inoculados com microrganismos. A inoculação é feita de modo a que a suspensão microbiana apenas toque no tecido. São determinados os níveis de bactérias na “hora zero”, tanto no têxtil de controlo, por eluição num grande volume de solução de neutralização, seguido da uma diluição e contagem por cultura em agar. O teste à amostra de controlo é executado para verificar se o processo de neutralização/eluição foi eficaz ao neutralizar o agente antimicrobiano do têxtil.

São colocados a incubar durante 24 horas, amostras adicionais de têxtil a testar e controlos, em frascos fechados, depois deste tempo de incubação, é então feita uma contagem de microrganismos. Finalmente é calculada a redução relativa dos microrganismos no têxtil de controlo

#### ***Pontos fortes da norma AATCC 100:***

Este método é quantitativo e os resultados tendem a ser reproduzíveis. Este método analisa as propriedades bacteriostáticas (inibição de crescimento) e bactericidas (mata as bactérias). As concentrações microbianas são padronizadas, e são fornecidos nutrientes às bactérias durante o período de incubação, o qual fornece uma boa oportunidade às bactérias de crescer, se o tecido não for suficientemente antimicrobiano. Isto está em contraste com alguns outros testes antimicrobianos, onde os microrganismos são "incubados" em suspensões não-nutritivas, o que em si pode ser stressante para longos períodos.

#### ***Pontos fracos da norma AATCC 100:***

O método tem critérios de sucesso bastante vagos, o que significa que o tecido testado pode ser considerado como "antimicrobiano" pela decisão da empresa patrocinadora do estudo (o método indica que "os critérios para o sucesso deve ser decidido pelas partes interessadas") O teste pode tornar-se inadequado, se o tecido a testar não absorver facilmente líquidos (hidrofóbicos).

### **1.16.5. ASTM E2149 - Antimicrobial Surface Test - "Determining the Antimicrobial Activity of Immobilized Antimicrobial Agents Under Dynamic Contact Conditions"**

Este método é utilizado para avaliar quantitativamente a eficácia de uma amostra tratada com agente antimicrobiano não difusível por agitação numa suspensão com um organismo. O organismo típico usado é a *Klebsiella pneumoniae*.

A norma ASTM E2149 foi desenvolvida para superfícies ou produtos antimicrobianos não difusivos, é então analisada a sua propriedade difusiva através dum método. Se for detectada um agente antimicrobiano difusivo, deverá ser utilizado outro método de ensaio.

O microrganismo de teste é cultivado em meio líquido. A concentração da suspensão bacteriana é standardizada. A cultura de microrganismos é então diluída numa solução tampão estéril. Para cada produto a ser testado, é colocado 50 mL da cultura microbiana padronizada em 3 recipientes (em frascos de vidro estéreis funciona bem). Um frasco recebe apenas suspensão bacteriana, outro recebe a amostra a testar com tratamento antimicrobiano, o último recebe uma amostra de controlo (uma amostra similar a amostra a testar, sem o agente activo). É analisada a concentração microbiana no líquido de todos os recipientes no "tempo zero". Todos os frascos são agitados pela acção de um agitador durante algum tempo, geralmente 1-24 horas.

Depois da agitação em suspensão microbiana para o período de contacto, um pequeno volume da suspensão é re-analisada para o agente antimicrobiano e, em seguida, as concentrações microbianas em todos os frascos são novamente determinadas.

As concentrações dos microrganismos no frasco que continha o produto antimicrobiano são comparados, quer com o frasco que continha apenas suspensão microbiana, como para o frasco que continha o controlo, dependendo de certas condições especificadas pelo método.

A produto é considerado "antimicrobiano" se que produz uma redução substancial em relação a qualquer objecto ou o inóculo de controlo. Se tanto o pré-teste ou o pós-teste mostrarem a presença de "agente antimicrobiano difusivo", os resultados são então invalidados.

#### ***Pontos fortes da norma ASTM E2149:***

A norma ASTM E2149 especifica claramente a concentração microbiana inicial, permitindo uma comparação bastante reprodutível entre diferentes produtos antimicrobianos.

A norma ASTM E2149 está escrita de a fim de permitir uma flexibilidade experimental, que permite aos investigadores adaptar o método para testar produtos antimicrobianos de diferentes formas e tamanhos.

### ***Pontos fracos da norma ASTM E2149:***

Embora este método seja usado rotineiramente pelos fabricantes de superfícies antimicrobianas, ela não pode ser aplicada na maioria dos produtos antimicrobianos.

Os tipos de produtos usualmente testados por este método incluem bancadas, canetas, polímeros antimicrobianos, e outras coisas do género. Segundo a experiência de laboratórios que praticam testes antimicrobianos, muitos produtos que "passam" na norma ASTM E2149 não produzem um efeito antimicrobiano apreciável em situações mais realistas (como quando uma suspensão diluída de bactérias é colocado directamente sobre o produto e, em seguida, voltar a analisar uma hora posteriormente - muitas vezes não há diferença entre o "antimicrobianos" amostra e uma amostra de controlo negativo).

Os resultados do método ASTM E2149 são altamente dependentes do tempo de contacto escolhido para o estudo. Um teste onde a superfície antimicrobiana que tem um contacto com o inóculo mais de uma hora, é certamente menos eficaz do que outro onde o inóculo tem um tempo de contacto de 24 horas, no entanto, a maioria dos produtos é testado com um tempo de contacto de 24 horas.

Os Laboratórios que efectuam testes antimicrobianos têm cuidados acrescidos ao realizar o método ASTM E2149 tal como este é apresentado na norma. Embora a norma ASTM E2149 tenha alguns inconvenientes, é fortemente usada na indústria e pode ser usada para comparar os produtos comercializados por diferentes empresas.

### **1.16.6. JIS Z 2801: 2000 - "Antibacterial products-Test for Antibacterial activity and efficacy"**

A norma industrial japonesa JIS Z 2801: 2000 foi desenvolvida para medir a atividade antibacteriana de materiais hidrofóbicos, originalmente resultante da incorporação de iões de prata em polímeros rígidos. O método foi desenvolvido por um consórcio de trabalhadores composto por fabricantes de tratamentos antimicrobianos a base de prata, o governo japonês, organizações de investigação e universidades com sob a organização da SIAA. O método foi validado no Japão (Suzuki S. et al, 2006) e, depois foi base do projecto da norma ISO que viria a ser validada pelo SIAA em colaboração com o International Biodeterioration Research Group (Imai S., 2005)

O método descrito no JIS Z 2801

- Fornece dados quantitativos.
- Pode ser modificado para ser adaptado a efeitos biocidas e bioestáticos
- Pode ser modificado para ser adaptado a uma grande variedade de espécies microbianas (incluindo alguns fungos, algas e protozoários, bem como uma vasta gama de espécies bacterianas e vírus (Askew P., 2002).
- Pode ser modificada para permitir uma ampla gama de tempos de contacto e temperaturas para ser examinado (Askew P., 2005).

A actividade antibacteriana é medida ao quantificar a sobrevivência das células bacterianas que tenham tido contacto íntimo com uma superfície que contém um agente antibacteriano, por 24 horas a 35°C. O efeito antibacteriano é medido pela comparação da sobrevivência das bactérias com um material tratado com outro da mesma natureza mas não tratado. A técnica é bastante idêntica à técnica apresentada na norma AATCC 100, no entanto é usado uma película de polietileno a cobrir o inóculo que é colocado sobre a amostra, para promover um contacto mais eficaz entre o inóculo e a amostra têxtil. A notar também o uso do Stomacher® para a recuperação da população bacteriana para contagem. Esta norma aparenta ser mais evoluída que a norma AATCC 100 (JIS Z 2801).

#### **1.16.7. ASTM E-2180 - Standard Test Method for Determining the Activity of Incorporated Antimicrobial Agent(s) In Polymeric or Hydrophobic Materials**

Este método é usado para avaliar quantitativamente a eficácia de um agente antimicrobiano incorporado em materiais sintéticos hidrofóbicos. Os organismos usados são normalmente o *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (ou *Klebsiella pneumoniae*).

Materiais poliméricos, tais como capas de vinilo para piscinas, cortinas de duchas e vários dispositivos médicos são frequentemente tratados com agentes antimicrobianos incorporados ou vinculados. Práticas G 21 e G 22 são utilizados para determinar a capacidade de materiais poliméricos para resistir a ataques microbianos ou coloração (ver também Prática E1428), porém, nenhum dos métodos permite uma avaliação quantitativa dos da actividade dos agentes antimicrobianos incorporados. Estes antimicrobianos normalmente requerem contacto com as células para um desempenho máximo.

Quando um inóculo bacteriano baseado numa suspensão aquosa baseada é aplicado sobre um material hidrofóbico, a tensão superficial do polímero leva muitas vezes a suspensão inoculada a

“saltar” para fora da amostra. Bactérias do inóculo não podem assim entrar em contacto com a superfície tratada. Este teste padrão envolve um inóculo com ágar que proporciona um contacto relativamente uniforme dos inóculos com superfícies antimicrobianas hidrofóbicas.

Resumindo este método é similar ao método AATCC 100, tendo como diferença o tipo de inóculo usado.

## Objectivos

---

## 2. Objectivos

O objectivo deste trabalho consiste no estudo das técnicas quantitativas de avaliação da actividade antimicrobiana usados em produtos têxteis, e estudar simultaneamente uma gama de produtos têxteis desenvolvidos pelo Departamento de Ciências e Tecnologia Têxteis da Universidade da Beira Interior.

## Procedimento

---

### 3. Procedimento

#### 3.1. Estudo prévio às estirpes

Fez-se um estudo prévio de identificação e controlo de contaminação das estirpes utilizadas. Para cada estirpe fez-se uma cultura em meio tryptone soya agar (TSA; Oxoid, Oxoid Ltd. Basingstoke, Hampshire, England) e incubada a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 24h. A partir de uma colónia isolada foi realizado o teste de coloração de Gram e cultura em meio selectivo e diferencial para confirmação da respectiva estirpe.

##### 3.1.1. *Staphylococcus aureus*

Para estas estirpes, fez-se coloração de Gram, e microscopia óptica. Também se fez uma cultura em meio Baird-Parker egg york tellurite agar ; Oxoid, Oxoid Ltd. Basingstoke, Hampshire, England) que incubou a  $37\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 24h.

##### 3.1.2. *E. coli*

Para esta estirpe, fez-se uma coloração de Gram, e observou-se em microscópio óptico. Também se fez uma cultura em meio tryptone bile x-glucoronide médium (TRYPTONE BILE X-GLUCURONIDE MEDIUM (TBX); Oxoid, Oxoid Ltd. Basingstoke, Hampshire, England). A placa foi levada a incubar a  $37\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 24h.

#### 3.2. Caracterização das amostras

Para o estudo foram usadas as amostras listadas na Tabela 7, com referência á composição, agente antimicrobiano e a respectiva marca.

**Tabela 3 - Composição dos 4 tipo de têxteis tratados com acabamentos antimicrobianos e o têxtil não tratado usado como controlo**

Amostra	Composição	Agente antimicrobiano	Marca
1	100% PES	Iões de prata	ISys Ag
2	50% PES 50% Algodão	Iões de prata	ISys Ag
3	100% Algodão	Iões de prata	ISys Ag
4	100% PES	Iões de prata	ISys Ag
5	100% Algodão (c-5%)*	Triclosano	Ultra-Fresh
6	60% PES 40% Algodão	Iões de prata	Bioguard
7	Quitosano/Algodão	Quitosano	Shin-era
Controlo 1	100% PES		
Controlo 2	100% Algodão		

\* Quantidade de aplicação relativamente ao peso do tecido.

As amostras 1, 2, 3 e 4 provieram de um estudo científico desenvolvido pelo Departamento de Ciências e Tecnologias Têxteis da Universidade da Beira Interior - Covilhã, Portugal; onde era necessário analisar a actividade anti-microbiana de vários têxteis com diferentes percentagens de algodão e de Poliestireno contendo um agente antimicrobiano baseado em iões de prata incorporados por nanotecnologia, com o nome comercial ISys AG.

A amostra 5 consistiu num têxtil de algodão (100% algodão) tratado com acabamento antimicrobiano baseado em triclosano, comercializado sob o nome de Ultra-Fresh® NM-V2, com uma quantidade de aplicação de 5,0% relativamente ao peso do tecido. Este acabamento foi gentilmente doado pela empresa Horquim®, sediada em Folgosa – Maia, Portugal. O acabamento foi aplicado a um têxtil de algodão conforme as especificações da ficha técnica do tratamento antimicrobiano Ultra-Fresh® NM-V2, com o auxílio do Departamento de Ciências e Tecnologias Têxteis da Universidade da Beira Interior - Covilhã, Portugal. O mesmo têxtil de algodão não tratado, foi também analisado e usado como controlo (controlo 2).

A amostra 6 consistiu num têxtil comercializado sob a marca Bioguard produzido pela Klopman®. A amostra tem como referência Bioguard 185. Os têxteis bioguard são tratados com o tratamento antimicrobiano Sanitized®.

A amostra 7 consistiu numa mistura de algodão com uma fibra antimicrobiana à base de quitosano.

### **3.3. Avaliação da actividade antimicrobiana de têxteis segundo o método NP EN ISO 20645:2005**

#### **3.3.1. Princípio do método**

As amostras a testar são colocadas numa placa com duas camadas de agar (inferior e superior). A camada inferior consiste em meio estéril, e a camada superior é inoculada com a bactéria seleccionada. O nível de actividade anti-bacteriana é determinado examinando a extensão do crescimento bacteriano na zona de contacto entre a amostra e o agar e, se presente, a extensão da zona de inibição à volta da amostra.

#### **3.3.2. Material e reagentes**

- Incubador, Memmert INE 500;
- Autoclave, capaz de operar a 121°C e 205kPa;
- Banho-maria, capaz de manter a temperatura a 45±2°C;
- Meio tryptone soya Agar (TSA; Oxoid, Oxoid Ltd. Basingstoke, Hampshire, England);
- Soro fisiológico
- Frasco de 1000ml com doseador (1 - 10mL).
- Vortex
- Placas de petri (15 x 90 mm)
- Micropipeta de 5000uL
- Micropipeta de 1000uL
- Micropipeta de 100uL
- Tubos de ensaio 16 x100 mm
- Placa de aquecimento
- Espectofotómetro

#### **3.3.3. Preparação das amostras**

As amostras têxteis circulares e com diâmetro de 35±5 mm foram esterilizadas por autoclavagem à 121°C e 205kPa durante 15min.

### 3.3.4. Culturas de bactérias

Foi usada uma estirpe *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 do lote 360471 (Microbiologics, St Cloud, USA) e a estirpe *E. coli* ATCC 25922 do lote 335061 (Microbiologics, St Cloud, USA). As estirpes foram recuperadas segundo o método descrito no manual do produtos e mantidas em placas de tryptone soya agar (TSA; Oxoid, Oxoid Ltd. Basingstoke, Hampshire, England) à 5 °C, após as suas identidades terem sido confirmadas conforme descrito no ponto 3.1.

### 3.3.5. Preparação do inóculo

As culturas foram inoculadas individualmente em tryptone soya agar e incubadas à 37°C durante 24 horas. Células provenientes de uma colónia isolada foram cuidadosamente colhidas e suspensas em 5mL numa solução salina (NaCl 0.85%) de modo a obter o padrão 0,5 ( $\sim 2 \times 10^8$  CFU/ml) segundo a escala turbimétrica de MacFarland lendo uma densidade óptica de 0,125 à 550nm.

### 3.3.6. Procedimento de teste

Prepararam-se 400mL de agar tryptone soya agar (TSA; Oxoid, Oxoid Ltd. Basingstoke, Hampshire, England) num frasco autoclavável com 500mL de capacidade. Depois de ser levado ao banho-Maria e ter fervido durante 2 minutos, o meio foi transferido para tubos de ensaio, com 10ml em cada um. Os tubos foram tapados e autoclavados à 121°C durante 15min. De seguida deitou-se o conteúdo de cada tubo para uma placa de petri de 90mm para formar uma camada inferior com  $10 \pm 0,2$ mL. Para a camada superior preparou-se 75mL de agar tryptone soya agar (TSA; Oxoid, Oxoid Ltd. Basingstoke, Hampshire, England) num frasco autoclavável com capacidade para 100ml. O meio foi esterilizado em autoclave a 121°C durante 15min e foi arrefecido em banho-maria até atingir a temperatura de  $45 \pm 2$ °C. Inocularam-se os 75mL de agar com  $0,5 \pm 0,05$ mL de inóculo. Com a ajuda de uma micropipeta de 5000uL, colocaram-se 5mL de meio inoculado em cada placa, sobre a camada inferior e deixou-se solidificar. A amostra têxtil a analisar foi então colocada no centro da placa com o auxílio de uma pinça esterilizada. Finalmente procedeu-se à incubação a  $37 \pm 1$ °C durante 18h a 24h.

### 3.3.7. Controlos

Usaram-se vários controlos para monitorizar a técnica. Como controlo de esterilidade do meio utilizou-se uma placa apenas com a camada inferior de meio (Controlo 1). Como controlo das amostras têxteis, colocou-se uma amostra em meio estéril (Controlo 2). Como controlo de crescimento utilizou-se uma placa de petri contendo a camada inferior e a camada superior inoculada sem amostra (Controlo 3). Os controlos são colocados a incubar nas mesmas condições das amostras têxteis a ensaiar.

