

Desenvolvimento de um novo tratamento  
anti-bacteriano para bio-funcionalização de  
materiais à base de lã

---

Dissertação de Mestrado em Bioquímica

Daniela Pereira de Sá

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

---

Universidade da Beira Interior

Agosto 2009

Aos meus pais,

## Agradecimentos

A execução deste trabalho só foi possível devido ao empenho, colaboração e disponibilidade de algumas pessoas.

Em primeiro lugar, quero agradecer à Ex. ma Prof. Doutora Isabel Cristina Aguiar de Sousa e Silva Gouveia, orientadora deste trabalho, pelas pertinentes sugestões, incentivo e total disponibilidade. Assim como pela sua amizade e companheirismo prestados durante a realização de todo o trabalho.

A todo o departamento de Ciência e Tecnologia Têxteis, pela cedência de instalações e equipamento, e em especial ao técnico dos laboratórios, Sr. António Machado.

Ao departamento de Engenharia do Papel por disponibilizar alguns meios técnicos indispensáveis à elaboração deste trabalho.

Ao departamento de Química por ter aceite o desafio e acreditado no projecto. Agradeço terem aceite a natureza multidisciplinar deste projecto provando que o departamento e a química estão em constante evolução assimilando conhecimento.

À Prof. Ana Palmeira de Oliveira, pela sua disponibilidade e todo o interesse demonstrado para com este trabalho.

À Ex. ma Prof. Doutora Mariana Henriques, pela sua total disponibilidade e grande ajuda na execução dos testes anti-bacterianos.

Ao meu namorado, Helder Filipe Martins da Silva, pela paciência, apoio, e ajuda indispensável nos momentos mais complicados.

À minha amiga, Liliana Isabel de Oliveira Vieira, pelo apoio, ajuda, e precioso auxílio em determinadas etapas.

Ao meu amigo, Luís Abrantes Caramelo, pela sua disponibilidade e auxílio indispensável

## Resumo

Nos últimos anos, a investigação na área têxtil tem-se focado no desenvolvimento de materiais têxteis multifuncionais para as mais diversas aplicações. Incluem-se, nesses novos produtos, os materiais têxteis anti-microbianos, devido à sua grande aplicabilidade no sector biomédico.

O objectivo da produção destes materiais é a obtenção de produtos com um efeito anti-microbiano duradouro, seguro e com um largo espectro de acção, sem no entanto, danificar as propriedades físicas do têxtil. Todavia, e devido à capacidade de retenção de humidade, os mesmos, podem-se tornar nocivos para o usuário.

A questão fundamental no desenvolvimento de produtos têxteis anti-microbianos reside na sua compatibilidade. A presença natural na pele, cabelo e unhas humanas, de determinados compostos, não garantem, *per si*, que a compatibilidade e toxicidade não sejam postas em causa, quando os mesmos, são aplicados em artigos para posterior contacto com o corpo humano, mas concorrem para uma forte probabilidade de isso acontecer.

Neste trabalho testou-se a funcionalização de um têxtil com um aminoácido, L-cisteína para obtenção de um efeito bioactivo anti-microbiano, com potencial aplicação em materiais têxteis biomédicos, geriátricos e pediátricos.

Numa primeira abordagem, testou-se a capacidade de ligação da L-cisteína às fibras de lã, com posterior análise da possível acção anti-microbiana. Procedeu-se paralelamente à detecção da concentração mínima inibitória (MIC) do composto em causa, para subsequente comparação com a percentagem inibitória presente na fibra, e com outros biocidas já conhecidos.

O processo consiste na aplicação do aminoácido às fibras de lã, por processos de esgotamento, com efeito anti-bacteriano comprovado sobre *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*. A inibição do crescimento das estirpes mencionadas foi verificada de acordo com a Norma JIS 1902-2002. A avaliação da percentagem de composto absorvido e fixado nas fibras, foi determinada, qualitativa e quantitativamente, usando o reagente de Ellman ou 5,5'- ditiobis (2-ácido nitrobenzoico) (DTNB).

Na segunda fase, procedeu-se à optimização do processo, avaliando condições novas e condições previamente validadas nos ensaios prévios. A optimização foi feita com recurso a um desenho experimental do tipo *Central Composite Design*, onde foram admitidos 4 factores (variáveis independentes), com cinco níveis de variação, num total de 30 pontos experimentais, com replicação. Como respostas (variáveis dependentes)

seleccionaram-se a percentagem de esgotamento e a reflectância analisada através da relação K/S. nesta fase, a acção anti-bacteriana foi avaliada somente no ponto óptimo.

Recorreu-se, ainda, a testes como, solidez à lavagem e testes físicos, para avaliação da capacidade de fixação permanente do composto sobre a fibra e qualidade da mesma após funcionalização, respectivamente.

Os resultados revelaram que o novo processo confere bioactividade ao material tratado, traduzida através de efeito anti-bacteriano em bactérias Gram positivas e Gram negativas, avaliado pela norma JIS L 1902-2002, com efeito permanente comprovado através dos ensaios de solidez realizados, e sem toxicidade para a pele, avaliada pela norma EN ISO 10993-5. De realçar, também, que dada a inovação do tema e os resultados alcançados, parte deste trabalho resultou no registo de uma patente nacional, que tencionamos internacionalizar.

## Abstract

In recent years, research in the textile area has focused on the development of multifunctional textile materials for many different applications. Included are new products in the anti-microbial textile materials because of its great applicability in the biomedical sector.

The purpose of producing these materials is to obtain products with an anti-microbial durable, safe and with a broad spectrum of action, without however, damaging the physical properties of textiles. However, due to moisture retention capacity, they may become harmful to the user.

The key issue in the development of anti-microbial textile products is their compatibility. The natural presence of certain compounds in the skin, human hair and nails, does not guarantee, that the compatibility and toxicity are not called into question when they are applied to items that further contact with the human body, but takes part for a strong likelihood of that happening.

In this study it was tested the functionalization of a textile with an amino acid – L-cystein, to obtain a bioactive anti-microbial effect, with potential application in biomedical textile materials, and in geriatric and pediatric products.

In a first approach, it was tested the ability of linking the amino acid to the wool fibers, with subsequent analysis of the possible of anti-microbial action. For subsequent comparison with the inhibitory rate in the fiber, and other known biocides, the minimum inhibitory concentration (MIC) of the compound in question was tested in parallel.

The process is simple and it is based in the application of the amino acid to the fibers of wool, by exhaustion procedures, with proven bacteriostatic effect on *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*. The inhibition of growth of the mentioned strains was verified according to standard JIS 1902-2002. The assessment of the percentage of the absorbed and fixed compound in fiber, was determined, qualitatively and quantitatively, using Ellman's reagent or 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB).

On a second stage, the process optimization, to evaluate new terms and conditions previously validated in the previous trials, was performed using a Central Composite Design where 4 factors (independent variables) were admitted with five levels of variation, in a total of 30 experimental points, with replication. The exhaustion rate and reflectance analyzed by the ratio K/S (color strength) were chosen as the responses (dependent variables). The Anova and optimization was possible by using the Design Expert software from Statease Inc. At this stage, the bacteriostatic action was assessed only at optimal point.

To assess the capability of permanent attachment of the compound and the quality of the fiber after functionalization, control tests such as fastness to washing and resistance to abrasion were carried out.

The results revealed that the new process gives the material a good bioactivity, translated by anti-bacterial effect on Gram positive and Gram-negative bacteria, assessed by the JIS L 1902-2002 standard, with permanent effects shown by the robustness tests performed, and without toxicity to the skin as measured by the EN ISO 10993-5 standard. Important to point out is that given the innovation and achievements of this work the registration of a national patent was possible, and, therefore we also intend to internationalize it via a PCT Patent process.