### 3.3.8. Esquema

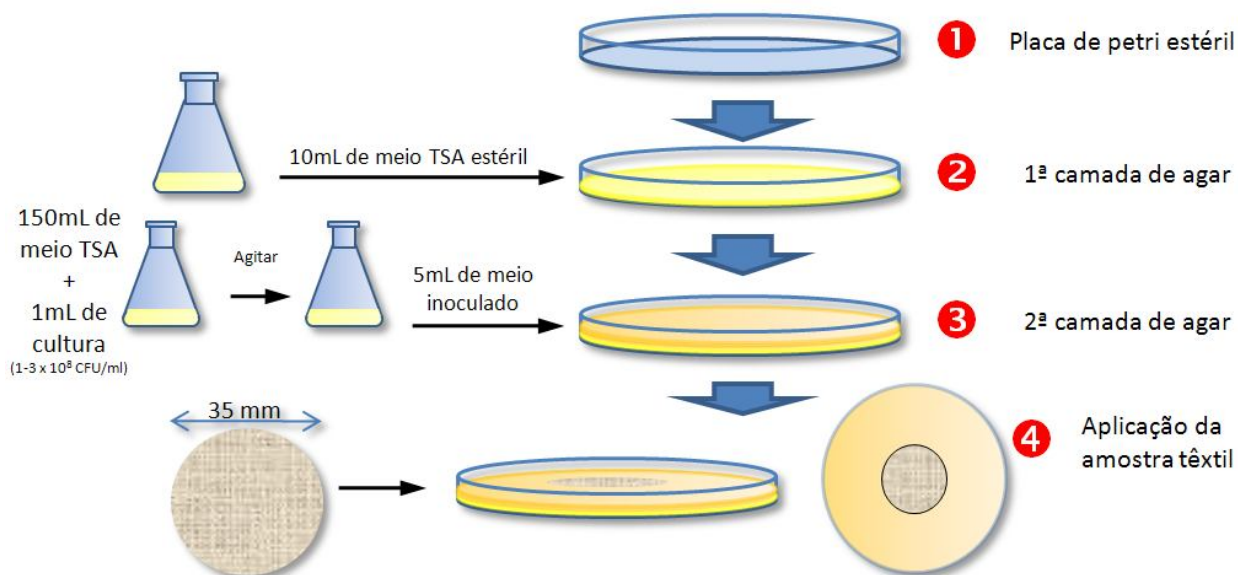
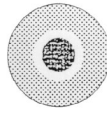
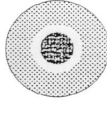
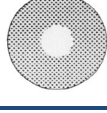
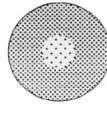
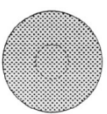
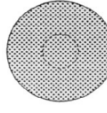


Figura 9 - Esquema representativo do método NP EN ISO 20645 2005

### 3.3.9. Análise de resultados

Tabela 4 - Avaliação da actividade antimicrobiana (ISO 20645 2005)

Zona de inibição Valor médio (mm)	Crescimento sob a amostra	Descrição		Avaliação
>1	Negativo	Zona de inibição excede 1mm, sem crescimento		Boa eficácia
1 – 0	Negativo	Zona de inibição até 1mm, sem crescimento		
0	Negativo	Sem zona de inibição, sem crescimento		
0	Ligeiro	Não existe zona de inibição, somente algumas colónias restritas, o crescimento suprimiu quase totalmente		Eficiência Limitada
0	Moderado	Não existe zona de inibição, comparando com o controlo o crescimento reduziu-se para metade		Eficiência insuficiente
0	Elevado	Comparando com o controlo não existe zona de inibição, não existe redução do crescimento ou somente um crescimento ligeiramente reduzido.		

### **3.4.- Avaliação da actividade antimicrobiana de têxteis segundo o método AATCC 100 com adaptações do método ISO 20743.**

#### **3.4.1. Princípio do método**

Este método proporciona um método quantitativo para a avaliação do grau de actividade antimicrobiana. É colocado uma quantidade de bactérias directamente sobre uma amostra, e levado a incubar durante 16h.

#### **3.4.2. Material e reagentes**

- Incubador, Memmert INE 500;
- Autoclave, capaz de operar a 121°C e 205kPa;
- Banho-maria, capaz de manter a temperatura a 45±2°C;
- Incubadora orbital;
- Meio tryptone soya Agar (TSA; Oxoid, Oxoid Ltd. Basingstoke, Hampshire, England);
- Meio tryptone soya Broth (TSB; Oxoid, Oxoid Ltd. Basingstoke, Hampshire, England);
- Lecitina de ovo (GPR Rectapur Lecithin; VWR International, LLC, Delaware, USA);
- Polisorbato (Tween® 80, Merck Ltd, Hohenbrunn, germany);
- Ringer Tablets (RINGER Tablets; Merck, Darmstadt; Germany)
- Soro fisiológico
- Espectofotómetro
- Vortex
- Erlenmeyer de 250ml
- Placas de petri (15 x 90 mm)
- Pipetas 1000uL
- Tubos de ensaio 16 x100 mm
- Cotonetes estéreis
- Banho de ultrasons 47khz
- Placa de aquecimento
- Espectofotómetro

### **3.4.3. Preparação das amostras**

As amostras têxteis circulares e com diâmetro de  $35\pm 5$  mm foram colocadas em erlenmeyeres de 100ml de capacidade e esterilizadas por autoclavagem à  $121^{\circ}\text{C}$  e 205kPa durante 15min.

### **3.4.4. Culturas de bactérias**

Foi usada uma estirpe *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 do lote 360471 (Microbiologics, St Cloud, USA). A estirpe foi extraída segundo o método descrito no manual do produtos e mantida em placas de tryptone soya agar (TSA; Oxoid, Oxoid Ltd. Basingstoke, Hampshire, England) à  $5^{\circ}\text{C}$ , após as suas identidades terem sido confirmadas conforme descrito no ponto 3.1.

### **3.4.5. Preparação do inóculo**

Após um crescimento de 24 horas numa placa com meio tryptone soya agar (TSA; Oxoid, Oxoid Ltd. Basingstoke, Hampshire, England) incubada a  $37^{\circ}\text{C}$ , a estirpe foi transferida para um frasco com 100ml de meio tryptone soya broth (TSB; Oxoid, Oxoid Ltd. Basingstoke, Hampshire, England), e novamente incubada a  $37^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas sob agitação numa incubadora com rotação orbital.

### **3.4.6. Procedimento**

Prepararam-se dois frascos de meio TSB. Depois da sua esterilização estes foram inoculados, a cultura bacteriana cresceu durante 18h a  $37^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ . O microrganismo proveio numa cultura em agar com 18 a 24h.

A solução a aplicar foi preparada através da dissolução de 0,85 g NaCl e 0,3 g de agar em 100 mL de água desionizada. A solução foi esterilizada por autoclavagem (ASTM E 2180).

Colocou-se 100uL de cultura padronizada ( $1-5 \times 10^8$  CFU/mL) em 100 mL da solução estabilizada a  $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . A concentração final foi de  $1-5 \times 10^5$  CFU/mL. Esta foi a solução de trabalho.

Foi usado como meio de extração uma mistura de meio Tryptone Soya Broth (TSB; Oxoid, Oxoid Ltd. Basingstoke, Hampshire, England) com 0,7 g/l de Lecitina e 5,0 g/l de Tween 80. Foi preparado 1000ml deste meio, que antes de ser esterilizado foi dividido por tubos (20ml/tubo).

Pipetou-se 0,75ml de solução de trabalho directamente sobre as amostras a testar e controlo. Com uma aplicação lenta e suave, com ângulo de incidência baixo em relação à amostra, formando uma película não superior a 1 mm de profundidade.

Depois de colocados os 0,75mL de meio inoculado (meio de trabalho), esperou-se 1min. Depois do tempo de espera, adicionou-se 100ml de meio de neutralização, agitou-se o erlenmeyer durante 1min, e extraiu-se 1ml deste meio para um tubo com 9ml de meio TSB. De seguida efectuaram-se várias diluições e fez-se a contagem em placa. Esta contagem foi considerada como contagem do tempo “0h” Repetiu-se o mesmo processo para os outros erlenmeyers após terem sido levados a incubar durante 16 horas.

A humidade baixa na incubadora pode causar secagem do ágar com inóculo sobre as amostras. A humidade relativa no interior da incubadora deve ser igual ou superior a 75%, para conseguir esta humidade relativa, colocaram-se os erlenmeyers numa tupperware com água no fundo.

### 3.4.7. Esquema

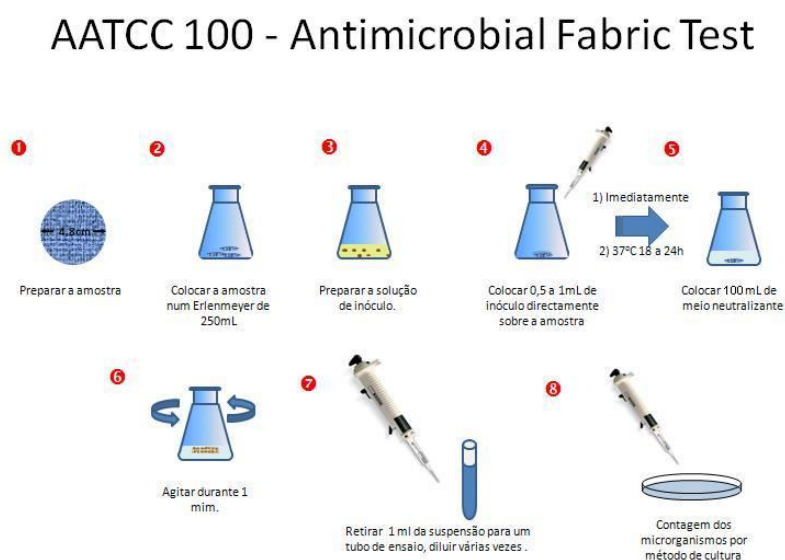


Figura 10 - Esquema representativo do método Método AATCC 100-2004

### 3.4.8. Contagem de células

A contagem de células viáveis foi efectuada por contagem em cultura, este método de contagem em placas indica-nos o número de células formadoras de colónias em solução (CFU). Foi usado como meio de cultura o meio Meio tryptone soya Agar (TSA; Oxoid, Oxoid Ltd. Basingstoke, Hampshire, England). Foi adicionado ao meio 0,7 g/l de Lecitina e 5,0 g/l de Tween 80.

### 3.4.9. Contagem em placa e diluições em série

A suspensão foi serialmente diluída (1:10) em 0,1% de peptone water, e 0,1mL de cada diluição foi aplicada numa placa de agar TSA pela técnica de espalhamento e 1mL aplicado numa placa pelo método “pour plate”. Incuba-se à 35°C durante 24 horas para determinar o número de células viáveis.

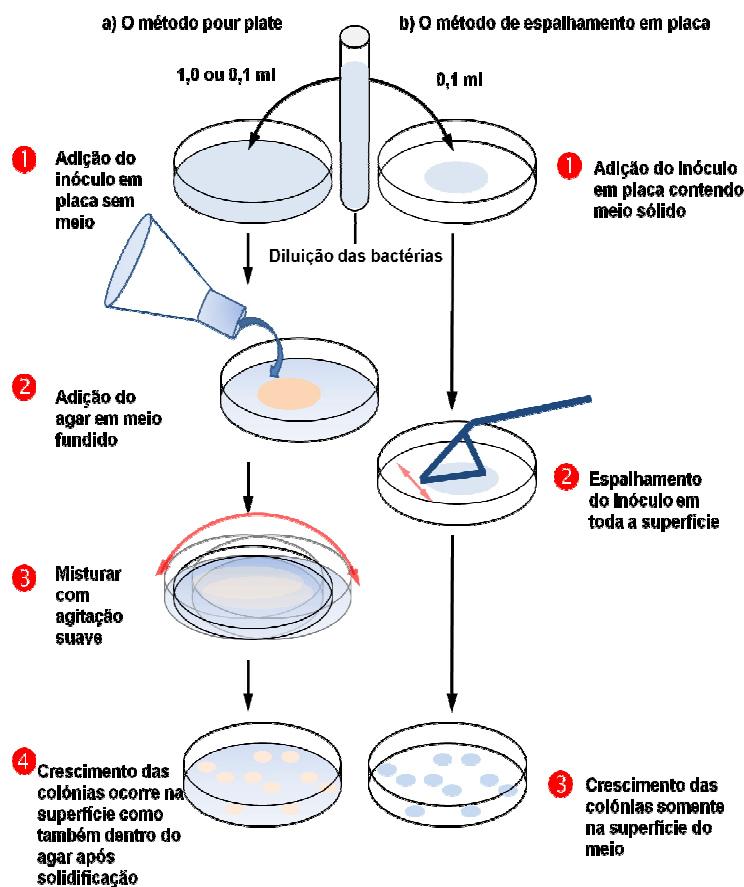


Figura 11 - Esquema representativo do método pour plate e espalhamento

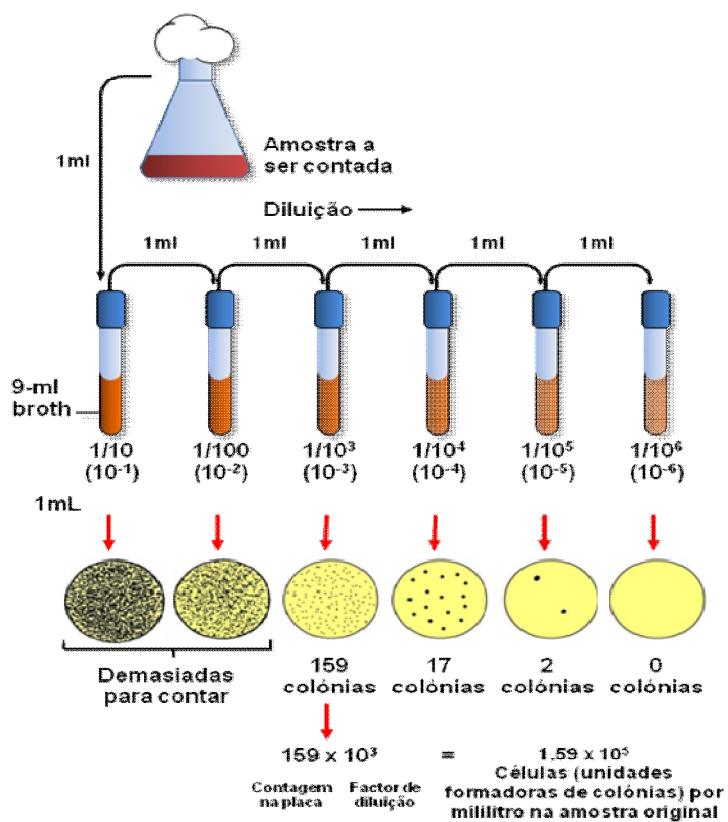


Figura 12 - Esquema representativo do método de contagem por diluição

### 3.4.10. Determinação da eficiência antibacteriana

O cálculo para a percentagem de redução envolveu a seguinte fórmula:

$$1) 100 ((B \text{ ou } C) - A) / (B \text{ ou } C) = R$$

R - % de redução

A - Número de bactérias contadas no frasco com têxtil tratado após um certo tempo de incubação

B - Número de bactérias contadas no frasco com têxtil tratado logo após incubação (t= 0)

C - Número de bactérias contadas no frasco com têxtil não tratado logo após incubação (t= 0)

Se “B” e “C” não forem similares, deverá ser usado o valor mais elevado. Se não forem significativamente diferentes (entre 15%), deverá ser usada a formula seguinte:

$$2) 100 (D - A) / D = R$$

Onde:

$$D = (B + C) / 2$$

### **3.5. Avaliação da actividade antimicrobiana de têxteis segundo o método ASTM E- ASTM E 2149**

#### **3.5.1. Princípio do método**

Tal como o método anterior, este método é quantitativo e permite-nos avaliar de forma mais aprofundada a actividade antimicrobiana do têxtil a analisar. A fibra a analisar é colocada em 100ml meio tampão inoculado e levado a incubar a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 1h a 2h. Periodicamente, é feita uma contagem da concentração celular no meio.

#### **3.5.2. Material e reagentes**

- Incubador, Memmert INE 500;
- Autoclave, capaz de operar a  $121^{\circ}\text{C}$  e 205kPa;
- Banho-maria, capaz de manter a temperatura a  $45\pm 2^{\circ}\text{C}$ ;
- Incubadora orbital;
- Meio tryptone soya Agar (TSA; Oxoid, Oxoid Ltd. Basingstoke, Hampshire, England);
- Meio tryptone soya Broth (TSB; Oxoid, Oxoid Ltd. Basingstoke, Hampshire, England);
- Lecitina de ovo (GPR Rectapur Lecithin; VWR International, LLC, Delaware, USA);
- Polisorbato (Tween® 80, Merck Ltd, Hohenbrunn, germany);
- Ringer Tablets (RINGER Tablets; Merck, Darmstadt; Germany)
- Soro fisiológico
- Espectrofotómetro
- Vortex
- Erlenmeyer de 250ml
- Placas de petri (15 x 900 mm)
- Pipetas 1000uL
- Tubos de ensaio 16 x100 mm
- Cotonetes estéreis
- Placa de aquecimento

#### **3.5.3. Preparação das amostras**

Cortou-se 1g de cada amostra de tecido em pequenas partes, com aproximadamente 0,5 x 0,5 cm e foi esterilizado em autoclave à  $121^{\circ}\text{C}$  e 205kPa durante 15min.

#### **3.5.4. Culturas de bactérias**

Foi usada uma estirpe *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 do lote 360471 (Microbiologics, St Cloud, USA). A estirpe foi extraída segundo o método descrito no manual do produtos e mantida em placas de tryptone soya agar (TSA; Oxoid, Oxoid Ltd. Basingstoke, Hampshire, England) à 5 °C, após as suas identidades terem sido confirmadas conforme descrito no ponto 3.1.

#### **3.5.5. Preparação do inóculo**

As culturas são inoculadas em tryptone soya agar (TSA; Oxoid, Oxoid Ltd. Basingstoke, Hampshire, England), e incubadas a 37°C durante 24 horas. Células provenientes de uma colónia isolada foram cuidadosamente colhidas e suspensas em 100ml de tryptone soya broth (TSB; Oxoid, Oxoid Ltd. Basingstoke, Hampshire, England) e levado a incubar com agitação durante 18 horas a 37±2°C. Retirou-se parte desta solução e diluiu-se com meio RINGER estéril até obter uma absorvância de 0,28 ± 0,01 à 475nm (concentração de 1,5 a 3,8 x 10<sup>8</sup> CFU/ml). De seguida colocou-se 1mL desta solução em 1000ml de solução de RINGER estéril, obtendo assim uma solução com concentração de 1,5 a 3,8 x 10<sup>5</sup> CFU/ml. Esta foi a solução de trabalho.

#### **3.5.6. Procedimento**

Preparou-se um erlenmeyer de 250ml esterilizado em autoclave à 121°C e 205kPa durante 15min, para cada amostra tratada e não tratada, e outros sem amostra.

De seguida adicionou-se a um dos erlenmeyers 50ml de solução de trabalho, tapou-se o erlenmeter e após uma agitação durante 1min. ± 5 seg, retirou-se 1mL para um tubo de ensaio estéril com 9mL de solução de RINGER estéril.

Logo de seguida foi colocado o erlenmeyer na incubadora com rotação orbital a 300rpm e 37°C. Depois de colocar o erlenmeyer na incubadora procedeu-se à contagem por pour plate com as diluições “-3” e “-4”. Esta contagem foi considerada como contagem do tempo “0h”. Repetiu-se o mesmo processo para os restantes erlenmeyer com uma diferença de tempo entre eles de 10min.

Após decorrido uma hora depois da primeira medição, retirou-se o primeiro frasco da incubadora orbital e retirou-se 1mL para um tubo de ensaio estéril com 9mL de solução de RINGER estéril, e recolocou-se o erlenmeyer na incubadora. Esta contagem foi considerada como contagem do tempo “1h”. Foi novamente usado um intervalo de tempo de 10min entre cada erlenmeyer. Repetiu-se o mesmo processo uma hora depois para as contagens do tempo “2h”.

### 3.5.7. Contagem de células

A contagem de células viáveis foi efectuada por contagem em cultura, este método de contagem em placas indica-nos o número de células formadoras de colónias em solução (CFU). Foi usado como meio de cultura o meio Meio tryptone soya Agar (TSA; Oxoid, Oxoid Ltd. Basingstoke, Hampshire, England). Foi adicionado ao meio 0,7 g/l de Lecitina e 5,0 g/l de Tween 80.

### 3.5.8. Determinação da eficiência antibacteriana

O cálculo para a percentagem de redução envolveu a seguinte fórmula:

$$1) 100 (B - A) / B = R$$

**R** - % de redução

**A** - Número de bactérias contadas no frasco com têxtil tratado após um certo tempo de incubação

**B** - Número de bactérias contadas no frasco com têxtil tratado logo após incubação (t= 0)

**C** - Número de bactérias contadas no frasco com têxtil não tratado logo após incubação (t= 0)

A diferença entre o valor contado no frasco controlo que contem apenas o inóculo após o tempo de incubação (C) e a contagem no frasco contendo a amostra não tratada após o tempo de incubação (D), deverá ser menor de 15%. Se não forem, calcula-se a percentagem de redução na amostra tratada (A) comparando directamente com o controlo não tratado (D).

$$3) 100 (D - A) / D = R$$

Onde

$$D = (B + C) / 2$$

### 3.5.9. Esquema

## ASTM E2149

Determining the Antimicrobial Agents Under Dynamic Contact Conditions

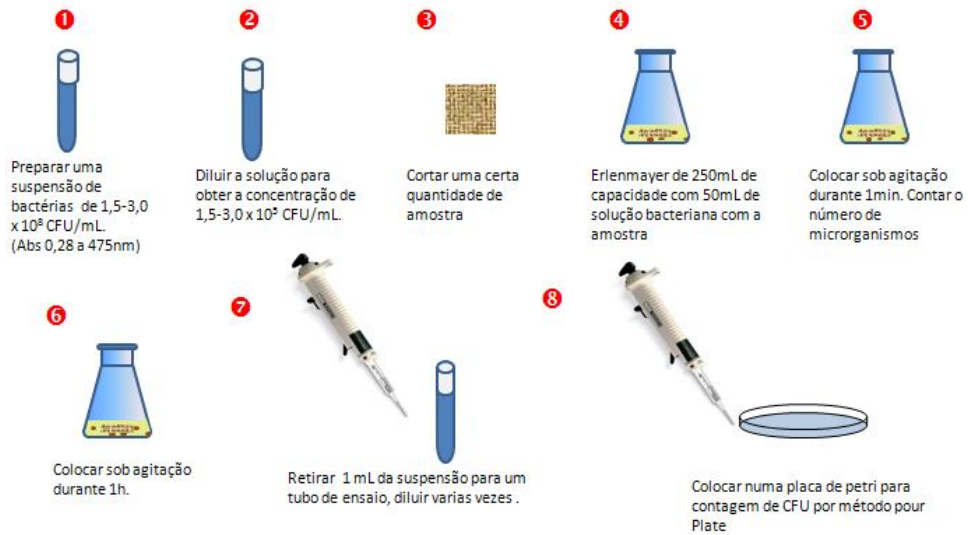


Figura 13 - Esquema representativo do método ASTM E 2149-01 (shake flask test)

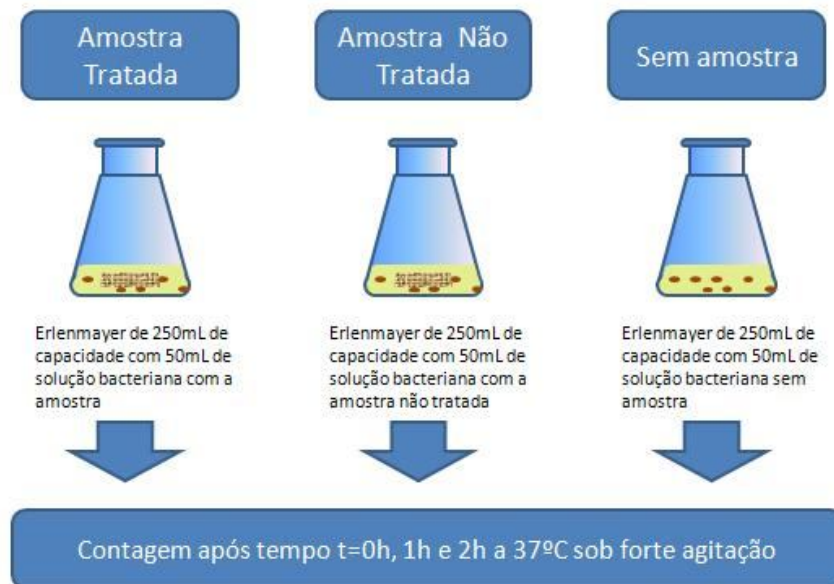


Figura 14 - Esquema representativo do método ASTM E 2149-01

## Resultados

---

### 3.6. Resultados:

Os resultados estão apresentados em duas partes, primeiro os resultados obtidos nos testes qualitativos, teste de difusão em agar (ISO 20645:2005), e depois os resultados obtidos nos testes quantitativos. Nos resultados dos testes quantitativos, é apresentado para cada teste uma tabela com as contagens obtidas, outra apresentando os valores de redução bacteriana. São também apresentados dois gráficos, onde se pode no primeiro fazer uma comparação da redução bacteriana obtida por cada amostra, e no segundo as curvas de “crescimento” da população bacteriana.

### 3.7. Resultados dos testes qualitativos (ISO 20645:2005)

Tabela 5 - Resultados obtidos nos ensaios realizados nos materiais têxteis e fibra testados seguindo a norma ISO 20645 2005.

Composição	Agente antimicrobiano	Nome comercial	Extensão da zona de inibição		Avaliação do efeito antimicrobiano
			S. aureus	E. coli	
100% Algodão	Iões de prata	ISys AG	0	0	Mau
Algodão - PES 50/50%	Iões de prata	ISys AG	0	0	Mau
100% PES	Iões de prata	ISys AG	0	0	Mau
100% PES	Iões de prata	ISys AG	0	0	Mau
100% Algodão (c-5%)*	Triclosano	Ultra-Fresh	17mm	5mm	Muito Bom
40% PES 60% Algodão	Iões de prata	Bioguard 82	0	-	Bom

Tabela 6 - Resultados obtidos na avaliação da actividade antimicrobiana da amostra “UBI Azul” seguindo a norma ISO 20645 2005.

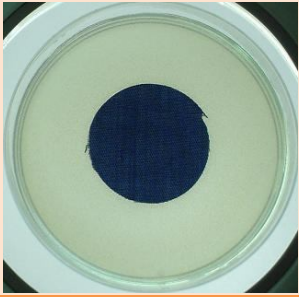
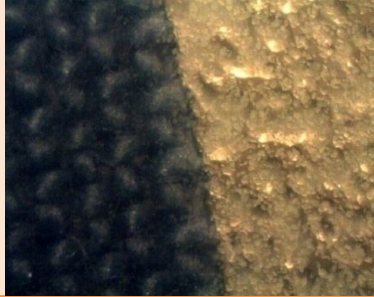






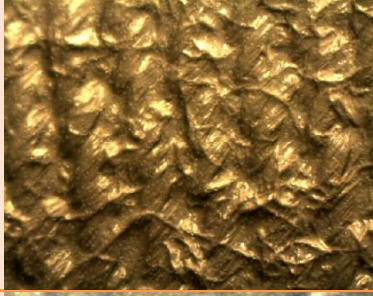


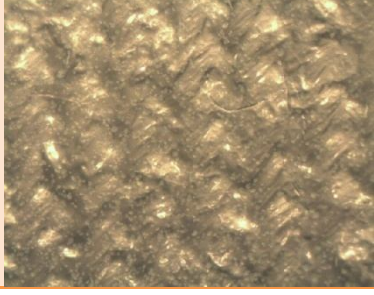
Amostra	Estirpe	Halo	Fotografia	Observação microscópica 30x		Observações
UBI Azul	<i>E. coli</i>	Sem halo				Nenhum halo de inibição, tratamento não difusivo. Nenhuma bactéria no tecido, provavelmente devido á falta de aderência
	<i>S. aureus</i>	Sem halo				Nenhum halo de inibição, tratamento não difusivo. Nenhuma bactéria no tecido, provavelmente devido á falta de aderência
UBI Azul não tratado	<i>E. coli</i>	Sem halo				Sem halo de inibição Nenhuma bactéria no tecido, provavelmente devido á falta de aderência
	<i>S. aureus</i>	Sem halo				Sem halo de inibição Nenhuma bactéria no tecido, provavelmente devido á falta de aderência

Tabela 7 - Resultados obtidos na avaliação da actividade antimicrobiana da amostra "UBI PES" seguindo a norma ISO 20645 2005.

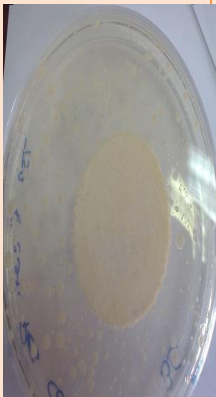
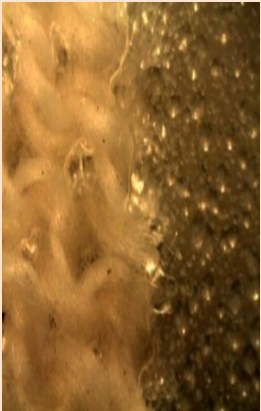


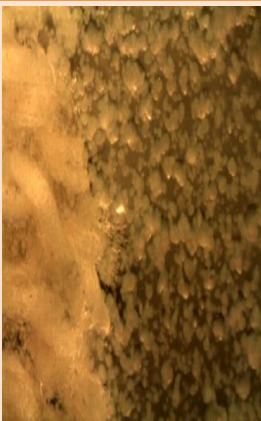
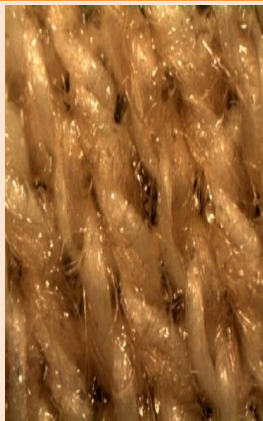


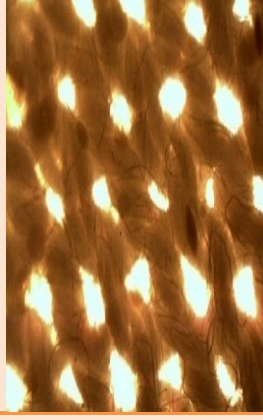
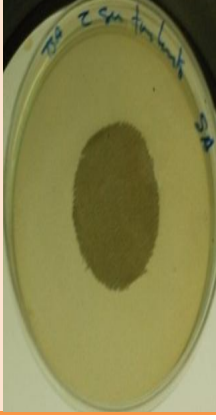
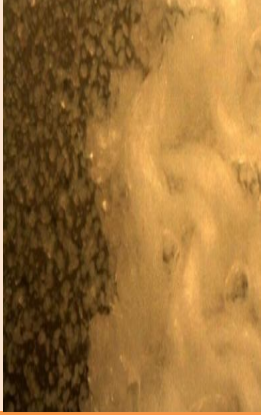
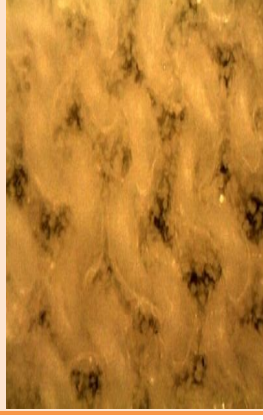
Amostra	Estirpe	Halo	Fotografia	Imagem microscópica 30x		Observações
UBI PES	<i>E. coli</i>	Sem halo				Nenhum halo de inibição. Crescimento diminuído debaixo do provete. Nenhuma colónia no tecido, provavelmente devido á falta de aderência grande crescimento partes intersticiais da malha
	<i>S. aureus</i>	Sem halo				Nenhum halo de inibição. Crescimento diminuído debaixo do provete. Nenhuma colónia no tecido, provavelmente devido á falta de aderência grande crescimento partes intersticiais da malha
UBI PES Não tratado	<i>E. coli</i>	Sem halo				Nenhum halo de inibição. Crescimento diminuído debaixo do provete. Nenhuma colónia no tecido, provavelmente devido á falta de aderência grande crescimento partes intersticiais da malha
	<i>S. aureus</i>	Sem halo				Nenhum halo de inibição. Crescimento diminuído debaixo do provete. Nenhuma colónia no tecido, provavelmente devido á falta de aderência grande crescimento partes intersticiais da malha

Tabela 8 - Resultados obtidos na avaliação da actividade antimicrobiana da amostra “UBI PES/Alg” seguindo a norma ISO 20645 2005.


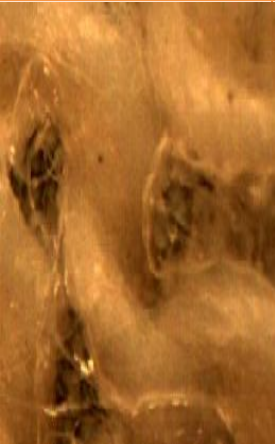
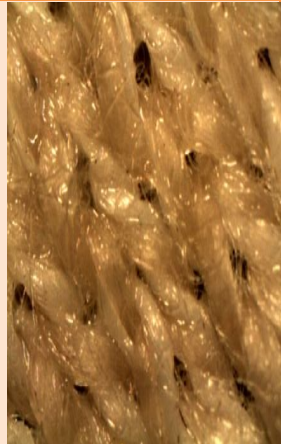

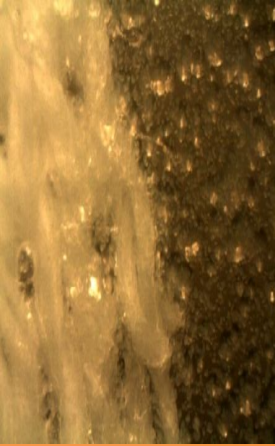
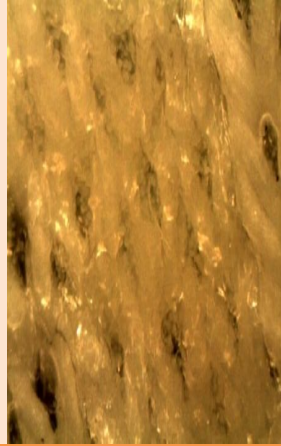

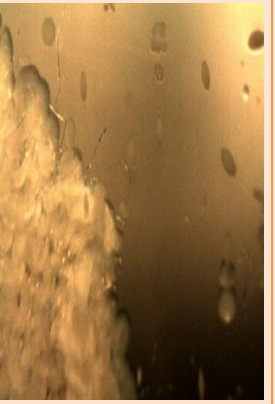


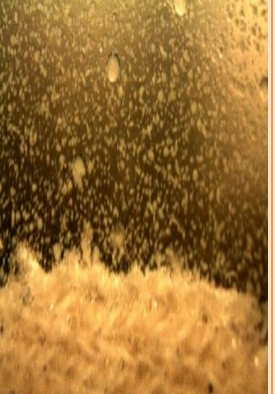
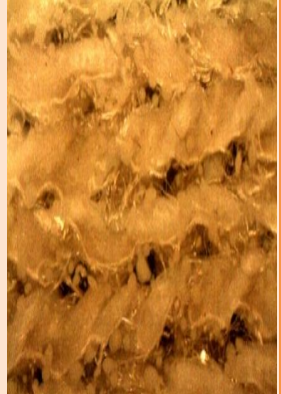
Amostra	Estirpe	Halo	Fotografia	Imagem microscópica 30x		Observações
UBI PES/Alg	<i>E. coli</i>	Sem halo				Nenhum halo de inibição. Crescimento diminuído debaixo do provete. Nenhuma colónia no tecido, provavelmente devido á falta de aderência grande crescimento partes intersticiais da malha
	<i>S. aureus</i>	Sem halo				Nenhum halo de inibição. Crescimento diminuído debaixo do provete. Nenhuma colónia no tecido, provavelmente devido á falta de aderência grande crescimento partes intersticiais da malha
UBI PES/Alg não tratado	<i>E. coli</i>	Sem halo				Nenhum halo de inibição. Crescimento diminuído debaixo do provete. Nenhuma colónia no tecido, provavelmente devido á falta de aderência grande crescimento partes intersticiais da malha
	<i>S. aureus</i>	Sem halo				Nenhum halo de inibição. Crescimento diminuído debaixo do provete. Nenhuma colónia no tecido, provavelmente devido á falta de aderência grande crescimento partes intersticiais da malha

Tabela 9 - Resultados obtidos na avaliação da atividade antimicrobiana da amostra "UBI Alg" seguindo a norma ISO 20645 2005.


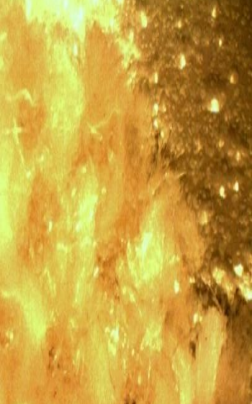
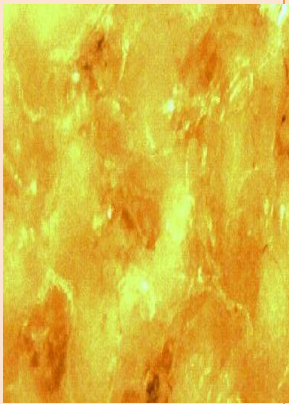


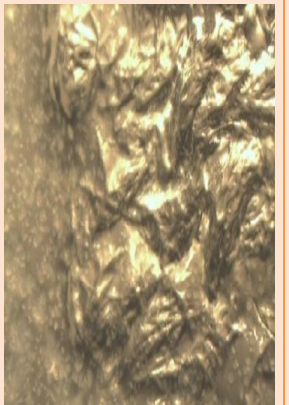
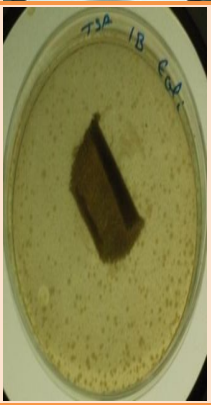
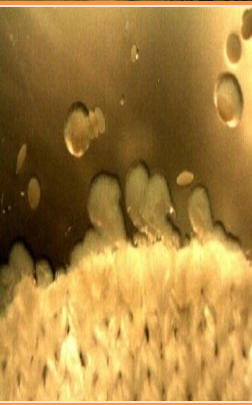




Amostra	Estirpe	Halo	Fotografia	Imagem Microscópica 30x		Observações
UBI Alg	<i>E. coli</i>	Sem halo				Nenhum halo de inibição. Crescimento diminuído debaixo do provete. Nenhuma colônia no tecido, provavelmente devido á falta de aderência grande crescimento partes intersticiais da malha
	<i>S. aureus</i>	Sem halo				Nenhum halo de inibição. Crescimento diminuído debaixo do provete. Nenhuma colônia no tecido, provavelmente devido á falta de aderência grande crescimento partes intersticiais da malha
UBI Alg Não tratado	<i>E. coli</i>	Sem halo				Nenhum halo de inibição. Crescimento diminuído debaixo do provete. Nenhuma colônia no tecido, provavelmente devido á falta de aderência grande crescimento partes intersticiais da malha
	<i>S. aureus</i>	Sem halo				Nenhum halo de inibição. Crescimento diminuído debaixo do provete. Nenhuma colônia no tecido, provavelmente devido á falta de aderência grande crescimento partes intersticiais da malha

Tabela 10 - Resultados obtidos na avaliação da actividade antimicrobiana da amostra “Ultra-fresh” seguindo a norma ISO 20645 2005.