## Palavras—chave

Têxteis médicos

Queratina

Fibras têxteis anti-microbianas

L-cisteína

Agentes anti-microbianos

Têxteis anti-microbianos

Concentração mínima inibitória (MIC)

Infecções microbianas

Infecções bacterianas

## Keywords

Medical textiles

Keratin

Antimicrobial agents

Antimicrobial textile fibers

L-cysteine

Antimicrobial textiles

Minimum inhibitory concentration (MIC)

Microbial infections

Bacterial infections

# Índice geral

AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	vi
PALAVRAS - CHAVE	viii
INDICE GERAL	ix
INDICE DE FIGURAS	xiii
INDICE DE TABELAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS	xvi
CAPITULO I – INTRODUÇÃO	1
1.1 – Têxteis anti-microbianos	2
1.2 – Importância do acabamento anti-microbiano no material textil	3
1.3 – Objectivo	4
CAPITULO II – REVISÃO BIBLIOGRAFICA	6
2.1 – Acabamentos anti-microbianos	7
2.2 – Compostos com propriedades anti-microbianas	8
2.2.1 – Dióxido de titânio	8
2.2.2 – Compostos de amónio quaternários	9
2.2.3 – Corantes	10
2.2.4 – N-Halamina e derivados	11
2.2.5 – Sais Metálicos	11
2.2.6 – Quitosano	12
2.2.7 – Compostos Fenólicos	13
2.2.8 – Compostos de Poli (hexametilenobiguanidina) (PHMB)	14
2.3 – Métodos de incorporação de compostos anti-microbianos em materiais têxteis	15
2.4 – Mecanismos de acção dos agentes anti-microbianos	16
2.4.1 – Caracterização das bactérias	17
2.4.2 – Caracterização das estirpes patogénicas mais importantes	19
2.4.3 – Tipos de interacções entre agentes anti-microbianos e células patogénicas	20
2.4.3.1 – Interacções com os componentes celulares da camada externa e parede celular	21

2.4.3.2 –	Interacção ao nível da membrana citoplasmática	22
2.4.3.3 –	Interacção com os componentes citoplasmáticos	25
2.5 –	Avaliação da actividade anti-microbiana em materiais têxteis	26
2.5.1 –	Teste de difusão em agar	27
2.5.2 –	Teste em suspensão	27
2.6 –	Fibra de lã	29
2.6.1 –	Morfologia e composição química	29
2.6.2 –	Ionização dos péptidos constituintes da fibra de lã	31
2.6.3 –	Ponto Isoeléctrico da lã	33
2.7 –	Aplicação de compostos anti-microbianos em substratos têxteis de origem proteica-lã	34
2.8 –	Nova abordagem para funcionalização anti-microbiana de materiais têxteis à base de lã	34
2.8.1 –	Interacção de compostos ricos em L-cisteína com potenciais agentes anti-microbianos para a lã	36
2.8.2 –	Caracterização do ácido L-cisteína	38
2.8.2.1 –	Ionização de aminoácidos livres	39
CAPITULO III – FUNCIONALIZAÇÃO ANTI-BACTERIANA DA LÃ COM L-CISTEÍNA		41
3.1 –	Estrutura e metodologia do trabalho experimental	42
3.2 –	Materiais e métodos	43
3.2.1 –	Caracterização do material	43
3.2.2. –	Produtos auxiliares químicos	44
3.2.3 –	Equipamento	45
3.3. –	Ensaio prévios	45
3.3.1 –	Determinação da concentração mínima inibitória para a L-cisteína	45
3.4 –	Ensaio de funcionalização	47
3.4.1 –	Aplicação da L-cisteína as fibras de lã	47
3.5 –	Ensaio de controlo	49
3.5.1 –	Determinação dos grupos tiol livres: ensaio do reagente de Ellman	49
3.5.2 –	Ensaio de controlo de qualidade das fibras de lã	50
3.5.2.1 –	Ensaio de resistência à rotura	50

3.5.2.2 – Avaliação da qualidade de tingimento com corantes ácidos	51
3.5.3 – Leituras espectrofotométricas	51
3.5.3.1 – Leituras espectrofotométricas das amostras submetidas ao ensaio do reagente de Ellman	51
3.5.3.2 – Leituras espectrofotométricas das amostras tingidas com o corante ácido	52
3.5.4 - Testes anti-bacterianos	53
3.5.4.1 – Teste qualitativo: método do halo	54
3.5.4.2 – Teste quantitativo	55
3.6 – Resultados e discussão	56
3.6.1 – Concentração mínima inibitória da L-cisteína	56
3.6.2 – Funcionalização da lã e absorção da L-cisteína: resultados das leituras espectrofotométricas das amostras tratadas	58
3.6.3 – Resultados dos testes de controlo de qualidade	62
3.6.4 – Resultados dos testes anti-bacterianos	63
3.7 – Conclusão	65
CAPITULO IV – OPTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE FUNCIONALIZAÇÃO ANTI-BACTERIANA DA LÃ, COM L-CISTEÍNA	67
4.1 – Estrutura e metodologia do trabalho experimental	68
4.2 – Materiais e métodos	69
4.2.1 – Caracterização do material	69
4.2.2. – Produtos auxiliares químicos	69
4.2.3 – Equipamento	69
4.3 – Caracterização do processo anti-bacteriano	70
4.3.1 – Delineamento do desenho experimental e optimização do processo	70
4.3.2 – Determinação qualitativa dos grupos tiol livres no substrato têxtil	72
4.3.3 – Determinação quantitativa dos grupos tiol livres na solução	72
4.3.3.1 – Curvas de calibração	73
4.3.4 – Ensaio de controlo de qualidade: ensaio de resistência à abrasão	75

4.3.5 – Ensaio da solidez à lavagem	75
4.3.6 – Testes anti-bacterianos	76
4.3.7 – Testes cito-tóxicos	76
4.4 – Resultados e discussão	77
4.4.1 – Curvas de calibração	77
4.4.2 – Optimização do processo	80
4.4.3 – Ensaio de cito-toxicidade	101
4.4.4.- Resultados obtidos no ensaio de controlo de qualidade: ensaio de resistência à abrasão	102
4.5 – Conclusão	102
CAPITULO V – DISCUSSÃO GERAL, CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	
FUTURAS	104
5.1 – Discussão geral	105
5.2 – Conclusão	108
5.3 – Perspectivas futuras	108
BIBLIOGRAFIA	110

## Índice de figuras

Figura 2.1: Estrutura da parede celular externa das bactérias Gram-positivas (adaptado Maillard, 2002) .....	18
Figura 2.2: Estrutura da parede celular externa das bactérias Gram-negativas (adaptado Maillard, 2002) .....	19
Figura 3.1: Preparação das diluições .....	46
Figura 3.2: Reacção com reagente de Ellman (adaptado de Protocolo Ellman's reagent) .....	49
Figura 3.3: Resultado obtido do ensaio quantitativo, relativo à actividade bactericida sobre <i>Klebsiella pneumonia</i> (Gram negativa) .....	63
Figura 4.1: Curva de calibração obtida com a solução tampão a pH 2.8 .....	78
Figura 4.2: Curva de calibração obtida com a solução tampão a pH 3.8 .....	78
Figura 4.3: Curva de calibração obtida com a solução tampão a pH 4.8 .....	79
Figura 4.4: Curva de calibração obtida com a solução tampão a pH 5.8 .....	79
Figura 4.5: Curva de calibração obtida com a solução tampão a pH 6.8 .....	80
Figura 4.6: Distribuição dos resíduos .....	85
Figura 4.7: Influência do pH e temperatura na resposta K/S .....	87
Figura 4.8: Influência do pH e concentração na resposta K/S .....	88
Figura 4.9: Influência da concentração e temperatura na resposta K/S .....	89
Figura 4.10: Distribuição dos resíduos .....	92
Figura 4.11: Influência do pH e temperatura na resposta %E .....	94
Figura 4.12: Influência do pH e tempo na resposta %E .....	95
Figura 4.13: Influência do tempo e temperatura na resposta %E .....	96
Figura 4.14: Região óptima para a previsão número um, resultante da sobreposição das respostas %E e K/S, em função do pH e temperatura, mantendo fixa a concentração e o tempo .....	99
Figura 4.15: Região óptima para a previsão número dois, resultante da sobreposição das respostas %E e K/S, em função do pH e temperatura, mantendo fixa a concentração e o tempo .....	100

## Índice de tabelas

Tabela 1.1: Compostos anti-microbianos disponíveis comercialmente (Broughton <i>et al</i> , 2000; Ramachandran <i>et al</i> , 2004) .....	3
Tabela 2.1: Aminoácidos constituintes da lã (adaptado de Lewis, 1992) .....	29
Tabela 2.2: Tabela de ionização/ pH da lã. (Cegarra e Valdperas, 1981) .....	33
Tabela 2.3: Valores de pK dos diferentes grupos protonotrópicos da L-cisteína a 23 °C (adaptado de Silva, 1962).....	39
Tabela 3.1: Caracterização das amostras têxteis.....	43
Tabela 3.2: Caracterização dos reagentes e auxiliares químicos.....	44
Tabela 3.3: Caracterização dos equipamentos.....	45
Tabela 3.4-A: Tabela de diluições .....	47
Tabela 3.4-B: Tabela de diluições .....	47
Tabela 3.5: Resultados obtidos na segunda série de ensaios, para a detecção concentração mínima inibitória da L-cisteína.....	58
Tabela 3.6: Resultados espectrofotométricos dos ensaios a diferentes temperaturas.....	59
Tabela 3.7: Resultados espectrofotométricos dos ensaios a diferentes pH .....	60
Tabela 3.8: Resultados espectrofotométricos dos ensaios a diferentes percentagens de L-cisteína.....	61
Tabela 3.9: Resultados espectrofotométricos dos ensaios a diferentes percentagens de L-cisteína.....	61
Tabela 3.10: Resultados obtidos, relativamente aos testes de controlo de qualidade: resistência à rotura e solidez dos tintos.....	62
Tabela 3.11: Resultados obtidos da análise qualitativa relativa à inibição microbiana da bactéria Gram positiva, <i>Staphylococcus aureus</i> .....	64
Tabela 4.1: Caracterização dos equipamentos .....	69
Tabela 4.2: Níveis dos Factores (variáveis independentes) utilizados de acordo com o Desenho Experimental CCD.....	70
Tabela 4.3: Matriz dos ensaios para o Desenho Experimental CCD com as variáveis nas unidades reais .....	71
Tabela 4.4: Diferentes soluções padrão e respectivas concentrações finais (adaptada de Protocolo Ellman's Reagent).....	74
Tabela 4.5: Matriz do desenho experimental e respectivas respostas.....	81