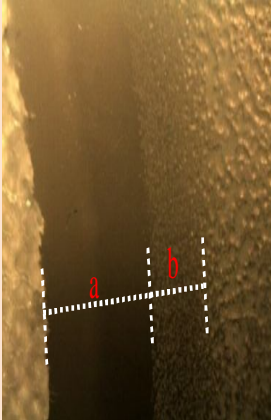

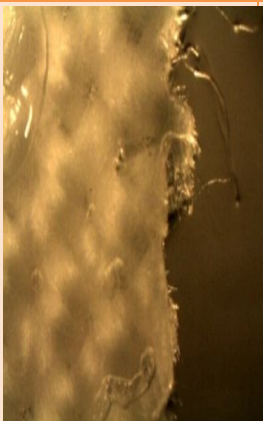


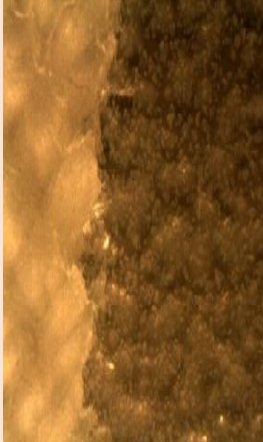
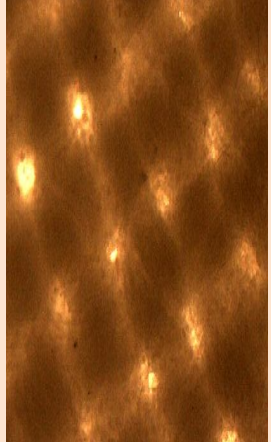



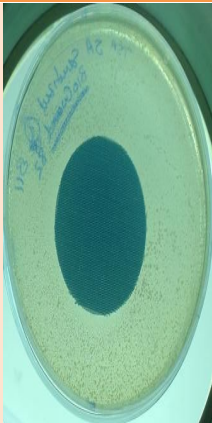

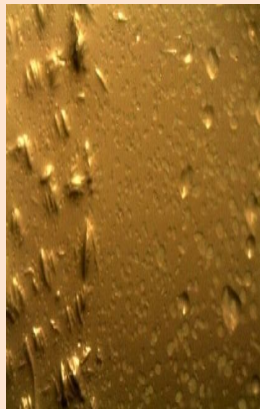
Amostra	Estirpe	Halo	Fotografia	Observação microscópica 30x		Observações
Ultrafresh	<i>E. coli</i>	5mm				Actividade antibacteriana eficaz, com halo de inibição total de 5mm (a), e inibição parcial de 3mm (b).
	<i>S. aureus</i>	17mm				Actividade antibacteriana eficaz, com halo de inibição total de 1,7mm, e inibição parcial de 3mm.
Ultrafresh não tratado	<i>E. coli</i>	Sem Halo				Amostra sem halo de inibição, com crescimento diminuído debaixo do provete, provavelmente devido á falta de oxigénio.
	<i>S. aureus</i>	Sem halo				Amostra sem halo de inibição, com crescimento diminuído debaixo do provete, provavelmente devido á falta de oxigénio.

Tabela 11 - Resultados obtidos na avaliação da actividade antimicrobiana da amostra “Bioguard” seguindo a norma ISO 20645 2005.

Amostra	Estirpe	Halo	Fotografia	Observação microscópica	Observações
Bioguard 82	<i>E.coli</i>	0mm		 	Sem halo de inibição, mas com uma redução significativa do crescimento bacteriano na periferia e sob a amostra. Efeito antimicrobiano bom.

### 3.8. Resultados dos testes quantitativos

#### 3.8.1. AATCC 100

São aqui apresentados os resultados obtidos no teste de actividade antimicrobiana seguindo a norma AATCC-100. O primeiro gráfico apresenta a redução bacteriana provocada pelas várias amostras. Os valores no cimo das colunas apenas se referem ao valor R2 (valor de redução bacteriana obtido através do calculo entre a amostra tratada e não tratada. Mais informações na pagina seguinte.

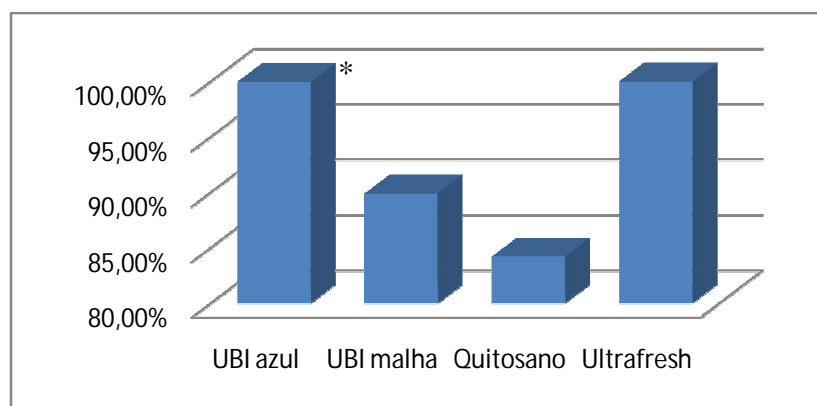


Figura 15- Gráfico da percentagem de redução bacteriana obtida através da norma AATCC-100

\*Amostra anulada

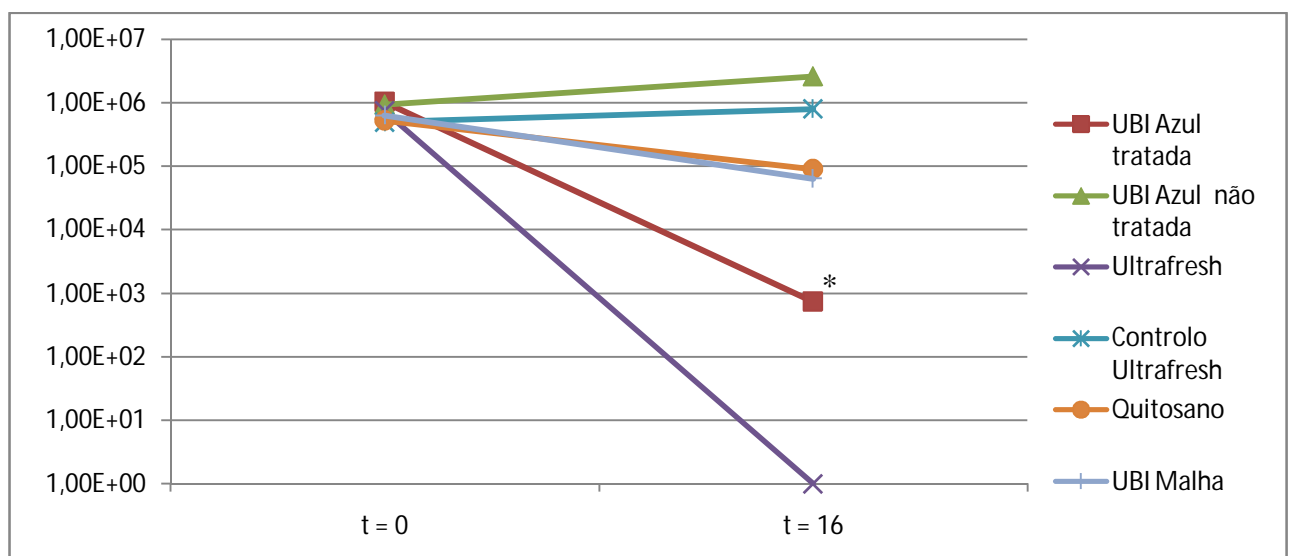


Figura 16 - Gráfico do crescimento bacteriano obtido na avaliação da actividade antibacteriana segundo a norma AATCC100.

\*Amostra anulada

**Tabela 12 - Resultados obtidos na avaliação da actividade antimicrobiana das amostras seguindo a norma AATCC-100.**

Nome da amostra	Extração (ml)	Tempo 0							Tempo 16h						
		Contagem -2			Contagem -3			N° CFU	Contagem -1			Contagem -3			N° CFU
		Placa 1	Placa 2	Média	Placa 1	Placa 2	Média		Placa 1	Placa 2	Média	Placa 1	Placa 2	Média	
UBI Azul tratada*	100	inc.	inc.	inc.	63	68	65,5	1,38E+05	5	4	4,5	0	0	0	9,45E+01
UBI Azul não tratada	100	inc.	inc.	inc.	59	60	59,5	1,25E+05	Inc.	Inc.	Inc.	182	165	173,5	3,64E+05
Ultrafresh	100	inc.	inc.	inc.	49	44	46,5	9,76E+04	0	0	0	0	0	0	0,00E+00
Controlo Ultrafresh	100	inc.	inc.	inc.	40	23	31,5	6,61E+04	Inc.	Inc.	Inc.	30	51	40,5	8,51E+04
Quitosano	100	inc.	inc.	inc.	35	32	33,5	7,03E+04	566	492	529	3	5	4	1,11E+04
UBI Malha	100	inc.	inc.	inc.	33	47	40	8,40E+04	401	425	413	9	3	6	8,67E+03

- Amostra anulada

**Tabela 13 - Percentagem de redução bacteriana obtida através da norma AATCC-100**

	Redução bacteriana
UBI azul	99,97%*
UBI malha	89,90%
Quitosano	84,21%
Ultrafresh	100,00%

\*Amostra anulada.

### 3.8.2. ASTM 2149-01

São aqui apresentados os resultados obtidos no teste de actividade antimicrobiana seguindo a norma ASTM E 2149-01.

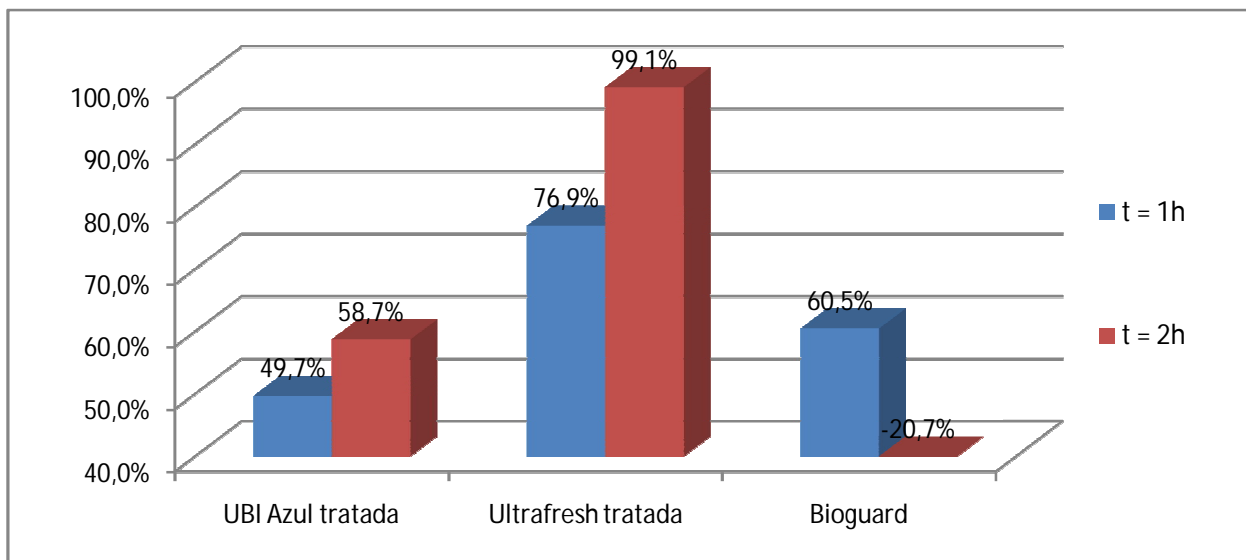


Figura 17 - Gráfico da percentagem de redução bacteriana obtida através da norma ASTM E 2149-01

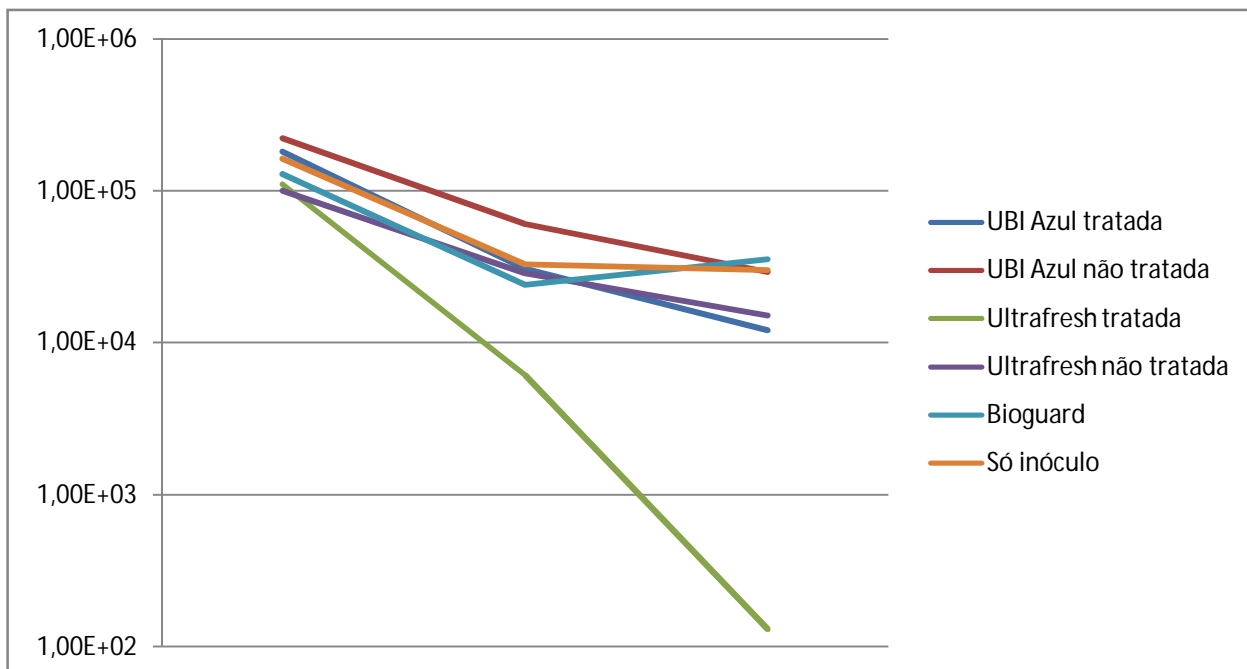


Figura 18 - Gráfico do crescimento bacteriano obtido na avaliação da actividade antibacteriana segundo a norma ASTM E 2149 :01.

Tabela 14 - Resultados obtidos na avaliação da actividade antimicrobiana das amostras seguindo a norma ASTM E 2149 -01.

Tempo (h)	0				1				2						
Diluição	Diluição -3			UFC	Diluição -2			UFC	Diluição			Diluição -2			UFC
	P1	P2	Média		P1	P2	Média		P1	P2	Média	P1	P2	Média	
UBI tratada	185	177	181	1,81E+05	303	307	305	3,05E+04	Inc.	Inc.		122	119	120,5	1,21E+04
UBI não tratada	222	223	222,5	2,23E+05	602	610	606	6,06E+04	Inc.	Inc.		281	303	292	2,92E+04
Ultrafresh tratada	109	111	110	1,10E+05	61	61	61	6,10E+03	16	10	13,0	2	1	1,5	1,30E+02
Ultrafresh não tratada	100	101	100,5	1,01E+05	298	277	287,5	2,88E+04	Inc.	Inc.		145	156	150,5	1,51E+04
Bioguard	126	132	129	1,29E+05	231	248	239,5	2,40E+04	Inc.	Inc.		404	301	352,5	3,53E+04
Só inóculo	158	167	162,5	1,63E+05	325	333	329	3,29E+04	Inc.	Inc..		245	357	301	3,01E+04

Legenda: P1 - Placa 1, P2 - Placa 2

Tabela 15 - Percentagem de redução obtidos através da norma ASTM E 2149 -01.

	Redução bacteriana	
Tempo (h)	1	2
UBI tratada	49,7%	58,7%
Ultrafresh tratada	76,9%	99,1%
Bioguard	60,5%	-20,7%

## Discussão

---

#### 4. Discussão

O trabalho científico realizado em 2007 iniciou um estudo sobre as técnicas de avaliação da actividade antimicrobiana em materiais têxteis. Este estudo era importante, pois grande parte dos testes de desempenho de têxteis funcionais não era realizada por técnicos de microbiologia, mas sim por técnicos especializados na área dos materiais têxteis. A tese acabou por revelar-se um guia para a realização de estudos a têxteis antimicrobianos. Isso iria facilitar a tarefa dos técnicos mas também iria aumentar o rigor dos estudos. Na altura começou-se a projectar uma cadeia de testes para conseguir uma avaliação rigorosa do desempenho dos têxteis antimicrobianos. Estudaram-se intensivamente as duas normas mais conhecidas de testes qualitativos, a norma ISO 20645 e a norma americana AATCC147.