Tabela 4.6: Quadro ANOVA para a resposta K/S.....	83
Tabela 4.7: Quadro ANOVA para a resposta %E.....	90
Tabela 4.8: Previsão de resultados para as respostas %E e K/S aplicando as condições óptimas de pH, temperatura, concentração e tempo, resultantes da aplicação numérica.....	98
Tabela 4.9: Resultados obtidos, relativamente aos testes de controlo de qualidade: resistência à abrasão.....	102

## Lista de abreviaturas

DTNB- Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoico)

PHMB- Poli (hexametenobiguanidina)

MMTSO- Metil metanotiosulfinato

*S. aureus*- *Staphylococcus aureus*

*S epidermidis*- *Staphylococcus epidermidis*

Spf – sobre peso de fibra

*K. pneumoniae*- , *Klebsiella . pneumoniae*

# Capítulo I

---

## Introdução

## 1.1—Têxteis anti-microbianos

Os têxteis são dos materiais que, devido à sua versatilidade, têm maior aplicação nas mais diversas áreas: produção de vestuário convencional, têxteis lar, vestuário hospitalar e cirúrgico e aplicações biomédicas.

No entanto, em determinadas circunstâncias, este tipo de material também é a causa para numerosos problemas, devido à sua capacidade para reter humidade.

Vestuário ou outro tipo de têxteis podem tornar-se portadores de microrganismos quando em contacto com o corpo humano. O corpo humano oferece um ambiente ideal para o crescimento de microrganismos, enquanto munido de oxigénio, água e calor, como também nutrientes providos de derrames e de exsudados corporais que, juntamente com a capacidade hidrofílica do têxtil, acondiciona todos estes factores, concebendo o meio ideal para o desenvolvimento e proliferação dos mesmos (Giri *et al*, 2009).

Vários estudos demonstram que o material têxtil utilizado em centros hospitalares, maioritariamente roupa de cama, é um excelente substrato para o crescimento e transmissão de microrganismos, nomeadamente de origem bacteriana ou fúngica. A temperatura e a humidade que se cria entre um indivíduo e a cama são as condições ideais para a proliferação de bactérias e outros microrganismos. Posteriormente, o contacto de outros doentes com os tecidos contaminados pode levar ao aparecimento de infecções microbianas. Os mesmos estudos revelam também, que os tecidos que revestem as camas libertam grandes quantidades de microrganismos, contaminando assim o ar (Borkow e Gabbay, 2008).

A crescente procura por este material, mesmo tratando-se de um material propício ao crescimento bacteriano, levou ao desenvolvimento de padrões que, para além de satisfazerem as necessidades dos usuários, aumentem a protecção dos mesmos contra microrganismos (Giri *et al*, 2009).

Durante o processamento de fibras ou tecidos, estes, são sujeitos a várias técnicas de acabamento para lhes conceder propriedades anti-microbianas. Essas propriedades não se destinam exclusivamente para protecção do usuário contra bactérias, fungos e outros microrganismos, mas também em aumentar a própria resistência da fibra ao ataque bacteriano, como, por exemplo, biodeterioração causada por fungos, sem prejudicar as restantes características da fibra (Giri *et al*, 2009).

Actualmente, já se encontra comercialmente disponível uma vasta gama de produtos anti-microbianos, compostos e fibras para aplicação têxtil, resultado da investigação que detalhadamente é referida nos próximos parágrafos (Ramachandran *et al.*, 2004).

**Tabela 1.1:** Compostos anti-microbianos disponíveis comercialmente (Broughton *et al*, 2000; Ramachandran *et al*, 2004)

Compostos	Nome comercial	Fornecedor	Método de aplicação
<b>Siloxano quaternário</b>	Aegis Microbe Shield®	Aegis Environments Bioshield Technologies	Tratamento químico
<b>Triclosano e outros</b>	Irgaguard® sanitized® Microban®	Ciba Clariant microban products Co	Incorporação no polímero Tratamento químico
<b>Zeolito de prata</b>	AgION™	AgION Technologies	Incorporação no polímero
<b>PHMA-cloridrato de poli (hexametileno biguanidina)</b>	Reputex 20	Avecia Ltd.	Tratamento químico: substratos devem conter pelo menos 35%celulose
<b>Diodometilp-tolilsulfona</b>	Diodometilp-tolilsulfone	Dow Chemical	Tratamento químico
<b>N-halaminas</b>	Halosource N-Halamines	Halosource Co	Tratamento químico Pad-dry e Branqueamento com Cloro
<b>Triclosano, Diodometilp-tolilsulfona, isotiazolonas, compostos de amónio quaternários.</b>	Ultra-Fresh®	Thomson Research associates	Tratamento químico Incorporação no polímero

## 1.2—Importância do acabamento anti-microbiano no material têxtil

A infestação microbiana em superfícies têxteis representa inúmeros problemas para o utilizador do material como para o próprio têxtil.

Estes microrganismos provocam a degradação do material com consequentes 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 um toque desagradável (Alonso *et al*, 2009).

A situação é mais agravante quando os têxteis são para aplicação médica e hospitalar, tais como, lençóis de cama, atoalhados, batas, mascaras e todo o tipo de material têxtil utilizado no acto cirúrgico, apesar da sua lavagem e esterilização a altas temperaturas.

Determinadas secções hospitalares são mais propícias ao desenvolvimento e proliferação de microrganismos. É o caso das especialidades médicas como pediatria e geriatria, dedicadas a assistência de crianças e idosos, respectivamente, assim como cirurgia; são dos ramos mais vulneráveis à propagação de microrganismos, com consequente desenvolvimento de infecções. As crianças, porque o seu sistema imunológico ainda não está completamente desenvolvido, contrariamente ao dos idosos, que se encontra num estado fragilizado (Michielsen *et al.*, 2004) (Schindler *et al.*, 2005).

Vulgarmente, devido ao estado debilitado dos doentes, o seu sistema imunológico fragiliza-se e facilmente se desenvolvem microrganismos. Para além disso, o facto de muitas vezes os doentes terem que permanecer na mesma posição por um longo período de tempo, favorece o desenvolvimento de um micro ambiente propício à proliferação dos mesmos. A deposição de fluidos corporais na superfície têxtil, como fonte de alimento, juntamente com a temperatura e humidade que se estabelece entre o doente e o têxtil, constitui o meio ideal para o crescimento e propagação de microrganismos de natureza bacteriana ou fúngica (Michielsen *et al.*, 2004) (Schindler *et al.*, 2005)

A redução da proliferação microbiana não é conseguida somente pelo controlo das condições físicas do meio ambiente, nem mesmo nos processos de lavagem frequentes, à excepção da lavagem à fervura, desaconselhável para a maioria dos materiais têxteis. Assim sendo, o desenvolvimento de têxteis anti-microbianos surge como potencial meio de controlo da multiplicação microbiana, podendo mesmo levar à diminuição/eliminação do risco de infecções provocadas pelos microrganismos, nomeadamente, patogénicos. Por outro lado, a inibição do metabolismo microbiano reduz a formação de odores desagradáveis no utilizador e protege o material têxtil (Michielsen *et al.*, 2004) (Schindler *et al.*, 2005).

## 1.3—Objectivo

Com este trabalho, propõe-se estudar um novo acabamento anti-bacteriano, para aplicação no sector têxtil, à base de um produto natural dotado de propriedades anti-microbianas, no sentido de se obter têxteis providos da mesma propriedade.

Para o efeito, pretende-se testar a aplicação da L-cisteína, como composto bioactivo, seguida da optimização do método de aplicação, de forma a optimizar as melhores condições de aplicação e difusão do aminoácido e, conseqüentemente, as propriedades anti-microbianas do próprio têxtil.

Simultaneamente, pretende-se avaliar o efeito cito-tóxico do material funcionalizado, de forma a garantir o desenvolvimento eficaz e seguro de um novo método/material antibacteriano.

## Capítulo II

---

### Revisão bibliográfica

## 2.1—Acabamentos anti-microbianos

Os acabamentos anti-microbianos para aplicação no sector têxtil têm vindo a despertar a atenção de investigadores nessa área. Tornou-se necessária a implementação de propriedades anti-microbianas nos tecidos, visto que a velocidade de desenvolvimento de microrganismos sobre os têxteis é drasticamente elevada, quando na presença de condições adequadas. Logo, à partida, um tratamento anti-microbiano deverá actuar rapidamente, de forma a ser eficaz (Tomsic *et al*, 2009).

A selecção de um agente anti-microbiano depende de vários factores: ser eficaz contra uma vasta gama de bactérias e fungos, ter uma baixa toxicidade para o consumidor, o método de aplicação e a capacidade de fixação no mesmo (Ren *et al*, 2009) (Tomsic *et al*, 2009) (Kangwansupamonkon *et al*, 2009).

Dependendo um pouco da utilidade que é dada ao material têxtil, a capacidade de fixação do composto no tecido pode ser ou não factor determinante. Se for intenção criar um têxtil descartável, é suficiente que este possua uma acção anti-microbiana temporária. Para tal, basta que o agente anti-microbiano tenha uma capacidade de fixação razoável. Contrariamente, se o têxtil em causa for para uso continuado, é indispensável que o agente anti-microbiano tenha uma grande capacidade de fixação e permanência no material, para que o efeito anti-microbiano não seja eliminado aquando da lavagem do mesmo (Ren *et al*, 2009) (Tomsic *et al*, 2009)

Resumidamente, a aplicação de um acabamento anti-microbiano sobre materiais têxteis não deverá afectar de forma negativa a qualidade do material, como, por exemplo, a resistência à rotura e a sua coloração; deve, preferencialmente, ser compatível com todos os métodos e substâncias químicas usados na produção do têxtil; serem resistentes às condições atmosféricas (luz solar, humidade) e fluidos corporais; e duráveis à lavagem doméstica, à limpeza a seco e à passagem a ferro. Por outro lado, não deverá matar a flora bacteriana não patogénica presente na superfície da pele bem como deverá evitar reacções alérgicas e/ou irritação. O que implica que, no final do acabamento, o material seja submetido a determinados testes de compatibilidade, cito-toxicidade, irritabilidade, entre outros, para certificar que o produto oferece o máximo de segurança ao usuário (Schindler *et al.*, 2005).

Paralelamente, o composto bioactivo deve possuir um amplo espectro de actividade anti-microbiana e actuar selectivamente em microrganismos indesejáveis.

O método utilizado para a impregnação do composto ou agente bioactivo no têxtil, deve ser economicamente rentável e apresentar um ausente ou reduzido impacto

ambiental. Devem, ainda, cumprir os requisitos exigidos por entidades reguladoras, de forma a serem inofensivos para o produtor e consumidor.

## 2.2—Compostos com propriedades anti-microbianas

Inúmeros agentes anti-microbianos têm sido testados laboratorialmente para posterior aplicação na indústria têxtil. Apesar da diversidade de compostos citados na literatura, a maioria não produz um efeito anti-microbiano duradouro no tecido e são limitados quanto a quantidade de espécies capazes de inibir (Sun *et al*, 2001).

Muitos dos compostos com propriedades anti-microbianas usados nos materiais têxteis, são também explorados em áreas como a indústria alimentar, cosmética e produtos de limpeza. Desses compostos fazem parte: metais pesados, compostos quaternários de amônio, compostos de Poli (hexametilenobiguanidina) (PHMB), quitosano, triclosano, dióxido de titânio, compostos de origem vegetal e alguns corantes (Gao e Cranston, 2008) (Giri *et al*, 2009).

Estes agentes têm actividade particularmente bactericida, porém, quando ligados a fibras têxteis a sua actividade e disponibilidade ficam reduzidas, obrigando a elevadas concentrações, no processo de funcionalização.

### 2.2.1 Dióxido de titânio

Estima-se que compostos fotocatalíticos como dióxido de titânio, óxido de zinco, sulfureto de cádmio e sulfureto de zinco contêm um elevado potencial anti-microbiano. No entanto, é o dióxido de titânio que expressa em simultâneo maior poder fotocatalítico, actividade, poder oxidante e estabilidade (Kangwansupamonkon *et al*, 2009).

A utilização de dióxido de titânio, como agente fotocatalítico, para a degradação de misturas orgânicas e até mesmo de microrganismos, como vírus, bactérias e células cancerígenas, está em fase de investigação, assim como a sua aplicação para a esterilização de material médico-cirúrgico, produtos alimentares, filtros de ar condicionado e superfícies sanitárias (Kangwansupamonkon *et al*, 2009).

O desempenho do dióxido de titânio como agente anti-microbiano contra a E.coli pode provocar uma redução bacteriana à volta de 99,99%, (Shieh *et al*. 2006) (Kangwansupamonkon *et al*, 2009). O seu efeito bactericida também foi observado em

bactérias patogénicas presentes nos alimentos, como *Salmonella choleraesuis*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Listeria monocytogenes*, bem como na *Pseudomonas aeruginosa* (Kangwansupamonkon *et al*, 2009).

Embora o elevado poder oxidante do dióxido de titânio seja positivo para determinadas aplicações, esta característica pode provocar danos. A aplicação directa de dióxido de titânio em materiais orgânicos, como plásticos, pode conduzir a uma degradação do material levando à fragmentação da superfície, (Schmidt *et al*, 2005) (Kangwansupamonkon *et al*, 2009). Um efeito de degradação fotoquímica foi igualmente observado em materiais têxteis e papeleiros. Para solucionar este problema, foi proposta a utilização de dióxido de titânio com uma cobertura de apatita. Esta cobertura permite que os compostos químicos e biológicos sejam degradados pelo dióxido de titânio, sem este estar em contacto directo com o material. O facto de a apatita ser bastante porosa, permite que os compostos sejam rapidamente absorvidos (Kangwansupamonkon *et al*, 2009)

### **2.2.2 Compostos de amónio quaternários**

Os compostos de amónio quaternários, particularmente os que contêm na sua cadeia molecular, 12-18 carbonos, são usados como bacteriostáticos e agentes desinfectantes em fibras têxteis (Gao e Cranston, 2008).

A presença de uma carga positiva no átomo de azoto dos compostos quaternários é responsável por uma série de mecanismos destrutivos dos microrganismos, incluindo danos na membrana celular, desnaturação das proteínas e rompimento da estrutura celular (Gao e Cranston, 2008).

Durante o processo de inactivação da célula microbiana, os grupos de amónio quaternário mantêm-se inalterados e, mesmo após a sua ligação com a fibra, retêm as suas propriedades anti-microbianas (Gao e Cranston, 2008).

Diversas tentativas têm sido feitas para tentar ligar covalentemente compostos quaternários às fibras de lã. A síntese de um novo composto quaternário, o N-dodecyl-aminobetaina-2-mercaptoetillamina (DABM), por parte de Diz e seus colaboradores (Gao e Cranston, 2008), possibilitou a formação deste tipo de ligação. O DABM reage com a lã por intermédio dos seus grupos tiol livres, com os resíduos de L-cisteína-sulfonato ou com a cistina presente na lã, formando uma ligação dissulfureto assimétrica. Deduz-se que esta ligação covalente de amónio quaternário favoreça uma actividade anti-microbiana mais permanente (Gao e Cranston, 2008).

### 2.2.3 Corantes

Alguns corantes sintéticos utilizados na indústria têxtil, foram especificamente concebidos com actividade anti-microbiana. Por exemplo, uma série de corantes azo dispersos, preparados por reacção de derivados de cloreto de sulfenilamido diazónio com indan-1,3-diona, demonstraram excelentes resultados de tingimento e efeito anti-microbiano, quando aplicados em lã e nylon (Han e Yang, 2005) (Gao e Cranston, 2008).

Outra forma de se conseguir um acabamento, que seja, em simultâneo, anti-microbiano e de coloração, consiste em fixar o composto bioactivo a um corante por meio de ligações covalentes. Por exemplo, novos corantes catiónicos foram sintetizados através da ligação de compostos de amónio quaternário, ao grupo amino-antraquinónico do cromóforo, tendo evidenciado diferentes níveis de actividade anti-microbiana, consoante as suas estruturas mas, quando aplicados a fibras de acrílicas, a durabilidade do efeito não foi além das cinco lavagens (Gao e Cranston, 2008).

Muitas plantas são utilizadas para extracção de compostos naturais, usualmente empregues na síntese fármacos. Contudo, devido ao carácter anti-microbiano associado à capacidade de tingimento de alguns, estes são úteis para aplicação no sector da tinturaria (Han e Yang, 2005) (Giri *et al*, 2009).

*Lawsonia inermis* é um género botânico pertencente à família Lythraceae. Desta planta é extraído um corante natural. O corante contém um pigmento vermelho-alaranjado, designado de *Lawsone*. Quimicamente a molécula de *Lawsone* é 2-hidroxi-1,4-naftoquinona, mas trivialmente, também é conhecida como ácido henotanico e é o principal componente das folhas de *Lawsonia inermis* (ou Henna) (Giri *et al*, 2009).