Concluiu-se que os testes de difusão em agar poderiam confirmar que um têxtil era antimicrobiano. No caso de ausência de actividade antimicrobiana na placa de agar, estes testes eram considerados inconclusivos. Isso impulsionou o interesse no estudo das técnicas quantitativas de avaliação da actividade antimicrobiana em materiais têxteis. Continuamos a defender a necessidade da criação duma cadeia de testes onde os primeiros serão os de mais fácil execução, e que sejam pelo menos capazes de fornecer informação para a realização dos testes mais aprofundados. Assim propomos esta cadeia apresentada na figura seguinte (Figura 19):

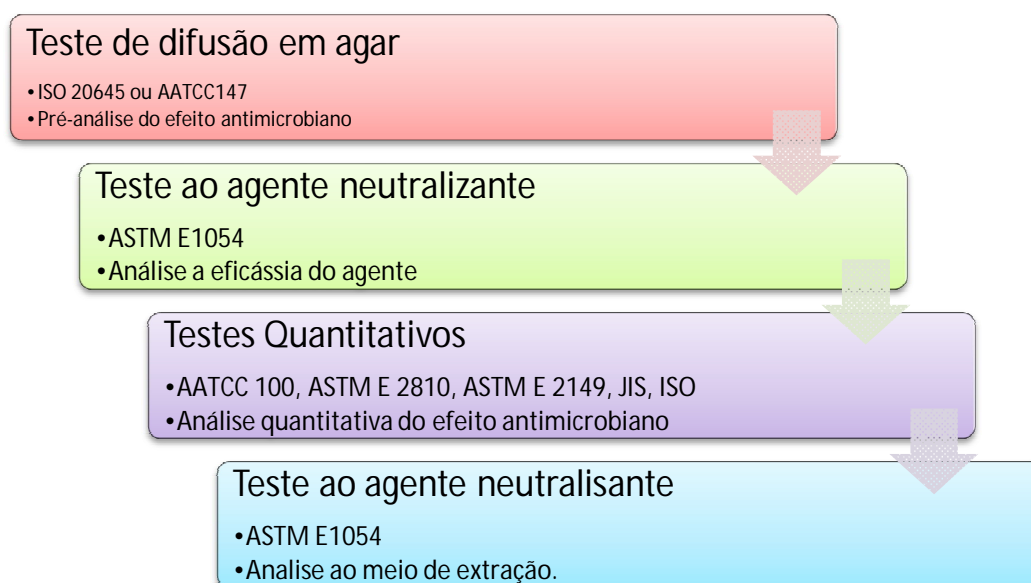


Figura 19 - Processo de avaliação da actividade antimicrobiana em têxteis

Para um estudo completo à actividade antimicrobiana de um têxtil, o processo deverá ser iniciado por estudos físicos á amostra. Qualquer informação adicional sobre esta poderá se

revelar fundamental para a escolha do método de avaliação da actividade antimicrobiana ou mesmo para a análise dos resultados. Este factor não foi incluído no esquema por não pertencer aos testes microbiológicos.

Depois duma boa caracterização das amostras a analisar, deverão ser iniciados os testes com métodos baseados na difusão em agar. Este teste efectua a avaliação da actividade antimicrobiana por inibição do crescimento bacteriano, ou seja, é formada uma zona de inibição na zona circundante da amostra tratada com o composto antimicrobiano que é observada visualmente. A ausência da zona de inibição neste tipo de testes indica a não difusão do agente antimicrobiano da amostra tratada. Deve-se por isso efectuar uma análise cuidada ao têxtil e à área directamente por baixo da amostra. Se for verificado ausência ou diminuição de crescimento microbiano sob o provete, isso poderá significar que a amostra poderá apresentar eficácia relativamente a actividade antimicrobiana.

A zona de inibição é uma medida indirecta da actividade da amostra não apresentando proporcionalidade directa à eficiência do tratamento antimicrobiano. Esta depende de factores como, espessura e composição do agar, concentração de agente antimicrobiano no tecido, da taxa de difusão deste na fibra, dependendo igualmente da humidade, temperatura, e componentes orgânicos. A zona de inibição pode ser usada como comparação da eficiência de diferentes concentrações para o mesmo agente antimicrobiano ou mesmo para avaliação da durabilidade do tratamento antimicrobiano. Contudo, não é uma avaliação representativa para diferentes agentes.

Neste estudo usou-se para a avaliação da actividade antimicrobiana dos têxteis, o procedimento da norma NP EN ISO 20645 2005. Na comparação feita em 2007 com a norma AATCC147, esta mostrou ser a mais rigorosa, e com resultados mais elucidativos.

Para além de todos os factores a ter em atenção sobre este método apresentados na tese de 2007, é também necessário durante o procedimento da norma ISO 20645:2005 ter em atenção dois novos pontos. O primeiro está no rigor da quantidade de agar colocado em cada camada. A norma indica 10ml para a primeira camada, e 5ml para a segunda (camada superior). Uma alteração na quantidade de agar é de relevante importância. Isso poderá alterar significativamente o tamanho do halo de inibição. Por isso alterou-se o procedimento, de modo que a preparação da camada de inferior fosse efectuada em tubos individuais de com 10ml de agar. A aplicação da camada superior com uma micropipeta de 5000uL.

Anteriormente, a pipetagem dos 5mL da camada superior era efectuada com pipetas descartáveis. Com estas, a pipetagem era lenta e pouco prática. O meio solidificava dentro da pipeta, tornando-a inutilizável ao fim de algumas pipetagens. O uso de micropipeta resolveu estes problemas duma só vez.

O segundo novo factor a ter em consideração é a análise microscópica dos resultados. Como se pode ver nas tabelas dos resultados dos testes de difusão em agar, a “olho nu”, há a percepção de não haver crescimento bacteriano sob a amostra têxtil, no entanto a visualização com ampliação 30 vezes permite verificar que há crescimento, apesar de este ser reduzido. Através das imagens microscópicas também conseguimos fazer uma comparação mais rigorosa dos resultados obtidos entre as amostras tratadas e não tratadas. Nas imagens expostas na tabela, pode-se observar que há crescimento diminuído debaixo da amostra tanto na amostra a testar, como na amostra controlo, que poderia criar equívocos com uma falsa percepção de actividade antimicrobiana.

Os testes realizados correram na normalidade, para cada amostra analisada, analisou-se também um espécime do mesmo material têxtil não tratado como controlo negativo.

Nenhuma das amostras provenientes do estudo do Departamento de Tecnologias Têxteis da Universidade da Beira Interior apresentou qualquer actividade antibacteriana pelo método ISO 20645:2005, havendo apenas uma pequena diminuição do tamanho das colónias sob o provete. Este diminuição também foi observada na amostra controlo não tratada, por isso este fenómeno observado não deverá ser devido a acção do tratamento antimicrobiano aplicado.

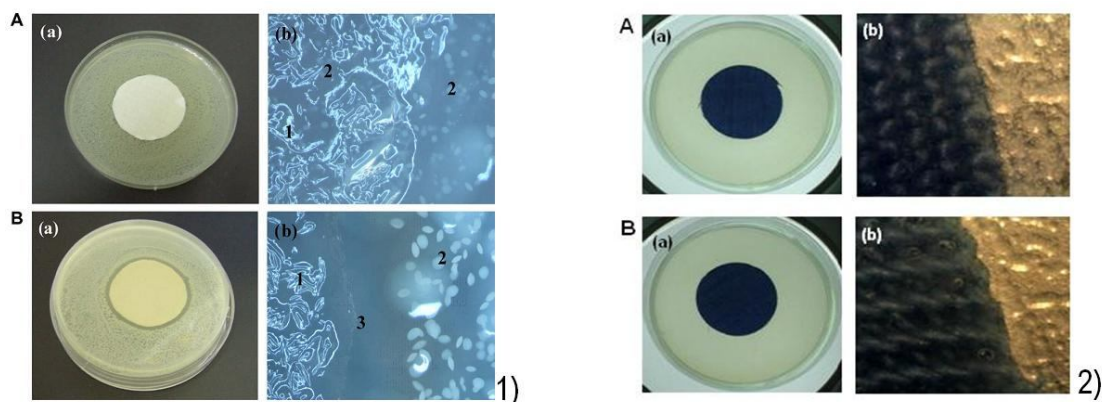


Figura 20 - Desempenho obtido nos têxteis de algodão tratados com ISYS AG contra a bactéria *E. coli*. 1) resultado obtido em “Antimicrobial activity of AgCl embedded in a silica matrix on cotton fabric” de Tomšić B. et al. - Carbohydrate Polymers 75 (2009) 618–626, 2) resultados obtidos no estudo desta investigação científica. Legenda: A – Têxtil não tratado; B- Têxtil Tratado; a)Fotografia; b) Observação microscópica.

Os resultados obtidos não são compatíveis com os estudos feitos com o mesmo tratamento usado, como pode ser observado no estudo “Antimicrobial activity of AgCl embedded in a silica matrix on cotton fabric” de Tomšić B. et al. - Carbohydrate Polymers 75 (2009) 618–626. Podemos observar na Figura 20 a comparação dos resultados obtidos nos testes usando a mesma norma (ISO 20645:2005) e a mesma espécie bacteriana (*E. coli*). São desconhecidos os dados referentes às concentrações e percentagens de tratamento aniticrobiano aplicado nas amostras provenientes da Universidade da Beira Interior, como também o seu método de aplicação.

Foram pedidos mais informações técnicas ao representante português do tratamento para melhor interpretação dos resultados. Tudo indica que poderá ter havido uma falha na aplicação do tratamento, falha que deverá ser analisada e estudada, para evitar repetições.

Para controlo positivo usou-se uma amostra constituída por uma têxtil de algodão tratado no departamento de tecnologias têxteis da universidade da beira interior com o tratamento antimicrobiano Ultra-Fresh gentilmente cedido pela empresa Horquim sediado na Maia – Portugal. O Têxtil foi analisado conforme o método descrito pela norma ISO 20645:2005.

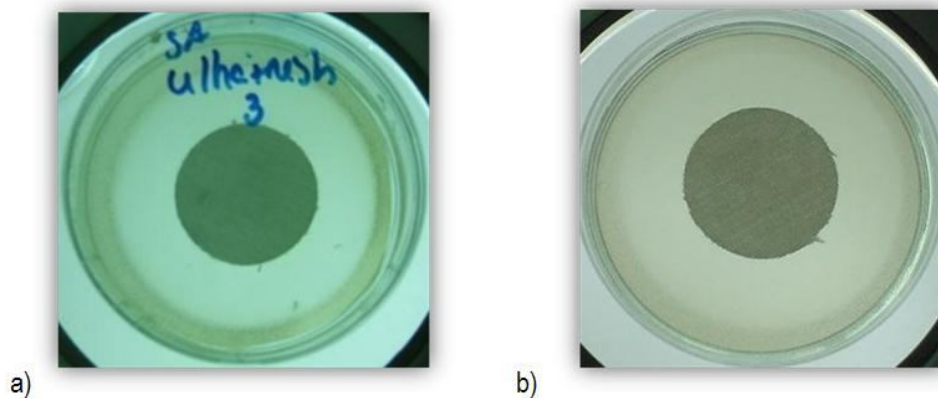


Figura 21 - Desempenho obtido nos têxteis de 100% Algodão tratados com Ultra-Fresh a 5% contra a bactéria *S. aureus*. a) Ensaio 2007; b) Ensaio 2009

Esta amostra foi usada como controlo positivo, obtendo para o caso da estirpe *S. aureus* os mesmos resultados obtidos em 2007 (Figura 21), resultados apresentados na tese de Licenciatura “AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA EM MATERIAIS TÊXTEIS” de Daniel Esteves, apresentada a 6 de Setembro de 2007, na Universidade da

Beira Interior - Covilhã. Durante este tempo a amostra foi guardada em local seco e ao abrigo da luz.

Tabela 16 - Resultados obtidos na avaliação da actividade antimicrobiana do produto Ultra-Fresh em 2007 e 2009

Ano do ensaio	Composição	Agente antimicrobiano	Nome comercial	Extensão da zona de inibição
				<i>S. aureus</i>
2007	100% Algodão (c-5%)*	Triclosano	Ultra-Fresh	17mm
2009	100% Algodão (c-5%)*	Triclosano	Ultra-Fresh	17mm

\*Relação quantidade/peso

O Têxtil Bioguard 82 apresentou uma diminuição significativa do crescimento sob e ao redor do provete, bom exemplo de um, têxtil que não eliminou a totalidade dos microrganismos presentes, considerado um bom exemplo

Depois de efectuados os testes de difusão em agar, iniciaram-se os testes quantitativos. Esta segunda classe de testes antimicrobianos quantifica a eficácia antimicrobiana pela redução da população microbiana, baseados na técnica de contagem dos microrganismos. Analisam-se pela diferença da contagem dos microrganismos das amostras tratadas com as amostras não tratadas.

As elaborações dos testes preliminares forneceram algumas informações:

- A amostra tratada com o tratamento antimicrobiano Ultra-Fresh possui um efeito antibacteriano forte, e o seu agente antimicrobiano é difusivo.
- O agente antimicrobiano presente nas amostras provenientes do estudo do Departamento de Tecnologias Têxteis da Universidade da Beira Interior não aparenta ser difusivo. Além disso, não foi visualizado qualquer efeito antimicrobiano.
- O tratamento antimicrobiano iSys Ag aplicado nas amostras do Departamento de Tecnologias Têxteis da Universidade da Beira Interior acrescenta uma alta hidrofobicidade ao têxtil.

Uma das grandes dificuldades na avaliação de desempenho em materiais têxteis está na imensa variedade de têxteis disponíveis e as diferenças físicas entre eles. As propriedades

físicas do material a testar poderão influenciar o desempenho do teste, a sua textura da superfície e hidrofobicidade poderão ser considerados os mais importantes. As amostras a testar deveriam ter um tamanho único para melhor comparação de desempenhos, cada norma internacional pede um tamanho diferente, portanto, uma uniformização do tamanho e/ou peso das amostras circulares seria importante para melhor comparação de resultados, mesmo usando métodos diferentes.

Como controlos, foram usadas amostras têxteis da mesma natureza mas não tratadas como controlos negativos, e no caso da norma ASTM E 2149 fez-se uma análise do crescimento bacteriano, nas mesmas condições do teste mas sem a presença de amostra.

É importante garantir que a amostra a testar está livre de microrganismos, para que seja avaliado o desempenho do têxtil antimicrobiano apenas contra o microrganismo pretendido. As amostras foram esterilizadas por autoclavagem, segundo a norma AATCC100, fibras de algodão, acetato e outras fibras sintéticas podem ser esterilizadas por este método, e a lã poderá ser esterilizada por óxido de etileno.

Para a norma AATCC100 usaram-se amostras cortadas no mesmo modo que as amostras usadas nos testes de difusão de agar, amostras circulares com 35mm de diâmetro. Numa primeira experiencia, incluíram-se 1000uL de inóculo na amostra, esta quantidade parecia ser demasiada para apenas uma unidade de têxtil, como o volume de inóculo poderá se situar entre 500 e 1000uL, colocou-se 1000uL, a quantidade máxima.

Como a prioridade nesta fase do estudo seria a análise das técnicas, optou-se por não efectuar os testes com duplicados, isso iria aumentar significativamente o trabalho, e as probabilidades de erros. No entanto procedeu-se às contagens de microrganismos em duplicado. No caso de estudos mais aprofundados usando esta técnica é altamente recomendável o uso de amostras duplicadas.

Para os testes preliminares é importante escolher estirpes abrangentes, isto é, estirpes onde se possa ver reflectido o comportamento do maior número de microrganismos possível. Por isso na maioria das vezes é escolhido, um fungo, uma bactéria Gram-positiva e uma bactéria Gram-negativa.

As várias normas estudadas geralmente aconselham o uso das estirpes *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*. Como o laboratório possuía uma estirpe ATCC *E. coli*,

e a mudança não aplicava grande alteração nos resultados, optou-se por usar esta em vez de uma estirpe de *Klebsiella pneumoniae*, a qual já foi encomendada para estudos posteriores.

De modo a ter a confirmação do grau de pureza das estirpes usadas nos ensaios analíticos, foram realizados os seguintes testes. Para todas as estirpes efectuou-se a observação microscópica e respectiva coloração de Gram.

Para a estirpe *S. aureus* fez-se uma cultura em meio Baird-Parker com EY (Egg Yolk) Tellurite Enrichment. Este meio permite a identificação dos estafilococos coagulase positivos. Normalmente, as estirpes de *Staphylococcus* coagulase positivas são negras com halo devido à acção das lipases sobre o ovo. Uma colónia isolada de cada estirpe foi transferida para uma placa de agar tryptone soya agar TSA e incubada à 37°C durante 24h. Pode-se perfeitamente observar-se na Figura 22, as colónias negras características de *S. aureus* em meio Baird-Parker.

Para a estirpe *E. coli* fez-se uma coloração de Gram, e observou-se em microscópio óptico. Também se fez uma cultura em meio Tryptone bile x-glucuronide médium (TRYPTONE BILE X-GLUCURONIDE MEDIUM (TBX); Oxoid, Oxoid Ltd. Basingstoke, Hampshire, England). Podemos observar na Figura 22, as colónias verdes características da bactéria *E. coli* em meio TBX.



Figura 22 - Cultura das estirpes usadas nos testes em meio cromogénico. a) *E. coli* b) *S. aureus*

Os estafilococos e as enterobacteriaceas são conhecidos por possuírem a capacidade de adquirir resistência. Por isso é importante garantir que a estirpe é pura e não possui qualquer tipo de alteração.

Para os estudos, usaram-se algumas estirpes provenientes do banco ATCC® (American Type Culture Collection). As amostras da American Type Culture Collection (ATCC) são recomendadas para controlo de qualidade, a total identificação e disponibilidade destas estirpes possibilitam que seja possível reproduzir novamente o mesmo estudo científico com a mesma estirpe, podendo assim comprar resultados. Facilmente se encontram artigos científicos sobre vários temas usando a mesma estirpe, podendo assim ter mais informação sobre a estirpe em causa. Deverão ser usadas culturas de bactérias com menos de 24h, e se possível cultivadas em meio similar ao meio usado no teste. Este procedimento é extremamente importante para garantir que os microrganismos não se encontrem “stressados”, e tenham uma boa viabilidade. As bactérias têm grande capacidade para adaptar-se ao meio onde estão incluídas. Quando a bactéria muda de ambiente, ela consegue alterar o seu metabolismo para sobreviver e multiplicar-se. Por isso é importante que a estirpe de teste seja previamente cultivada num meio com as mesmas propriedades do ambiente de teste. Nos testes de actividade antimicrobiana elaborados neste trabalho científico, usou-se o meio Tryptone Soya Agar (TSA) para contagens de unidades formadoras de colónias (CFU) e Tryptone Soya Broth (TSB) para o crescimento/preparação das estirpes.

O inóculo poderá influenciar o desempenho do teste, nomeadamente a sua concentração em microrganismos e o seu modo de preparação. É importante realçar que a suspensão bacteriana deve ser preparada com soro fisiológico estéril e nunca com água destilada. A diferença de osmolaridade entre o interior da bactéria e o meio envolvente promove a passagem do solvente de uma solução de baixa concentração de soluto (alta conc. de água) para uma solução com alta concentração de soluto (ou baixa conc. de água). A força com que a água se move através da membrana é a pressão osmótica. O soro fisiológico é uma solução a 0,85%, de cloreto de sódio, por vezes designada como “solução salina normal”, o que é incorrecto, visto não se tratar de uma solução “normal”, no sentido químico do termo. Também designada, simplesmente como “solução salina”. O soro fisiológico tem uma pressão osmótica mais ou menos idêntica à do soro sanguíneo dos mamíferos e está, por isso, indicado para suspensões de células sanguíneas, comum para a maior parte dos microrganismos. Não contém porém, qualquer tampão, e aconselha-se a adição de tampão fosfato, como líquido geral de suspensão (Jacob, 1970).