O extracto aquoso das folhas de *Henna* tem a capacidade de inibir o crescimento de microrganismos, Gram positivos e Gram negativos, assim como os microrganismos que estão envolvidos em infecções provenientes de queimaduras (Giri *et al*, 2009).

Outros corantes extraídos das plantas Acácia catechu, *Quercus infectoria*, ou insectos como, *Kerria lacca*, quando aplicados a fibras de lã, por processos por esgotamento, demonstraram actividade contra um vasto espectro de microrganismos, nomeadamente, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis* (Gupta *et al*, 2004, Singh *et al*, 2005).

A aplicação de materiais revestidos com extractos deste género em queimaduras, pode compensar certas complicações que surgem quando se utiliza material convencional, como os pensos curativos envolvidos por uma camada de nitrato de prata que provocam manchas e retardam o processo de cicatrização (Giri *et al*, 2009).

#### **2.2.4 N-Halamina e derivados**

A possibilidade de se obter um acabamento anti-microbiano durável com base no princípio da regeneração, é algo a delinear no futuro. Em 1962, Gagliardi propôs um modelo para têxteis anti-microbianos, baseado no princípio da regeneração. Embora, este modelo tenha sido apresentado há mais de trinta anos, existem poucos estudos descritos relativos ao mesmo (Sun e Sun, 2002).

O polímero N-Halamina tem recebido especial atenção para este assunto, devido à sua duradoura actividade anti-bacteriana ser consequência da sua forte capacidade de regeneração. Por outro lado, demonstrou também, ser capaz de eliminar um vasto conjunto de microrganismos sem perturbar os ecossistemas. A sua forte acção bactericida é atribuída às propriedades oxidativas das ligações de Halamina (Cl-N) (Sun e Sun, 2002).

Os compostos derivados de N-Halamina já são utilizados como desinfectantes no tratamento de águas e a sua incorporação em materiais têxteis tem tido excelentes resultados (Sun e Sun, 2002).

Em tempos foi desenvolvido um material têxtil à base de fibras de algodão, que possui uma actividade anti-microbiana durável e regenerável, graças a um composto derivado de hidantoin, ou monometilol-5,5-dimetilhidantoin. Este elemento actua como precursor para a sintetize de um composto bactericida do grupo das Halaminas. Durante o processo de agregação, o anel existente no hidantoin é ligado covalentemente ao substrato celulósico das fibras de algodão. A junção do anel heterocíclico com a estrutura celulósica não é afectada pelas sucessivas lavagens do tecido até depois de aplicado o processo de branqueamento (Sun *et al*, 2001).

#### **2.2.5 Sais metálicos**

Muitos metais pesados, mesmo a baixas concentrações, são tóxicos para o metabolismo dos microrganismos, quer no seu estado livre ou combinado com outros compostos. Embora alguns metais, como cobre, zinco e cobalto, atraiam a atenção como agentes anti-microbianos para aplicação em substratos têxteis, a prata é sem dúvida o mais amplamente usado (Michielsen *et al.*, 2004) (Gao e Cranston, 2008).

Várias empresas têm desenvolvido materiais anti-microbianos em que o ião prata é aplicado como revestimento final na superfície das fibras. Esses materiais apresentam uma elevada actividade anti-microbiana, mas a cor dos artigos finais é afectada negativamente (Michielsen *et al.*, 2004). Da mesma forma que durante a utilização do material, e na

presença de humidade, a prata difunde até à superfície da fibra formando iões de prata que, em condições normais, 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 (Gao e Cranston, 2008).

Os iões de prata na forma de zeólitos, ou de sais de prata, podem ser incorporados em polímeros sintéticos, na forma de nanopartículas. O metal é libertado gradualmente até à superfície da fibra a uma velocidade controlada para que o efeito anti-microbiano seja continuado. Contudo, a estabilidade à lavagem não é satisfatória (Michielsen *et al.*, 2004) (Gao e Cranston, 2008).

A aplicação de um tratamento com metais em fibras naturais só pode ser introduzido como última etapa do acabamento final e várias estratégias foram avaliadas para aumentar a captação e durabilidade do efeito anti-microbiano.

Fibras de algodão foram submetidas a um pré tratamento com ácido anidrido succínico, que actua como um ligante de iões metálicos, de forma a aumentar e reforçar a adsorção dos sais metálicos na fibra, ( $\text{Ag}^+$  e  $\text{Cu}^{2+}$ ), propiciando uma actividade anti-bacteriana mais eficiente (Purwar *et al.*, 2004) (Gao e Cranston, 2008).

Em fibras proteicas (por exemplo lã), os grupos carboxílicos livres dos resíduos aminoácidos aspartilo e glutamilo são considerados os prováveis locais de ligação para iões metálicos. As limitações de capacidade de ligação podem ser, ainda, reforçadas com pré-tratamentos com ácido tanínico, que aumenta o número de locais de complexação. (Purwar *et al.*, 2004) (Gao e Cranston, 2008).

Os tratamentos anti-microbianos à base de iões metálicos, têm, no entanto, uma série de limitações, devido a problemas técnicos e ambientais que podem causar (Gao e Cranston, 2008).

### **2.2.6 Quitosano**

O quitosano, derivado desacetilado da quitina, poli (1,4)-2-amido-2-desoxi- $\beta$ -D-glucose, componente principal das conchas de crustáceos como camarões, caranguejos e lagostas, é um polímero que desperta cada vez mais interesse, nas mais diversas áreas como, química, bioquímica, medicina, farmácia, biotecnologia e ciências têxteis, devido às suas propriedades de biodegradabilidade, biocompatibilidade, não toxicidade, regenerante e actividade anti-microbiana. Estas propriedades dependem de dois parâmetros fundamentais, o grau de desacetilação e peso molecular do polímero (Gao e Cranston, 2008).

A capacidade anti-microbiana do quitosano associado a fibras têxteis começou por ser avaliada sobre fibras celulósicas, mais precisamente em fibras de algodão. Verificou-se que o havia um ligeiro efeito anti-microbiano, abrangendo até uma vasta gama de micróbios, não se verificando, contudo, que o acabamento era durável após lavagens. O método de incorporação directo não permitia uma ligação covalente entre o quitosano e as moléculas de celulose, perdendo-se o polímero e o seu consequente efeito anti-microbiano, durante as lavagens. Desta forma, têm sido levados a cabo, estudos sobre a aplicação de quitosano em matérias celulósicas, com a utilização de agentes reticulantes como, ácido de 1,2,3,4-butanotetracarboxílico, ácido cítrico e dimetilolhidroxietilenoúrea, para aumentar a durabilidade ou permanência do acabamento (Gao e Cranston, 2008).

O quitosano foi igualmente aplicado sobre fibras de lã, não para efeito de actividade anti-microbiana da lã, mas como agente antifeltrante para testar a capacidade de resistência ao encolhimento, das fibras de lã. No entanto, dada a actividade anti-microbiana natural do quitosano, é de prever que o tratamento com quitosano confira ao têxtil uma dualidade de comportamento: resistência ao encolhimento, em simultâneo com um efeito anti-microbiano (Gao e Cranston, 2008).

Devido à natureza química do quitosano e das fibras de lã, um tratamento com quitosano requer pré-tratamentos capazes de aumentar a reactividade entre ambos, de forma que o polímero possa aderir à superfície das fibras e fixar-se (Gao e Cranston, 2008).

Além do quitosano puro, vários derivados foram sintetizados e usados como agentes anti-microbianos para aplicação em têxteis. Estes incluem oligosacarídeos à base de quitosano como o cloreto de N-(2-hidroxi)propil-3-trimetilamónio,-quitosano, e de N-p-(N-metilpiridino) quitosano e cloreto de N-4-[3-(trimetil-amónio)-quitosano.. Muitos destes derivados contêm um grupo de amónio quaternário para aumentar a actividade anti-microbiana (Gao e Cranston, 2008).

Foi igualmente provado, através de alguns estudos preliminares, que o quitosano melhora a absorção de corante pelas fibras (Giri *et al*, 2009).

### **2.2.7 Compostos fenólicos**

De entre os compostos fenólicos, o 2,4,4-tricloro-2- hidoxidifeniléter (triclosano), é o mais utilizado em aplicações para preparar materiais anti-microbianos (Gao e Cranston, 2008).

Em 2004, Payne patenteou um tratamento para têxteis de algodão à base de triclosano, misturado com uma resina de poliuretano. Sendo uma molécula relativamente

pequena, o triclosano pode também actuar como um corante disperso, podendo ser aplicado antes ou durante o processo de tingimento das fibras têxteis (Gao e Cranston, 2008). Durante uso do têxtil, o agente bioactivo migra até à superfície do tecido a uma taxa lenta mas, contudo, regular, para garantir um efeito anti-microbiano eficaz e contínuo (Gao e Cranston, 2008).

Sabe-se, também, que a sua actividade contra fungos não é tão significativa e a resistência bacteriana a este composto suscita uma enorme preocupação por parte dos investigadores, tendo sido banido em alguns países europeus. Além disso, o triclosano é reactivo quando exposto à luz solar, formando compostos tóxicos, da família das dioxinas, devido ao rompimento de ligações existentes na molécula de triclosano (Gao e Cranston, 2008).

### **2.2.8 Compostos de Poli (hexametenobiguanidina) (PHMB)**

Compostos de Poli (hexametenobiguanidina) apresentam um potente e largo espectro bactericida contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos. São actualmente usados comercialmente, uma vez que apresentam baixa toxicidade e um impacto ambiental aceitável resultante da sua aplicação. Este composto é aplicado com sucesso em fibras de algodão, lã e misturas lã/algodão (Gao e Cranston, 2008).

Contudo, as aplicações comerciais do poli (hexametenobiguanidina) não estão totalmente estabilizadas, nos artigos que são sujeitos a repetidas lavagens, devido à presença de agentes branqueadores clorados nos detergentes, que reagem com os grupos biguanidina, produzindo uma descoloração e perda da actividade anti-microbiana. Porém, tal facto foi contornado por Payne e seus colaboradores, que patentearam um pós tratamento à base de compostos orgânicos, para aplicação em fibras celulósicas e mais tarde estendido a fibras sintéticas, que permite aumentar a durabilidade do efeito anti-microbiano assim como suprimir o amarelecimento do têxtil. Outros detergentes apresentam surfactantes aniónicos na sua composição, que complexam com os grupos catiónicos do poli (hexametenobiguanidina), produzindo resíduos nos materiais têxteis. Desta forma, as propriedades dos materiais têxteis são alteradas após lavagem, e são acompanhadas de perda de actividade anti-microbiana (Gao e Cranston, 2008).

## 2.3—Métodos de incorporação de Compostos Anti-microbianos em Materiais Têxteis

A escolha de determinado método para a incorporação de um composto anti-microbiano é feita consoante a natureza do agente, das suas propriedades químicas e físicas, bem como do tipo de fibra (Ramachandan *et al*, 2004) (Gao e Cranston, 2008).

Os métodos de incorporação de compostos anti-microbianos em substratos têxteis podem ser divididos em dois grandes grupos:

- Introdução do composto, na matriz polimérica, anterior ou simultaneamente à extrusão, por processos de extrusão por fusão, e por via seca e húmida;
- Aplicação do composto anti-microbiano durante a fase de acabamento dos tecidos e fibras, por processos de impregnação, esgotamento, pulverização ou revestimento.

O primeiro é utilizado preferencialmente, quando o substrato têxtil é de origem sintética. Embora este tratamento confira uma propriedade anti-microbiana aos materiais, esta é de baixa durabilidade, pois o facto de o agente ser fisicamente agregado na estrutura da fibra, faz com que seja libertado lentamente durante a sua utilização (Gao e Cranston, 2008) (Ramachandan *et al*, 2004).

Os processos de esgotamento e impregnação (*pad-dry*), com triclosano e PHMB, são utilizados em acabamentos anti-microbianos em materiais à base de fibras naturais e fibras sintéticas (Gao e Cranston, 2008).

Métodos de impregnação, espumas e pulverização são acabamentos utilizados com compostos à base de silicone quaternário (Gao e Cranston, 2008).

Devido aos múltiplos factores de desgaste a que os artigos têxteis estão sujeitos durante o seu ciclo de vida, como sucessivas lavagens e secagens, a durabilidade do acabamento anti-microbiano, fica comprometida. Assim sendo, o factor de diferenciação no acabamento têxtil encontra-se nas tecnologias que permitem aumentar a permanência do composto anti-microbiano no material têxtil. Para tal, foram desenvolvidas ou aperfeiçoadas técnicas que propiciam um aumento dessa durabilidade. Dessas técnicas evidenciam-se as seguintes (Ramachandan *et al*, 2004) (Gao e Cranston, 2008):

- Insolubilização de substâncias activas no interior e à superfície das fibras;
- Tratamento das fibras com resinas, agentes de ligação ou condensados;
- Microencapsulação de agentes anti-microbianos na matriz da fibra;
- Modificação química da fibra para formação de ligações covalentes com os compostos anti-microbianos;
- Uso de polímeros, homopolímeros e/ou copolimerização sobre a fibra;
- Revestimento da superfície das fibras (Ramachandan *et al*, 2004) (Gao e Cranston, 2008).

A técnica de sol-gel, apesar de já bastante explorada em determinadas aplicações, ainda é um método emergente dirigido para acabamentos anti-microbianos em têxteis [13]. A técnica é bastante simples. Consiste na incorporação de agentes funcionais em nanopartículas de sol-gel com subsequente inclusão das mesmas no material a funcionalizar (Gao e Cranston, 2008). No que se refere à capacidade anti-microbiana, vários agentes anti-microbianos já foram encapsulados em partículas de sol-gel que, posteriormente, são fixadas no substrato têxtil de forma a conceder a funcionalidade pretendida ao material (Gao e Cranston, 2008).

Acredita-se que este novo processo tecnológico possibilitará a formação de acabamentos têxteis com funcionalidades ilimitadas (Gao e Cranston, 2008).

## 2.4—Mecanismos de acção dos agentes anti-microbianos

Embora os compostos bactericidas e bacteriostáticos venham a ser usados desde há séculos, a quantidade de materiais que contêm estes compostos aumentou drasticamente nos últimos anos, nos mais diversos sectores industriais (Maillard, 2002).

Inicialmente, recorria-se a agentes anti-microbianos com o intuito da conservação. Sal e plantas aromáticas para a conservação de alimentos, recipientes de cobre ou prata para a conservação de águas, e bálsamos para conservação de cadáveres, ou arte de mumificação. Já outras substâncias como vinagre, vinho, mel e cloreto de mercúrio eram utilizadas no revestimento de tecidos para tratamento de feridas. A partir do século XIX foram introduzidas novas substâncias químicas como, peróxido de hidrogénio, sulfato de cobre, e que na actualidade ainda funcionam como agentes bactericidas (Maillard, 2002).

A descrição da eficácia dos agentes anti-microbianos é normalmente bem documentada na bibliografia, todavia, falta ainda compreender com exactidão o mecanismo de acção que exercem sobre os microrganismos patogénicos (Maillard, 2002).

### 2.4.1—Caracterização das bactérias

As bactérias são seres microscópicos, dotadas de uma estrutura unicelular. Classificam-se, morfológicamente, de acordo com a forma da célula e com o grau de agregação. Visto isso, podem ser organizadas em cocos (esféricas), bacilo (bastonete), vibrião (virgula) e espirilo (forma ondulada). Relativamente ao grau de agregação, apenas os cocos e os bacilos formam colónias, e estes ordenam-se em diplococo, estreptococos, estafilococos e diplobacilos e estreptobacilos respectivamente. Podem ser detentoras de apêndices como flagelos, estruturas que lhes permite a locomoção (Maillard, 2002).

A maioria das bactérias é heterotrófica, dependendo da matéria orgânica como fonte de carbono (Prescott *et al*, 2005).

A estrutura da célula bacteriana é a de uma célula procariótica, sem organelos no interior celular, sem um núcleo envolvido por uma membrana nuclear e sem DNA organizado em verdadeiros cromossomas como na célula eucariótica. O DNA dos procariontes, geralmente composto por um único cromossoma circular, encontra-se localizado numa zona chamada nucleóide no citoplasma. Estas células não possuem nenhum tipo de compartimentação interna por membranas. A sua estrutura elementar consiste apenas numa parede celular, uma membrana citoplasmática e citoplasma (Maillard, 2002).

A parede celular é uma estrutura rígida, que recobre a membrana citoplasmática e confere forma às bactérias. Quimicamente é constituída por peptidoglicanos, ácidos teicóicos, lipopolissacarídeos e proteínas. É essencialmente da responsabilidade da estrutura e composição química da parede celular e membranas envolventes, que surgem variações da sensibilidade das bactérias para determinados tipos de agentes antibacterianos, bem como as respostas geradas por elas (Maillard, 2002) (Prescott *et al*, 2005).

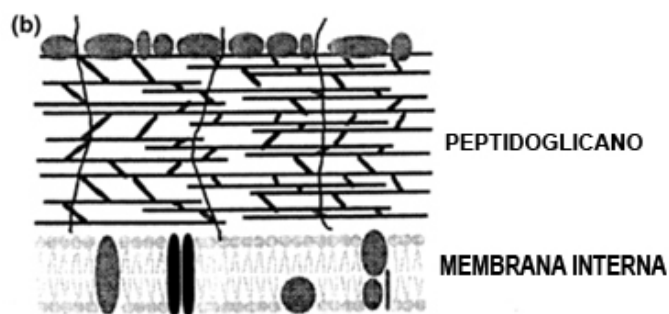
A parede celular das células procarióticas equivale, até certo ponto, à parede das células eucarióticas vegetais. No entanto, possui componentes que são exclusivos deste grupo de células, como, por exemplo, peptidoglicanos. Mesmo dentro do grupo, subsistem diferenças relevantes relativamente à sua ultraestrutura e composição química, admitindo-

se essas diferenças como responsáveis pelo seu comportamento face a coloração de Gram (Prescott *et al*, 2005).