Os métodos realizados neste trabalho, AATCC 100 e ASTM E 2149, indicam o uso de uma diluição de uma cultura 24h em meio nutriente, TSB por exemplo. A partir de uma

diluição de cultura deverá ser obtida a solução de trabalho ( $1-3 \times 10^5$  CFU/ml). A norma ASTM E 2149 expõe de um modo muito simples o método a usar para obter uma solução com uma concentração bacteriana na ordem dos  $10^5$  células por mililitro, a partir de uma cultura de 18h em TSB sob agitação a  $37 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Um dos factores mais importantes nos métodos quantitativos é a escolha do meio de trabalho. Por meio de trabalho entende-se o meio inoculado em que a amostra têxtil entra em contacto durante o tempo de teste. As normas testadas (AATCC100 e ASTM E 2149) indicam o uso de uma solução tampão salina para o procedimento do teste. No entanto, usou-se meio RINGER na realização dos testes quantitativos, o meio Ringer acaba por ser uma solução similar ao tampão fosfato, mas com a adição de mais alguns minerais, que permitem uma manutenção de uma população bacteriana durante um certo tempo, supostamente suficiente para o tempo de ensaio. No teste AATCC100 observou-se um aumento da população bacteriana nas amostras controlo (não tratadas). No teste ASTM E 2149 observou-se uma diminuição acentuada em todas as amostras (inclusive nas amostras controlo), mas também na cultura controlo, frasco incubado com a mesma solução bacteriana, e sujeita às mesmas condições em que as amostras têxteis foram sujeitas.

Seria importante realizar um estudo de comparação das normas com diferentes meios (Figura 23).

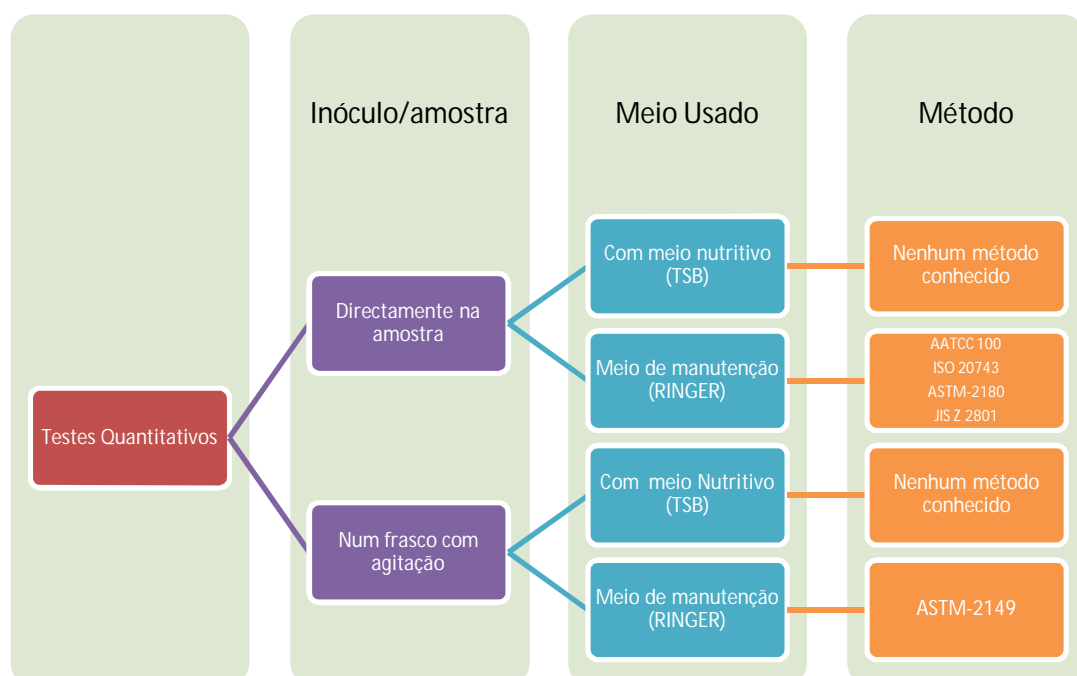


Figura 23 – Métodos para determinação da actividade antimicrobiana em têxteis.

O uso de um meio nutriente durante o teste poderia permitir fazer uma boa diferenciação entre um têxtil bactericida ou bacteriostático. Esta questão surge porque parece haver uma estreita diferença entre a definição de “bacteriostático” e “bactericida”: “bacteriostático” significa que o agente previne o crescimento dos microrganismos (mantém o crescimento na fase estacionária de crescimento), e “bactericida” significa que mata os microrganismos. Na realidade não existem dois verdadeiros tipos de agentes antimicrobianos (um que mata exclusivamente os microrganismos e outro que apenas inibe o seu crescimento). Um agente bacteriostático em grandes concentrações é bactericida tal como os agentes bactericidas em baixas concentrações são bacteriostáticos.

Alguns agentes chamados “bactericidas” não conseguem matar todos os microrganismos após 18-24h, e alguns agentes “bacteriostáticos” matam a população microbiana em menos de 16h na ordem dos 90%-99%, não o suficiente para ser chamado bactericida (99,9%) como aconteceu no caso da amostra Ultra-Fresh.

A determinação microbiológica *in vitro* para a classificação de agente anti-bacteriano de bactericida ou bacteriostático pode ser influenciada pelas condições do crescimento, pela densidade bacteriana, pela duração do teste, e pela extensão da redução da população bacteriana (Pankey et al., 2004). Por isso é muito importante controlar estes parâmetros quando é elaborado uma avaliação de actividade antimicrobiana. Uma curva de crescimento de uma população bacteriana poderá fornecer informação para determinar se um têxtil antimicrobiano possui efeito bactericida ou bacteriostático. A definição de actividade bacteriostática ou bactericida para um determinado tratamento antibacteriano aplica-se apenas a um organismo em particular (ou mesmo à estirpe) contra qual foi testado e sob condições de teste específicas usadas.

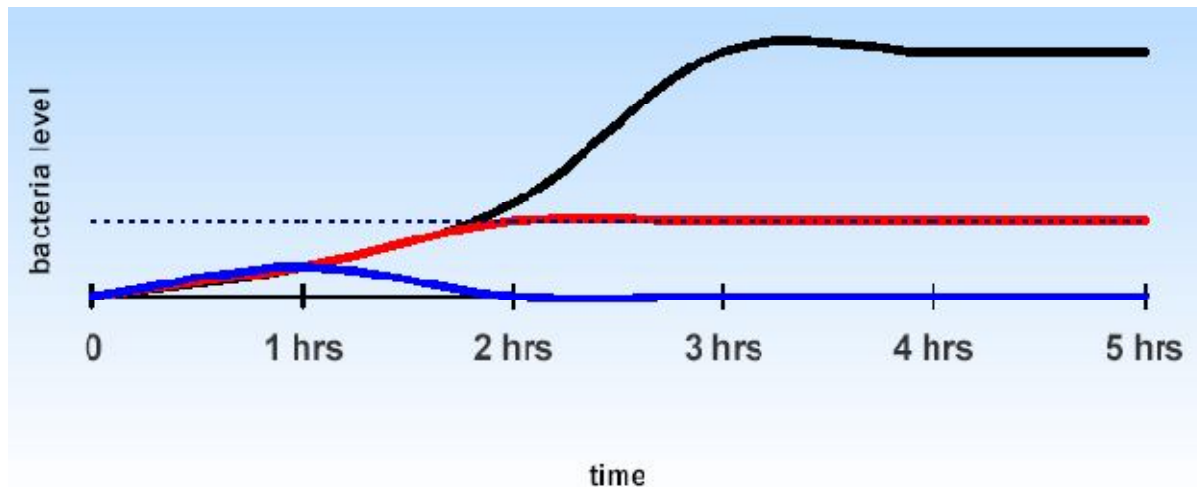


Figura 24 - Curvas de crescimento da população bacteriana em têxteis antimicrobianos (adaptado de nylstar).

Legenda: ( ■ Bactericida, ■ - Bacteriostático, ■ Curva normal de crescimento bacteriano)

Para melhor compreensão dos mecanismos de acção antimicrobiana é necessário ter em conta o processo de crescimento bacteriano. Embora as bactérias desenvolvam-se bem em meios de cultura sólidos, os estudos de crescimento são feitos essencialmente em meios líquidos e as considerações que seguem são válidas para essas condições (Frobisher, 1978). Nos estudos de actividade antimicrobiana, é aconselhado fazer uma medição a população microbiana após 2, 18 ou 24 horas. Estes intervalos de tempo irão depender do microrganismo usado no estudo, o tempo de crescimento varia não só do ambiente onde o microrganismo está incluído mas também o microrganismo em si. Algumas bactérias têm um tempo de divisão de 25 horas, no entanto o tempo de divisão na maioria das bactérias está entre 1 e 3 horas. As células bacterianas crescem muito rapidamente. Por exemplo, através da fissão binária, as bactérias podem duplicar o seu número em cada 20 minutos. Após 30 gerações das bactérias (10 horas), o número poderá alcançar um bilhão. É difícil representar graficamente mudanças da população deste valor usando números aritméticos, assim que as escalas logarítmicas são usadas representar graficamente o crescimento bacteriano (Betsy et al, 2005).

Quando uma determinada bactéria é semeada num meio líquido de composição apropriada e incubada em temperatura adequada, o seu crescimento segue uma curva definida e característica.

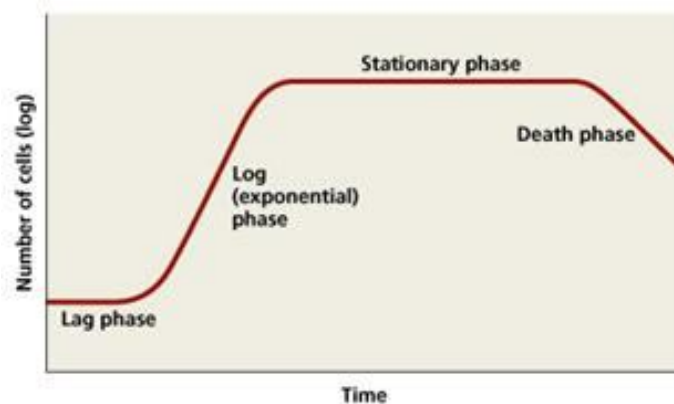


Figura 25 - Curva característica de crescimento bacteriano (adaptado Frobisher, 1978)

**Fase lag:** esta fase de crescimento ocorre quando as células são transferidas de um meio para outro ou de um ambiente para outro. Esta é a fase de ajuste e representa o período necessário para adaptação das células ao novo ambiente. As células nesta fase aumentam no volume total em quase duas ou quatro vezes, mas não se dividem. Estas células estão a sintetizar ADN, novas proteínas e enzimas, que são um pré-requisito para divisão.

**Fase exponencial ou log (B):** nesta fase, as células estão se dividindo a uma taxa geométrica constante até atingir um máximo de crescimento. Os componentes celulares como ARN, proteínas, peso seco e polímeros da parede celular estão também aumentando a uma taxa constante. Como as células na fase exponencial estão se dividindo a uma taxa máxima, elas são muito menores em diâmetro que as células na fase Lag. A fase de crescimento exponencial normalmente chega ao final devido à depleção de nutrientes essenciais, diminuição de oxigénio em cultura aeróbia ou acúmulo de produtos tóxicos.

**Fase estacionária (C):** durante esta fase, há rápido decréscimo na taxa de divisão celular. Eventualmente, o número total de células em divisão será igual ao número de células mortas, resultando na verdadeira população celular estacionária. A energia necessária para manter as células na fase estacionária é denominada energia de

manutenção e é obtida a partir da degradação de produtos de armazenamento celular, ou seja, glicogénio, amido e lípidos.

***Fase de morte ou declínio (D):*** quando as condições se tornam fortemente impróprias para o crescimento, as células se reproduzem mais lentamente e as células mortas aumentam em números elevados. Nesta fase o meio se encontra deficiente em nutrientes e rico em toxinas produzidas pelos próprios microrganismos (Frobisher, 1978).

Como foi referido, na fase lag não há divisão celular. Nesta fase um tratamento antimicrobiano poderá matar toda a população bacteriana em solução, se não o fizer entretanto, irá iniciar-se a fase de crescimento exponencial. Nesta fase a taxa de crescimento é enorme chegando a um pico de crescimento estabilizando na fase estacionária, a acção do agente antimicrobiano na fase exponencial poderá ser limitada devido á alta taxa de crescimento bacteriano. Com o mesmo têxtil antimicrobiano, poderá não haver registo de redução de bactérias na fase log ou lag mas poderá ser observada na fase estacionária. Isso acontece porque na fase estacionária existe um equilíbrio entre o número total de células em divisão e o número de células mortas. Um agente antimicrobiano em solução poderá desfazer este equilíbrio provocando uma redução na população bacteriana. Um agente biocida irá até eliminar toda a população antes que o crescimento desta chegue à fase de declínio, um tratamento bioestático irá reduzir o número de microrganismos mas não irá matar a população microbiana na totalidade. Por isso, nos estudo de actividade antimicrobiana baseados na redução de microrganismos, é fundamental não só fazer uma contagem de microrganismos, mas sim faze-lo em intervalos bem definidos para poder fazer uma avaliação mais correcta do efeito antimicrobiano. Nota-se que um tratamento antimicrobiano poderá não ter actividade aparente num estudo de difusão em agar mas poderá no entanto ser antimicrobiano, por isso é que é essencial não só estudar a actividade antimicrobiana de tratamentos antimicrobianos através de testes qualitativos baseados em difusão em agar, mas também é necessário estudar esta actividade por testes baseados pela diminuição da população bacteriana.

Como foi referido anteriormente, poderá mais tarde ser feito um estudo de comparação entre os vários métodos, usando um inóculo com e sem nutrientes. No entanto, nesta fase deu-se mais valor aos métodos em si, no intuito de fornecer dados para que os testes sejam reproduzidos mais facilmente, e com maior rigor.

No caso da norma AATCC100, o inóculo foi directamente pipetado para a amostra com o auxílio de uma micropipeta, este método não apresentou qualquer problema excepto para a amostra “UBI Azul”. O inóculo não teve contacto com a amostra, devido à sua alta hidrofobicidade e por isso a sua anulação, no entanto procedeu-se na mesma às contagens nos vários tempos. Esta acaba por ser uma grande limitação do tipo de teste como o AATCC 100. E por isso foi estudado também a norma ASTM que consegue contornar este problema. A ASTM criou esta norma especialmente para resolver este problema, já que ela também possui uma norma com um procedimento similar ao teste AATCC100 (ASTM-2180). A norma ASTM 2180 já é adaptada não só para materiais têxteis mais também para materiais sólidos, revestimentos e outros tipos de produtos que não podem ser testados pelas técnicas do tipo AATCC100.

A temperatura corresponde a um dos principais factores ambientais que influenciam o desenvolvimento bacteriano. A medida que há um aumento da temperatura, as reacções químicas e enzimáticas na célula tendem a tornar-se mais rápidas, acelerando a taxa de crescimento. A partir de determinada temperatura inicia-se o processo de desnaturação de proteínas e ácidos nucleicos, inviabilizando a sobrevivência celular. Assim, todos os microrganismos apresentam um intervalo de temperatura onde se ocorre uma faixa máxima de crescimento.

O objectivo de testes de laboratório no âmbito deste trabalho é a simulação mais fiel possível das condições de uso do dia-a-dia de um têxtil. Na maioria das normas, o teste é realizado a uma temperatura de 37°C, temperatura ideal para o crescimento da maioria dos microrganismos mesófilos, a esta temperatura, a taxa de replicação é máxima. No entanto, o teste poderá ser realizado à temperatura de 22°C, para que sejam assim melhor simuladas as condições a que estão sujeitos os têxteis no dia-a-dia.

A temperatura deverá ser controlado nos testes quantitativos, é importante que o inóculo não estar a uma temperatura muito baixa devido ao curto tempo a que este decorre

(~180min), se o inóculo for preparado com soro fisiológico à uma temperatura muito baixa, acabada de tirar do frigorífico por exemplo, haverá uma mudança brusca de temperatura do meio ambiente dos microrganismos, para além disso, este meio levará ainda alguns minutos até atingir os 37°C, temperatura ideal para o crescimento dos microrganismos. Quanto menor for a variação da temperatura do meio ambiente menor será o tempo de adaptação dos microrganismos e melhor será o seu desempenho.

A norma quantitativa para a avaliação da actividade antimicrobiana em têxteis ASTM E 2149 não aconselha o uso de tempos de teste maiores que duas horas, além disso a grande maioria dos estudos feitos com esta técnica ou outra similar não indicam contagens em tempos superiores. Para mais tarde poderá ser feito um estudo com tempos de exposição mais alargados. A norma AATCC100 dá uma margem de 18h a 24h de tempo de exposição. Esta exposição prolongada requer cuidados acrescidos nas condições de teste, principalmente a nível da humidade relativa do sistema. Nos resultados obtidos na técnica ASTM E 2849 (Figura 17) observamos que só após 1 hora é que pode ser diferenciada a actividade antimicrobiana de diferentes amostras. Por isso, o tempo de incubação nesta técnica nunca deverá ser menor que 2 horas.

A humidade relativa do sistema pode influenciar tanto o desenvolvimento dos microrganismos como o desempenho da amostra têxtil na avaliação da sua actividade antimicrobiana. Todos os microrganismos necessitam de água para o seu crescimento, constituindo entre 80 - 90% do peso total das células vivas. É a quantidade de água disponível que determina se existirá crescimento e a sua velocidade. A humidade disponível é expressa como actividade da água, "aw", que significa a pressão parcial de vapor de água de uma solução ou de um alimento. A maioria das bactérias cresce bem em meios com um aw compreendido entre 0,999 e 0,998, o crescimento em água pura, (aw = 1,00), é impossível. É de salientar ainda que muitas bactérias não crescem com aw inferior a 0,95. Num artigo de Hirai (1991), o autor relata que os cocos Gram-positivos eram normalmente resistentes, e, em contraste, as estirpes Gram-negativos perdiam a sua viabilidade muito rapidamente sob condições secas (Hirai 1991).