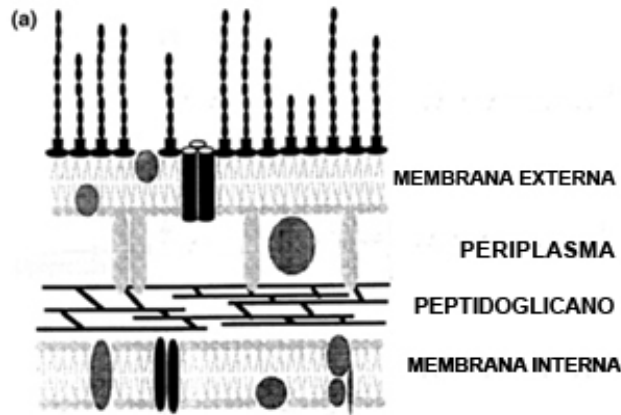
Esta técnica, usada há mais de um século pelos microbiologistas, permite distinguir os dois principais grupos bacterianos. De acordo com a coloração apresentada face ao método de Gram (método de coloração diferencial), as bactérias dividem-se em bactérias de Gram- positivo e de Gram-negativo (Prescott *et al*, 2005).

A parede celular das bactérias de Gram-positivo, quando observada em microscopia electrónica, apresenta-se como uma estrutura rígida, homogénea e espessa. É predominantemente constituída por peptidoglicanos, no entanto podem coexistir outros polímeros, como ácidos teicóicos e teiurónicos, como exemplificado na figura 2.1.

Inversamente, e sob o ponto de vista estrutural, a parede das bactérias de Gram-negativo exibe uma maior diferenciação e complexidade. Apresenta-se como uma estrutura não homogénea, mas sim estratificada. A camada mais interna é mais rígida e essencialmente constituída por peptidoglicanos. Possui uma camada mais externa, ausente na parede das bactérias de Gram-positivo, designada de membrana externa, como descrito na figura 2.2. Esta membrana é constituída por lipopolissacarídeos, fosfolipídios e proteínas. As bactérias Gram-negativas são, geralmente, menos sensíveis a bactericidas que as Gram-positivas devido à presença desta membrana externa que é responsável pela resistência intrínseca destes microrganismos para compostos anti-microbianos (Maillard, 2002) (Prescott *et al*, 2005).



**Figura 2.1:** Estrutura da parede celular externa das bactérias Gram-positivas (adaptado Maillard, 2002)



**Figura 2.2:** Estrutura da parede celular externa das bactérias Gram-negativas (adaptado Maillard, 2002)

A membrana citoplasmática é considerada como o principal alvo dos agentes antimicrobianos, pois esta desempenha na célula procariota muitas das funções vitais à sua sobrevivência, que na célula eucariótica são efectuadas pelos organelos celulares ausentes nas procarióticas. Para além disso, realiza também funções ligadas à biossíntese de componentes da parede celular e funções bioenergéticas, e funciona como barreira selectiva de permeabilidade (Prescott *et al*, 2005) (Maillard, 2002).

A membrana citoplasmática é constituída por uma bicamada fosfolipídica, onde se inserem proteínas integrais e se associam proteínas periféricas (Prescott *et al*, 2005).

## 2.4.2—Caracterização das estirpes patogénicas mais importantes

Muitos microrganismos que causam doenças no Homem são membros da sua flora ou população microbiana indígena. Na pele humana encontram-se maioritariamente bactérias Gram-positivas, como as espécies *Staphylococcus*. As bactérias Gram-negativas, como a *Escherichia coli*, habitam principalmente no intestino grosso. São estas mesmas, as estirpes patogénicas mais comuns nas infecções hospitalares (Borkow e Gabbay, 2008).

Estafilococos em português, ou segundo a nomenclatura latina internacional *Staphylococcus*, são um género de bactérias que pertence à família dos *Micrococcaceae*. São igualmente referenciadas de cocos pela forma esférica que apresentam. Muitas das espécies pertencentes a este género integram a população microbiana indígena do Homem, porém, quando há quebra do equilíbrio habitual ou acesso a áreas estéreis, podem tornar-se patogénicas (Prescott *et al*, 2005).

Os estafilococos são anaeróbios facultativos, isto é, podem viver em meios aeróbios, usando oxigénio, ou anaeróbios através da fermentação. Contudo, crescem muito mais rápido aerobicamente, sendo capazes de crescer a temperaturas compreendidas entre 18 e 40 °C. Todavia, é aos 37 °C que o crescimento atinge o seu pico mais elevado. Não têm flagelos nem cílios, logo, são incapazes de se moverem por si só. São células Gram-positivas (Prescott *et al*, 2005).

As populações deste género predominam nas regiões da pele ricas em glândulas sudoríparas e folículos pilosos e áreas mais próximas dos orifícios naturais do corpo. As espécies *S. aureus* e *S. epidermidis* predominam sobretudo na mucosa nasal, pele da cabeça respectivamente (Prescott *et al*, 2005).

*Klebsiella pneumoniae* é uma espécie de bactéria Gram-negativa, em forma de bastonete, da família *Enterobacteriaceae*. É o mais importante membro do género *Klebsiella*, anaeróbios facultativos, podendo ser encontrada no trato respiratório e trato gastro-intestinal e urinário. Pode causar pneumonia, embora seja mais comum a sua implicação em infecções hospitalares (aparelho urinário e feridas), em particular, em doentes imunologicamente deprimidos (Prescott *et al*, 2005).

Outras estirpes que não habitam a flora humana podem, naturalmente, ser nocivas ao Homem, mas não são alvo desta investigação.

### 2.4.3—Tipos de interacções entre agentes anti-microbianos e células patogénicas

Da gama estimada de compostos anti-microbianos, estes variam na estrutura e composição química. O mecanismo de acção por eles originado reflecte esta multiplicidade, embora os danos finais provocados na célula bacteriana apresentem uma semelhança considerável.

Um composto anti-microbiano para ser eficaz deve interagir com o seu alvo. A aptidão para trespassar o interior da célula patogénica pode ser uma condição importante para a sua eficiência, não sendo, contudo, fundamental (Maillard, 2002).

Alterações como, modificações da estrutura da camada externa da célula bacteriana, da membrana citoplasmática ou mesmo do citoplasma contribuem para o efeito bacteriostático ou bactericida do agente químico (Maillard, 2002).

O primeiro contacto de um agente anti-microbiano envolve uma ligação com a superfície da célula. Esta ligação induz uma série de alterações, que podem ser o suficiente para provocar o efeito anti-microbiano, ou permitir apenas a invasão do agente para o espaço intracelular de forma a que este atinja o local a lesar (Maillard, 2002).

O mecanismo de acção de um agente anti-bacteriano é definido consoante a estrutura bacteriana para a qual tem actividade. Assim, três tipos de interacções podem ser enumerados: interacção com os componentes celulares da camada externa, interacção com a membrana citoplasmática e interacção com os constituintes citoplasmáticos. Porém, é possível que um agente anti-microbiano actue em mais que uma estrutura para incutir a sua actividade (Maillard, 2002).

#### **2.4.3.1 Interacção com os componentes celulares da camada externa e parede celular**

Diversos compostos anti-microbianos podem interagir com a camada celular externa. No entanto, não significa que a viabilidade celular seja afectada. Existe uma gama de compostos que actuam especificamente contra a permeabilidade desta barreira. Observou-se que a hidrofobicidade das bactérias Gram-negativas era modificada quando estas eram colocadas em contacto com compostos catiónicos como clorexidina e cloreto de benzalcónio, do grupo de compostos de amónio quaternários (Jones *et al*, 1991, Maillard, 2002).

A alta reactividade do glutaraldeído (GTA) com os componentes da camada exterior, nomeadamente as lipoproteínas, pode não induzir um efeito bactericida e tem havido pressupostos que baixas concentrações de GTA podem, até, proteger as células de outros agentes nocivos. No entanto, em elevadas concentrações, o grau de *crosslinking* produzido pela GTA sobre a célula bacteriana, aumenta, comprometendo, dessa forma, as funções vitais da bactéria, resultando num efeito bactericida (Maillard, 2002).