As circunstâncias ambientais, isto é, húmidas ou secas, devem ser tomadas em consideração quando se estão a avaliar amostras têxteis. A presença da matéria orgânica em amostras clínicas (lençóis de hospitais, ligaduras, etc.) tais como exsudados de tecido, sangue, e expectorações também poderão influenciar a sobrevivência bacteriana (Hirai, 1991).

Em alguns estudos de actividade antimicrobiana, os autores realizam este teste levando as amostras a incubar à temperatura e humidade relativa de 22,3°C e 50% respectivamente para condições secas, e 22.3°C e 100% para condições húmidas. Neste artigo, Takai et al., comenta que as amostras ficaram secas ao fim de duas horas nas condições secas, em condições húmidas, as amostras permaneciam húmidas mesmo após 24h de incubação (takai et al., 2002).

No caso da técnica apresentada pela AATCC (AATCC-100), a humidade poderá comprometer seriamente o sucesso do teste. Os primeiros testes efectuados não tinham este factor em consideração, 18h depois observou-se que as amostras estavam completamente desidratadas, e sem presença de microrganismos. A colocação dos Erlenmayer dentro duma caixa de plástico com o fundo cheio de água funcionou na perfeição, 24 horas depois do inicio do teste as amostras continuavam húmidas.

Torna-se sempre complicado comparar directamente a actividade antimicrobiana entre duas amostras distintas. A relação peso/área de superfície da amostra poderá influenciar no rendimento dos tests. Duas amostras com o mesmo peso, poderão ter áreas de contacto diferentes.

Como se pode ver na Figura 23, existem dois grandes grupos de testes quantitativos. O primeiro grupo é caracterizado pelas condições estáticas do sistema, isso é, o inóculo é colocado directamente em contacto com a amostra, é feita a contagem no inicio e no fim do teste. Exemplos deste tipo de teste são a normas AATCC 100, ISO 20743, ASTM-2180 e JIS Z 2801. O outro tipo inclui apenas a norma ASTM E 2149. Como se pode ler no procedimento, nesta norma, a amostra é colocada num caldo inoculado, e agitado.

Para este estudo escolheu-se uma norma de cada tipo. A norma AATCC 100 para as condições estáticas, e a norma ASTM E 2149 para as condições dinâmicas. A vantagem da técnica em condições dinâmicas está no facto de poder ser usado para materiais hidrofóbicos.

O processo de contagem inicia-se com a adição do meio de extração, este meio deverá ser o mais similar possível com o meio de cultura para contagens. Este meio terá de possuir agentes de neutralização.

Se um produto possui propriedades antimicrobianas, deve ser neutralizado no final do teste, quando é feita a contagem dos microrganismos sobreviventes. Isso para evitar que o

agente antimicrobiano continue a actuar durante o processo de extracção e contagem. É necessário para a validação do teste, o procedimento da validação da neutralização do agente neutralizante, para comprovar que a solução de neutralização usada é eficaz a inibir as propriedades antimicrobianas do produto, sem prejudicar microrganismos vivos.

A ASTM criou uma norma especificamente para testar os meios de neutralização, o método ASTM E1054 faz uma descrição de três métodos diferentes para testar o meio de neutralização (ensaio de neutralização):

***Ensaio de neutralização em meio sólido*** - Ensaio para a eficácia do meio neutralizante que quantifica populações de microrganismos em meio sólido (agar). Este método é apropriado para agentes antimicrobianos que podem ser quimicamente desactivados ou diluídos para níveis sub-inibitórios.

***Ensaio de neutralização em meio líquido*** - Ensaio para a eficácia do meio neutralizante que quantifica populações de microrganismos em meio líquido. Este método é apropriado para agentes antimicrobianos que podem ser quimicamente desactivados ou diluídos para níveis sub-inibitórios.

***Ensaio de neutralização por filtração em membrana*** - Ensaio onde se recupera e quantifica populações de microrganismos utilizando uma membrana de filtração. Este método é apropriado para agentes antimicrobianos que não podem ser quimicamente inactivados ou diluídos a níveis sub-inibitórios. Este método não deve ser utilizado quando surgem dificuldades forem durante o processo de filtração.

Este ensaio revela-se importante, visto que no caso de agentes antimicrobianos dispersivos, estes irão difundir-se no meio de trabalho, e no meio de recuperação. Ao ser extraído parte dele para contagens, o agente antimicrobiano poderá influenciar o crescimento bacteriano nas placas de contagens. O que poderá fornecer um erro, diminuindo o número de CFU. O ideal seria testar todos os microrganismos utilizados na avaliação da actividade antimicrobiana no ensaio de neutralização. No entanto, podem ser seleccionados os organismos "representantes" para o teste, considerados adequados pelo investigador.

Uma limitação destes procedimentos de avaliação está no facto de utilizam microrganismos que não tenham sido expostos a um agente antimicrobiano. Sob condições experimentais, as células são expostas ao procedimento de neutralização são susceptíveis de

estarem danificadas em diferentes graus pelo agente antimicrobiano. As lesões sub-letais podem influenciar os resultados, e deveria ser analisado ao papel do processo de neutralização na recuperação de organismos feridos.

Na

Tabela 17 estão expostos alguns métodos de neutralização:

**Tabela 17 - Processos aplicados para neutralização de alguns agentes antimicrobianos (Sutton, S.; 1996)**

Antimicrobial Agent	Neutralizers/Inactivators
Alcohols Isopropanol, Phenoxyethanol	Polysorbate 80, dilution to sub-inhibitory levels
Aldehydes 2-Bromo-2-nitropropane-1, 3-diol (Bronopol) Formaldehyde Glutaraldehyde	Serum, cysteine, thiosulfate, thioglycolate, metabisulfite Sodium sulfite, ammonia, histamine Dilution to sub-inhibitory levels, sodium bisulfite, sodium sulfite, glycine, cystine, cysteine Dilution to sub-inhibitory levels
Chloraltriazaazoniaadamantane (Dowicil 200) Dimethyloldimethyl hydantoin (Glydant)	Dilution to sub-inhibitory levels Dilution to sub-inhibitory levels
Biguanides and Bis-biquanides Chlorhexidine Polyhexamethylene biguanide HCL (Cosmocil CQ)	Lecithin/polysorbate 80, sodium oleate Polysorbate 80/lecithin
Phenolics Phenylphenol, Chloroxylenol, Cresols, Chlorocresols, Phenol	Nonionic surfactants, polysorbate 80, and/or dilution to sub-inhibitory levels
Bis-Phenols Triclosan Hexachlorophene	>10 % polysorbate 80/lecithin, and dilution to sub-inhibitory levels >10 % polysorbate 80/lecithin, and dilution to sub-inhibitory levels
Quaternary Ammonium Compounds Cetrimide, Benzalkonium and Benzethonium Chloride	Lecithin/polysorbate, suramin sodium, organic material, 0.5 % polysorbate 80, cyclodextrins Sulfhydryl compounds, thioglycolic acid, thiosulfate, bisulfite, ammonium sulfite
Mercurials	Nonionic surfactants, dilution to sub-inhibitory levels, pH 7 or above
Organic Acids Benzoic, Propionic, Sorbic	Nonionic surfactants, dilution to sub-inhibitory levels, pH 7 or above
Halogens Hypochlorite Iodine Bromine	Thiosulfate and/or dilution to sub-inhibitory levels Thiosulfate, polysorbate 80, skim milk Thiosulfate and/or dilution to sub-inhibitory levels
EDTA Imidazolidinyl urea Methyl-, and methylchloroisothiazolinone (Kathon) Parabens Methyl-, ethyl-, propyl-, butyl-parahydroxybenzoate	Mg <sup>+2</sup> or Ca <sup>+2</sup> ions Dilution to sub-inhibitory levels Amines, sulfites, mercaptans, sodium bisulfite, heparin Lecithin, filtration, dilution to sub-inhibitory levels, polysorbate surfactants, 1 % polysorbate 80 or 20
Hydrogen Peroxide Peroxyacetic Acid	Catalase Sodium Thiosulfate

Como se pode observar na

Tabela 17, o polisorbato 80 (Tween 80®) e a lecitina são os agentes neutralizantes mais usados. Além disso, a norma ISO 20743:2007 propõe a seguinte solução de neutralização:

- Polysorbate 80 30g
- Egg yolk lecithin 3g
- Histidine hydrochloride 1g
- Meat or casein peptone 1g
- Sodium chloride (NaCl) 4,3g
- Monopotassium phosphate 3,6g
- Dissodium phosphate dihydrate 7,2g
- Water 1 000mL (Final volume)

(Fonte: ISO 20743:2007)

Observando a Tabela 17, podemos verificar que a dupla lecitina/polisorbato são os agentes neutralizantes para triclosano, por isso foram usados estes dois reagentes nos testes realizados. No entanto, como o objectivo do trabalho estava mais focado na análise dos métodos de avaliação da actividade antimicrobiana, a exposição e comparação dos diferentes métodos existentes, não houve grande preocupação com o agente neutralizante e por isso não foram realizados os testes ao agente neutralizante. No entanto aparentou-se eficaz, havendo crescimento de colónias nas placas de contagem dos tempos 0h e 1h no caso da amostra tratada com o agente antimicrobiano Ultra-Fresh, que provou ser difusivo nos testes de difusão em agar. Esta conclusão é pouco subjectiva, por isso é sempre necessário a realização dos testes ao meio neutralizante. Caso não seja atingido o poder de neutralização suficiente, a concentração de polisorbato 80/lecitina deverá ser ajustada, ou poderá ser adicionado outro agente neutralizante. É importante conhecer a natureza do agente antimicrobiano para a escolha do melhor agente neutralizante.

No caso da técnica AATCC 100, é necessário o uso de uma solução de extracção para proceder à contagem da população bacteriana depois do tempo de exposição com o material têxtil. Este meio era constituído por meio TSB com lecitina e polisorbato 80 para neutralizar o efeito do agente antimicrobiano que poderá estar presente no meio. Foi escolhido o meio TSB por ser idêntico ao meio TSA, com a diferença na ausência de agar. Isso para não haver uma mudança significativa no entre o meio de extracção e o meio de cultura usado nas contagens.

O número de células viáveis ao tempo zero foi diferente em cada amostra, a actividade antibacteriana é apresentada sob forma de razão de sobrevivência nos vários intervalos de tempo. A razão do número de células viáveis em diferentes amostras têxteis pode diferir no tempo zero devido à capacidade da bactéria de aderir à superfície do têxtil (Kenichi T.; 2002). Isso pode ser visto nos resultados dos testes quantitativos efectuados, onde verificamos que a amostra “UBI Azul” teve sempre valores superiores de CFU em relação às restantes amostras, no tempo 0h. Isso poderá ter acontecido devido a uma menor aderência das bactérias ao têxtil comparado às restantes amostras. É por isso importante o uso dum método de extracção eficaz. Métodos alternativos deverão ser estudados.

Apenas foi necessário o uso de solução de extracção no caso da técnica apresentada na norma AATCC 100. No caso da norma ASTM E 2149, a população foi directamente recolhida para o tubo de diluição. O uso deste método faz com que apenas seja necessário um

Erlenmeyer para cada contagem. Ao fim de 2h, tinham sido feitas 3 contagens, isso diminuiu a solução de 50ml para 47ml. Uma redução no número global de microrganismos, mas não na concentração da solução, por isso não deverá haver grande problema no uso desta alteração na técnica.

As contagens foram efectuadas por contagem em placa em duplicado, foi usado a média entre os dois valores obtidos para os cálculos da redução bacteriana. Os resultados obtidos são bastante satisfatórios, obtendo contagens bastante coerentes entre as duas contagens. No entanto, o erro no método de diluições é significativo, a quantidade de meio de diluição em cada tubo, as pipetagens, e agitações podem acrescentar a cada diluição um erro. Já em 2007 foi referido o uso de citometria de fluxo para a quantificação da redução bacteriana através da contagem das células viáveis. No caso da norma ASTM E 2149, este método de contagem seria uma grande vantagem. Foi pensado o uso deste método neste trabalho, mas devido á falta de tempo não foi possível planear com antecipação o uso desta técnica. O uso de citometria na medição da actividade antimicrobiana terá de ser bem estudada, e a sua vantagem em relação ao método de cultura em placa terá de ser averiguada.

O número de de microrganismos no tempo “0” deverá corresponder ao número de microrganismos pretendidos no inóculo. É feita uma comparação entre o número de microrganismos extraídos no tempo “0” nas amostras, e no frasco sem amostra. Os valores deverão ser o mais próximo possível, no entanto, há sempre a possibilidade de haver microrganismos retidos no tecido. Pela observação no gráfico de número de microrganismos da norma ASTM E 2149 (Figura 18) que o número de microrganismos encontra-se dentro de uma certa margem. Não havendo grande diferença entre o número observado no frasco só com inóculo e os frascos com amostra.

A maior dificuldade na realização destes dois testes quantitativos (AATCC100 e ASTM E 2149) está na contagem das populações de microrganismos. Neste estudo científico, a contagem de microrganismos foi feita por técnicas de cultura em agar. Este método para além de trabalhoso, não consegue dar uma quantificação rigorosa da quantidade de microrganismos numa solução, quando esta possui uma elevada carga microbiana. É preciso ter em conta que cada colónia contém milhares de células filhas de uma única célula original ou de um pequeno grupo agregado: fala-se por isso em unidades formadoras de colónias, que difere do número de microrganismos em solução. Após quatro diluições, um erro em 10 células formadoras de colónias provoca um erro na ordem dos milhões de microrganismos.

Técnicas alternativas de quantificação por citometria de fluxo ou pelo método Tetrazolium/formazan-test poderão facilitar a quantificação dos microrganismos em solução e fornecer dados mais rigorosos acerca da população bacteriana em solução.

O cálculo para a percentagem de redução apresentado pela norma AATCC100 é idêntico ao apresentado pela norma ASTM E 2149 e envolve a seguinte fórmula:

$$1) 100 ((B \text{ ou } C) - A) / (B \text{ ou } C) = R$$

R - % de redução

A - Número de bactérias contadas no frasco com têxtil tratado após o tempo de incubação

B - Número de bactérias contadas no frasco com têxtil tratado logo após incubação (t= 0)

C - Número de bactérias contadas no frasco com têxtil não tratado logo após incubação (t= 0)

No caso de “B” e “C” não serem similares, a norma ASTM E 2149 indica o uso do valor da contagem no frasco contendo a amostra não tratada após o tempo de incubação (“D”). E a norma AATCC100 indica o uso do valor mais elevado. Se estes não forem significativamente diferentes, deverá feita uma média entre os dois valores “D”. A fórmula a usar acaba por ser a mesma:

$$2) 100 (D - A) / D = R$$

Onde:

$$\text{AATCC100: } D = (B + C) / 2$$

ASTM E 2149: D = Número de bactérias contadas no frasco com têxtil tratado após o tempo de incubação.

O parâmetro “R” - percentagem de redução bacteriana fornece dados relativamente a quantidade de microrganismos que o têxtil antimicrobiano destruiu tendo em conta o desempenho da amostra controlo. Os controlos têm como objectivo a avaliação da actividade antimicrobiana numa amostra sem agente activo, para poder fazer uma avaliação da actividade do agente antimicrobiano e não da fibra onde este está incluído. Tanto no factor de crescimento como actividade específica, como o número de microrganismos numa solução está á volta dos milhões, o resultado pode ser expresso em sob a forma de número logarítmico ( $\text{Log}_{10}$ ), por ser mais prática avaliação da extensão da população.

Para a classificação da actividade antimicrobiana é usada a seguinte tabela apresentada pela AATCC:

**Tabela 18 - Classificação da actividade antibacteriana**

<b>Percentagem de redução bacteriana (%)</b>	<b>Grau</b>	<b>Classificação</b>
<b><math>R \geq 99,9</math></b>	1	Excelente
<b><math>99,0 \leq R &lt; 99,9</math></b>	2	Bom
<b><math>0 &lt; R &lt; 99,0</math></b>	3	Razoável

A amostra Ultra-Fresh mostrou uma boa performance, atingindo um valor de redução bacteriana de 100% após 16 horas. A Amostra de “UBI Malha” apresentou um valor de redução bacteriana de 88%, acima do valor obtido pelo têxtil de quitosano. A amostra de quitosano tinha sido analisada em 2007, que também obteve resultados negativos nos testes de difusão em agar.

Pelos resultados apresentados pela norma ASTM E 2149, confirmamos que a amostra tratada com Ultrafresh é eficaz, mas não atinjindo um valor de redução bacteriana suficiente para ser considerado bactericida (99,1%), a amostra UBI azul tratada apresentou um valor de redução bacteriana 58,7%.

**Tabela 19 - Redução bacteriana obtida**

<b>Método</b>	<b>Redução bacteriana</b>		
	<b>AATCC 100</b>	<b>ASTM E 2149</b>	
<b>Tempo</b>	16h	1h	2h
<b>UBI azul*</b>	99,97%	49,7%	58,7%
<b>UBI malha PES/ALG 50/50%</b>	89,90		
<b>Quitosano</b>	84,21%		
<b>Ultrafresh</b>	100,00%	76,9%	99,1%
<b>Bioguard</b>		60,5%	-20,7%

Segundo a norma AATCC100, caso sejam feitas duas análises independentes ao mesmo têxtil, isso é, dois procedimentos completos para a mesma amostra, A diferença entre as contagens não deverá ser superior a 18%, e no caso das contagens feitas em placa de agar

no final do teste a diferença nas contagens feitas á mesma solução não deverá ser superior a 8%. A norma ASTM apenas indica numa nota para que a percentagem de redução não exceda os 5% em dois testes independentes, com um nível de confiança de 95% no intervalo de 75% a 100%.

É altamente aconselhada a leitura do relatório “Establishment of Traceability and Estimation of Uncertainty in Evaluation Methods using Bacteria” da Society of Industrial-Technology for Antimicrobial Articles (SIAA) publicado em Março de 2004. Este relatório faz um estudo estatístico extensivo de comparação de resultados da avaliação dum têxtil analisado por diferentes laboratórios pelo método JIS Z 2801:2000 "Antibacterial products-Test for Antibacterial activity and efficacy". Neste relatório é extensivamente descrito o processo estatístico de validação de resultados.

No teste AATCC100, foi observado um aumento na população bacteriana no caso das amostras não tratadas. Este é um requisito para a validação do teste segundo a norma. No caso da norma ASTM E 2149 houve pelo contrário uma redução geral da população bacteriana no final da primeira hora, apenas ao fim de duas horas é que é possível fazer uma diferenciação entre a redução bacteriana das amostras tratadas e controlos.

## Conclusões e Perspectivas futuras

---

## 5. Conclusões

Com a realização deste trabalho científico concluímos que no teste qualitativo NP EN ISO 20645:2005 dá-nos uma ideia geral do comportamento antimicrobiano do têxtil. Tornam-se de fácil percepção para amostras tratadas com antimicrobianos que se difundem no agar. No caso de amostras cujo antimicrobiano não se difunda, tem de se ter particular atenção ao crescimento antimicrobiano sob a amostra, pelo que consideramos nestes casos este teste inconclusivo. Consideramos altamente recomendável o uso do microcópico estereocópico para a interpretação destes ensaios.

O teste AATCC 100 revelou-se ineficaz para amostras hidrofóbicas como já estávamos a espera. A meu ver, o teste ASTM E 2149 é mais abrangente quer para têxteis hidrofílicos e hidrofóbicos.

No caso de têxteis hidrofílicos, neste momento aconselho a realização dos dois testes em simultâneo para a mesma amostra.

## 6. Perspectivas futuras

Para posterior estudo aconselhamos o uso duma técnica quantitativa mais elaborada para o ensaio de têxteis hidrofóbicos.

Deverá também ser realizada uma comparação mais extensiva e mais elaborada entre as duas técnicas quantitativas (ASTM E 2149 e AATCC100), para os ensaios de amostras têxteis hidrofílicas.

Suhiro algumas modificações para os ensaios quantitativos, nomeadamente a análise da curva de crescimento do microrganismo em contacto com o têxtil antimicrobiano, o uso de ultrasons para a extração dos microrganismos, e o uso da técnica de citometria de fluxo para a avaliação da redução bacteriana.

Também poderá ser aprofundado o estudo das técnicas de extração, e das técnicas de avaliação da eficácia do agente neutralizante.

## Bibliografia

---

## 7. Bibliografia

AATCC Test Method 100-2004. (2005). Antibacterial finishes on textile materials: Assessment of. *AATCC Technical Manual*, American Association of Textile Chemists and Colorists, Research Triangle Park, NC

AATCC Test Method 147-2004. (2005). Anti-bacterial activity assessment of textile materials: Parallel streak method. *AATCC Technical AATCC147 - Antibacterial Activity Assessment of Textile Materials: Parallel Streak Method*, Jan 1, 2004

Akira A.; (1995); The history of antimicrobial and antiodor finished fabrics and the textile materials. In: Sakagami Suehara, editor. *Functional fibers and finishes for humans*. Osaka: Senisha Inc., Japan;. p. 21e27

American Association of Textile Chemists and Colorists, (2000) (Vol. 75). *AATCC Technical Manual*, NC: Research Triangle Park.

American Society for Testing and Materials, (2001) (Vol. 11.05). *Annual Book of ASTM Standards*, PA: West Conshohocken.

Amistov I; *O Universo da Ciência*, Editora Presença, Vol 3, Cap 14, p213-215; 1987

ASTM; (2001); ASTM E 2149-01 - Standard Test Method for Determining the Antimicrobial Activity of Immobilized Antimicrobial Agents Under Dynamic Contact Conditions, West Conshohocken, USA

ASTM; (2001); ASTM E 2180-01 - Standard Test Method for Determining the Activity of Incorporated Antimicrobial Agent(s) In Polymeric or Hydrophobic Materials, West Conshohocken, USA

ASTM; (2001); E 1054 – 02 - Standard Test Methods for Evaluation of Inactivators of Antimicrobial Agents; West Conshohocken, USA

Atlas, R.M.; *Principles of Microbiology*; 1997

Baillie G.S.; Douglas L.J. (1998) Effect of Growth Rate on Resistance of *Candida albicans* Biofilms to Antifungal Agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 42 (8): 1900-1905.

Betsy T., Keogh J.; 2005; Microbiology demystified: a self-teaching guide. New York: McGraw-Hill;

Bohringer A., Rupp J., Yonenaga A.; 2000; Textiles antimicrobianos, International Textile Bulletin, vol. 5

Bohringer, A; 1998; "La Función Determina el Aspecto"; ITB Internacional Textile Bulletin; N.04;

Casciani R. V.; 2003; Antimicrobials finishes 101: A primer for fabric developers, AATCC Review 3,11:31-34

Cervantes, C., and Gutierrez-Corona, F. (1994) Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. FEMS Microbiol. Rev. 14, 121–137

Chandra J., Kuhn D.M, Mukherjee P.K., Hoyer L.L., McCormick T. and Ghannoum M.A. (2001) Biofilm formation by the fungal pathogen candida albicans: development, architecture and drug resistance. Journal of Bacteriology. 183 (18): 5385-5394.

Clark, J. M. & Switzer, R. L. Experimental Biochemistry. 2 edit, Freeman and Co, San Francisco. 1977, 335 p

Descarpack; "Manual de Orientação Sobre Técnicas Básicas de Esterilização"; 2003.

Dislich H., "Sol-gel: Science, processes and products", Journal of Non-Crystalline Solids, North-Holland, Amsterdam, ed.80, 1986, 115-121.

Ducel G.; Fabry J.; Nicolie L.; "Prevenção de Infecções Adquiridas no Hospital, PNCI"; Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, 2a edição; 2002.

Dunn E.T., Grandmaison E.W., (1992); Applications and Properties of Chitosan. Goosen M.F.A, J. Bioact. Compat. Polym. 7 370-397.

Dziworska, G.; Wilk, E., (2005), Antimicrobial properties of silver content textiles; 5<sup>th</sup> world textile conference; Autex; 27-29 june, Portoroz, Slovenia

Ellepola A.N.B., Samaranayake L.P. (1998) Adhesion of oral Candida albicans isolates to denture acrylic following limited exposure to antifungal agents. Archives of Oral Biology. 43 999-1007.

Engo, F. V. H; "Nanotecnologia Na Industria Têxtil: Onde Estamos E Para Onde Vamos"; Nanotec; São Paulo; 2005.

EN ISO 20645:2004. (2004). Determination of antibacterial activity-agar diffusion plate test. Technical Committee CEN/TC 248.

Fang S.W., C.F. Li, D.Y.C; (1994) Antifungal activity of chitosan and its preservative effect on low-sugar candied kumquat; Shih, J. Food Protect. 56 136-140.

Fluhr, J W.; Kowatzki, D.; Bauer, A.; Elsner, P.; Hipler, C.; (2005), Silver-loaded cellulose fibers with anti-bacterial and anti-fungal activity in vitro and in vivo on patients with atopic dermatitis; 5<sup>th</sup> world textile conference, Autex; 27-29 June, Portoroz, Slovenia

Frobisher and Fuerst's Microbiology in health and disease, Saunders; 14th ed., rev edition (1978) pag 321-334

Frobisher, M. Cultyvo y crecimiento de las bacterias. In: - Microbiologia. 5.ed.

Gacén J., Gacén I, (2003), Fibras de alta tecnologia; Universidade Politécnica de Catalunha – Spain, Revista Química Têxtil, nº71

Gacén J.; Fibras bioactivas, antibacteria, antimoho, antiacaros; Revista de la Indústria Têxtil, nº376

Gacén J.; Fibras higiénicas. (2001); Fibras Saludables; Boletim Intextex, nº120

GADI BORKOW, JEFFREY GABBAY; Putting copper into action: copper-impregnated products with potent biocidal activities; Cupron Inc., New York, New York, USA; The FASEB Journal Express Article doi:10.1096.04-2029

Gerhardt, P. E. Methods for General and Molecular Bacteriology, American Society for Microbiology, Washington. 1994, 791 p

Gomes, H.; "A prevenção da Infecção Hospitalar a partir do Ambiente Físico"; pago 40-42; TecnoHospital; 2004

Grabowska B., Krolikoska H., Gandzinowski M., (2004), Fibres and textiles in Eastern Europe, 12:62-64,

Gupta D., Khare S. K., Laha A., (2004); Antimicrobial properties of natural dyes against gram negative bacteria, *Coloration Technology*, 120:167-171,

Hadwiger L.A., Kendra D.F., Fristensky B.W., Wagoner W., (1986); Chitosan both activates genes in plants and inhibits RNA synthesis in fungi, in: *Chitin in nature and technology*, Muzzarelli, R., Jeuniaux, C., and Gooday, G. W. (Eds.) Plenum Press, New York, pp. 209-214.

Hardingham, M.; Mathews, A; "Medical and Hygiene Textile Production - A Andbook"; Intermediate Technology Publications; 1994.

Hauser, P., (2006); "Advances and Trends in Textile Wet Processing Chemicals." *JTATM, Volume 5, Issue 1, Winter*

Hewitt, W and Vincent, S (1989): *Theory and Practice of Microbiological Assay*, Academic Press.

Hirai, Y. (1991). Survival of bacteria under dry conditions; from a viewpoint of nosocomial infection. *J. Hosp. Infect.* 19: 191-200

Hiroko K. (1990); Antimicrobial and antiodor finish. In: Sakagami Suehara, editor. Osaka: Senisha Inc., Japan; p. 48e54.

Horton, D., and D. R. Lineback. (1965); N-deacylation. Chitosan from chitin, p. 403-406. In R. L. Whistler (ed.), *Methods in carbohydrate chemistry*, vol. 5, General polysaccharides. Academic Press Inc., New York.

Huang W., Leonas k. K., (2000); Evaluating a One-Bath Process for Imparting Antimicrobial Activity and Repellency to Nonwoven Surgical Gown Fabrics, *Textile Research Journal*, Vol. 70, No. 9, 774-782

Hudson S.M., Smith C., (1998); Polysaccharide: chitin and chitosan: Chemistry and technology of their use as structural materials, in: *Biopolymers from renewable resources*, Kaplan, D. L. (Eds.) Springer-Verlag, New York, pp. 96-118.

Hwang J.K., Kim H.J., Yoon S.J., Pyun Y.R., (2000); Bactericidal activity of chitosan on E.coli, in: *Advances in chitin science*, Chen, R. H., and Chen, H. C. (Eds.) Rita Advertising Co. Ltd., Taiwan, pp. 340-344.

ISO 20645 (2005), International standard, Textile Fabrics – Determination of antibacterial activity: Agar diffusion test.

Jacob HE, (1970); Redox Potential, Methods in Microbiology vol. 2/IV. Accademic Press, London New York

Karlstrom, A. R., and Levine, R. L. (1991) Copper inhibits the protease from human immunodeficiency virus 1 by both cysteine-dependent and cysteine-independent mechanisms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 5552–5556

Kayser, Medical Microbiology © 9th edition (2005) Thieme, Stuttgart - Germany

Kim, J. H., Cho, H., Ryu, S. E., and Choi, M. U. (2000) Effects of metal ions on the activity of protein tyrosine phosphatase VHR: highly potent and reversible oxidative inactivation by Cu<sup>2+</sup> ion. Arch. Biochem. Biophys. 382, 72–80

Kiraly, Z., Klement, A., Solimosy, F. & Voros, J. Methods in Plant Pathology. 509 vols, Akademiai Kiadó, Budapest. 1970

Klement, Z., Rudolph, K. & Sands, (1990); Isolation of bacteria; D. C. Methods in Phytobacteriology, Akadémiai Kiadó, Budapest, 568 p

Kotowa S. J. (2004); Biodeterioration of textiles, International Biodeterioration & Biodegradation, 53:165-170

Lee, H. J.; Yeo, S.; Jeong, S. H.; "Antibacterial Effect of Nanosized Silver Colloidal Solution on Textile Fibrics"; Journal of Materials Science (38) 2003; pag.2199-2204.

Lindemann, B.; "Antimicrobiens"; L'Industrie Textile N.o 1340 ; Avril 2002.

Mao J. (2004); Durable antimicrobial finish for cotton with new technology, AATCC Review 2, 12:15-17

Mao J., Murphy L. (2004), Durable freshness for textiles, AATCC Review 1, 11:28-30

Meryl®; (2006);Skinlife brochure, Nylstar.

Michielsen S. (2004); Approaches to Controlling Micro-organisms in Hospital Textiles 4th International Conference on Safety and Protective Fabrics, IFAI event, 132-150

Michielsen S. (2004); Surface modification of fibres via graft-site amplifying polymers, Georgia Institute of Technology, INJ Fall, 41-45,

Miquel F., Pizarro M. (2003); Tecidos bacteriostáticos, Revista de la Industria Têxtil, 406:66-70

Oktem T. (2003); Surface treatment of cotton fabrics with chitosan, Coloration Technology, 119:241-246

Organisation de Coopération et de Développement Economiques (OCDE), Analysis and assessment of current protocols PROTOCOLS to develop harmonized test methods and relevant performance standards for the efficacy testing of treated articles / treated materials, ENV/JM/MONO(2007)4

O'Sullivan J.M., Jenkinson H.F. and Cannon R.D., (2000); Adhesion of *Candida albicans* to oral streptococci is promoted by selective adsorption of salivary proteins to the streptococcal. Microbiology, 146 41-48.

Pankey G. A. and Sabath L. D.; (2004); Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections; 864-870 ;CID 2004:38 (15 March)

Peterson LR, Shanholtzer CJ. (1992); Tests for bactericidal effects of antibacterial agents: technical performance and clinical relevance. Clin Microbiol Rev 5:420-32.

Pintado M., Malcata X., Morgado J., Viera A.; (2004); Biotecnologia: um desafio de sucesso na indústria têxtil; Revista Perfil.

*Postgate J. ; Nitrogen fixation, 3rd ed.. Cambridge University Press.*

Purwar R., (2004); Joshi M. Recent developments in antimicrobial finishing of textiles – A review; AATCC Review 4, 3:22-26

Ramachandran T., Rajendrakumar K., Rajendran R. (2004); Antimicrobial textiles – Overview, IE(I)Journal-TX, 84:42-47

Ramos, G.; Gonçalves, S.; Almeida, L.; "Vestuário de Protecção para o Bloco Operatório",

Renaud, F. N. R., Dore, J. and Freney, H. J. (2006). Evaluation of antibacterial properties of a textile product with antimicrobial finish in a hospital environment. *Journal of Industrial Textiles*, 36(1): 89-94.

Richard, G.; Triplet, B.; "A New Durable Antimicrobial Finish for Textiles"; AEGIS Environments of Midland; 2005.

Ryan KJ; Ray CG (editors) (2004). *Sherris Medical Microbiology, 4th ed., McGraw Hill. ISBN 0838585299.*

Salmon S. and Hudson S.M., (1997); Crystal morphology, biosynthesis, and physical assembly of cellulose, chitin, and chitosan, *J. Macromol. Sci. R. M. C.*, C37(2), 199-276

Schindler W. D., Hauser P. J. (2005) *Chemical Finishing of Textiles*, The Textile Institute, Woodhead Publishing Ltd, CRC, cap 15, p165-174

Seong HS, Kim JP, Ko SW. (1999); Preparing chito-oligosaccharides as antimicrobial agents for cotton. *Text Res* 69(7):483e8.

Singh R., Jain A., Panwar S., Gupta D., Khare S. K. , (2005); Antimicrobial activity of some natural dyes, *Dyes and Pigments* 66(2):99-102

Slots, J., Taubman, M.A. (1992); *Contemporary oral microbiology and immunology*. Missouri, Mosby-Year Book Inc., 1992.

Stohs, S. J., and Bagchi, D. (1995) Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* 18, 321-336

Sudardshan N.R., Hoover D.G., Knorr D. (1992), Antibacterial action of chitosan; *Food Biotechnol.* 6 257-272.

Sun G. (2000); Durable and regenerable Antimicrobial Textiles, *ACS Symposium Series* 792, 243 -252

Sun G; Kim Y. H. , (2001) Durable antimicrobial finishing of Nylon fabrics with acid dyes and quaternary ammonium salt, *Textile Research Journal*, 71(4):318-323

Sun, G.; "Durable and Regenerable Antibacterial Finishing of fabrics"; *Textile Chemistry and Colorist*; Vo1.30; n. o 6; University of California, Davis.A; June 1998.

Sun, G.; Suu, Y; "Durable and Regenerable Antimicrobial Textiles Materials Prepared by Continuous Grafting Process"; British Library - The world's Knowledge; March 2002.

Sun, G; Kim Y. H. (2000); Dye molecules as bridges for functional modifications of Nylon: Antimicrobial functions, *Textile Research Journal*, 70(8):728-733

Sutton, S. V. W., "Neutralizer Evaluations as Control Experiments for Antimicrobial Effectiveness Tests," Ch. 3 in *Handbook of Disinfectants and Antiseptics*, Marcel-Dekker, NY, 1996, p. 300.

Takai K., Ohtsuka T., Senda Y., Nakao M., Yamamoto K., Matsuoka J., and Hirai Y., (2002); Antibacterial Properties of Antimicrobial-Finished Textile Products; *Microbiol. Immunol.*, 46(2), 75-81

Takai, K.; Ohtsuka, T.; Sanda, Y; Nakuo, M.; Yamamoto, K; Matsuoka, J.; Hirai, Y;"Antimicrobial Properties of Antimicrobial Finished Textile Products"; British Library - The world's Knowledge, *Microbiol Immunol*; 46 (2) page 75-81; 2002.

Tsai G.J., Su W.H., (1999); Antibacterial Activity of Shrimp Chitosan Against *Escherichia coli*; *J. Food Protect.* 62 239-243.

Ueda, K., Morita, J., Yamashita, K., and Komano, T. (1980) Inactivation of bacteriophage phi X174 by mitomycin C in the presence of sodium hydrosulfite and cupric ions. *Chem. Biol. Interact.* 29, 145–158

Uragami T., Kurita K., Fukamizo T., (2001); Chitin and chitosan-Chitin and chitosan in life science, Kodansha Scientific Ltd., Tokyo, Japan,

Vigo T. L., Danna G. F. Goyones W. R., (1999); Affinity and durability of magnesium peroxide-based antibacterial agents to cellulosic substrates, *Textile Chemist and Colorist*, 31(1):29-33

Vigo T. L., Danna G. F., (1997); Reaction products of magnesium acetate and hydrogen peroxide for imparting antibacterial activity to fibrous substrates, Patent US5656037

Vigo T. L., Parikh D. V., Danna G. F., (2001) Improved durability of peroxide-based antibacterial agents on fabrics, *ATTCC Review* 1, 11:40-44

Wang, G-H; (1992); Inhibition and Inactivation of Five Species of Foodborne Pathogens by Chitosan, J. Food Prot 55(11), 916-919

Werner, H. P.; Roborn, J. S.; Petri, E; "Influence of Drape Permeability on Wound Contamination During Mastectomy"; Eur J Surg 157; 1991; pgs 379383.

Wyte, W.; "The Role of Clothing and Drapes in the Operating Room"; Journal of Hospital Infection; 1988.

Yalpani M, Johnson F, Robinson LE. (1995); Advances in chitin and chitosan. New York: Elsevier Applied Science; p 543.

Yang Y, Corcoran L, Vorlicek K, Li S. (2000); Durability of some antibacterial treatments to repeated laundering. Text Chem Color Am Dyestuff 32(4):48e54.

Koch M.; (2006); Flock news - Free newsletter of the Association of Flock Industry Europe (reg.), Issue # 7/2006