Outros compostos anti-microbianos provocam efeitos sobre a parede celular. É o caso do hipoclorito, um poderoso oxidante que induz a lise em células Gram-negativas,

aparentemente por meio de uma rotura na parede celular. As baixas concentrações de fenol, formol e cloreto de mercúrio estimulam também a lise da *E. coli*, estafilococos e estreptococos. Os detergentes aniónicos produzem o mesmo efeito sobre as bactérias Gram-negativas. A deformação das células bacterianas para formas alongadas é consequência de danos provocados na parede celular por anti-microbianos. Compostos como fenol e m-cresol são responsáveis por esses danos em *Proteus vulgaris* e *Klebsiella aerogenes*, respectivamente. Corantes como o metil verde fucsina e o azul-de-metileno podem despertar um efeito semelhante (Maillard, 2002).

Embora estes agentes possam não exibir uma forte actividade bactericida, a sua utilização pode melhorar a acção de outros, pois a desobstrução das estruturas mais externas facilita o acesso de outros agentes a locais específicos para proceder à inactivação celular (Maillard, 2002).

#### **2.4.3.2 Interacção ao nível da membrana citoplasmática**

As interacções anti-microbianas ao nível da membrana citoplasmática podem dar origem a três sequelas distintas na célula bacteriana: rotura da membrana citoplasmática, dissipação da força motriz protonada e interacções com sistemas enzimáticos (Maillard, 2002).

##### **a) Rotura da membrana citoplasmática**

A rotura da membrana citoplasmática faz-se acompanhar pela evasão de componentes intracelulares como, potássio ( $K^+$ ), fosfatos inorgânicos, cadeias de aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos. No entanto, esta lesão pode conduzir apenas a um distúrbio da permeabilidade da membrana plasmática, reflectindo-se assim num efeito bacteriostático e não bactericida (Maillard, 2002).

O modo de acção de alguns agentes catiónicos, como a clorexidina, é particularmente bem documentado. Enquanto a biguanida provoca uma elevada taxa de vazamento de componentes intracelulares e, a elevadas concentrações, provoca coagulação do citoplasma, foi demonstrado que outra biguanida, a polihexametileno biguanida (PHMB), interage com a membrana fosfolípida, prejudicando a integridade da membrana externa das bactérias Gram-negativas (Maillard, 2002).

Analogamente, também os compostos de amónio quaternário induzem a rotura da membrana citoplasmática. Embora a forma como interagem os diferentes agentes catiónicos com a membrana citoplasmática não seja sempre bem explícita, acredita-se que a clorexidina e compostos de amónio quaternário combinam-se com a membrana fosfolípida, provocando o seu colapso (Maillard, 2002).

A desestabilização da permeabilidade membranar provocada por agentes aniónicos está igualmente relacionada com o modo de actuação dos mesmos. Tem sido demonstrado que o dodecilguanidina monoacetato (dodina) atravessa rapidamente a membrana externa e citoplasmática de *Pseudomonas syringae* para se combinar com células fosfolípicas e proteínas. O seu efeito resulta na degradação acelerada da célula com libertação de RNA e lise celular (Maillard, 2002).

O etanol e o isopropanol são outros desreguladores membranares. O etanol provoca a rápida libertação de componentes intracelulares, presumivelmente como resultado da sua eficaz penetração na fracção hidrocarboneto da bicamada fosfolípida. Inibe a síntese de DNA, RNA, proteínas e peptidoglicanos na *E. coli*. Similarmente, o feniletanol e fenoxietanol induzem de forma generalizada perda da função membrana citoplasmática. O fenoxietanol induz a translocação de protões na *E. coli*, mas em concentrações elevadas produz danos irreversíveis na membrana (Seiler e Russell 1991) (Maillard, 2002).

## **b) Dissipação da força motriz protonada**

A força motriz é expressa como um gradiente de protões que atravessa a membrana citoplasmática do interior para o exterior da célula (Maillard, 2002).

Determinados ácidos orgânicos e ésteres, têm a capacidade de alterar o sentido da força motriz. Por exemplo, o ácido sórbico converte a circulação de protões para o espaço intercelular da *E. coli* em condições de baixo pH (Maillard, 2002). Contudo, a eficácia dos ácidos orgânicos não pode ser explicada unicamente por uma actividade contra a força motriz. A sua actividade inibitória pode, simultaneamente, ser originada pela acidificação do citoplasma celular. É o exemplo do ácido acético, que detém a capacidade para neutralizar a força motriz, diminuir o pH e desnaturar proteínas, em determinadas condições (Maillard, 2002).

Mlynarcik e colaboradores observaram que a síntese de ATP em *Staphylococcus aureus* foi completamente inibida por três produtos químicos diferentes: Sal de amónio biquaternário, Óxido de amina e Éster alcoxifenilcarbámico. Identicamente, o Dinitrofenol,

um ácido lipofílico fraco, é entendido como um desacoplador da fosforilação oxidativa, pela inibição da síntese de ATP (Mlynarcik *et al*, 1981) (Maillard, 2002).

Compostos citados em parágrafos anteriores, como o Polihexametileno biguanida, não só provocam a rotura da membrana citoplasmática, como os seus efeitos são igualmente compatíveis com a inibição de enzimas presentes no processo respiratório (Maillard, 2002).

### **c) Interações com sistemas enzimáticos**

Muitas proteínas presentes na membrana citoplasmática são de carácter enzimático. São proteínas altamente especializadas e com actividade catalítica, mas não participam directamente na reacção química, apenas reduzem a sua energia de activação e são reutilizáveis (Maillard, 2002).

A actividade biológica de algumas enzimas depende fortemente da presença de resíduos de L-cisteína na sua cadeia polipeptídica, devido ao facto destes aminoácidos possuírem um grupo tiol (SH-) que é vital para a actividade (Maillard, 2002).

Reacções com, ou de oxidação, onde participe este resíduo essencial, promovem a inibição ou inactivação celular. Determinados bactericidas têm uma capacidade similar de interacção com o grupo tiol. É o exemplo de alguns metais como cobre e prata, e os elementos arsénio e 2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol (Maillard, 2002).

A actividade de 1,2-benzisotiazole-3-1, 5-cloro-n-metilisotiazol-3-1 (CMIT) e N-metilisotiazol-3-1, três isotiazolonas amplamente utilizadas como conservantes, tem sido avaliada pela suspeitável interacção com grupos tiol, embora o CMIT possa também reagir com aminas (Collier *et al*, 1990) (Maillard, 2002).

Para além dos danos descritos em parágrafos anteriores provocados pelo etanol, este estimula o desenvolvimento de efeitos semelhantes nos sistemas enzimáticos, tais como, a inibição de enzimas envolvidos no ciclo da glicólise na síntese de ácidos gordos e fosfolípidos, que podem resultar directamente da rotura da estrutura da membrana (Maillard, 2002).

### **2.4.3.3 Interação com os componentes citoplasmáticos**

Do grupo de reacções anti-microbianas que se desencadeiam ao nível dos componentes citoplasmáticos destacam-se as seguintes: interacções com os ácidos nucleicos e com os ribossomas (Maillard, 2002).

#### **a) Interações com os ácidos nucleicos**

Da vasta gama de corantes existentes na indústria, alguns destacam-se pelas suas propriedades anti-bacterianas. É o caso das acridinas e corantes do grupo trifenilmetano, como é exemplo o violeta de cristal. As acridinas competem com os protões pelos locais aniónicos da superfície celular. A combinação mais relevante e expressiva que pode surgir é a ligação ao DNA da célula bacteriana. Esta ligação resulta da intercalação de uma molécula de acridina entre as duas cadeias de DNA. Também foi demonstrado que o cristal violeta interage com ácidos nucleicos da *E. coli* (Greene *et al*, 1993) (Maillard, 2002).

A Quinacrina é uma droga antimalárica, bloqueia a síntese do DNA e inibe fortemente a síntese de RNA e proteínas na *E. coli*, sendo, no entanto, selectiva quanto ao bloqueio da síntese de RNA na *B. cereus* (Maillard, 2002).

Os agentes alquilantes, como o óxido de etileno e o formaldeído, afectam os nucleósidos das purinas e os ácidos nucleicos devido às interacções estabelecidas com os grupos amina, sulfidrilo e hidroxilo (Maillard, 2002).

O ozono também reage com os aminoácidos, modificando as bases das purinas e pirimidinas (Maillard, 2002).

#### **b) Interações com ribossomas**

Os ribossomas são responsáveis pela tradução do RNA mensageiro para uma cadeia de aminoácidos. Estes podem ser danificados com bactericidas como peróxido de hidrogénio, proflavina e p-cloromercuribenzoato (Maillard, 2002).

### c) Interações com outro tipo de componentes celulares

Determinados bactericidas têm a capacidade selectiva de reagir com componentes citoplasmáticos. Muitas acridinas possuem essa selectividade. É o caso da proflavina que inibe a síntese de polinucleótidos pela DNA polimerase (Maillard, 2002).

Compostos alquilantes e agentes oxidantes são altamente reactivos e por isso reagem fortemente com a célula bacteriana. Óxido de etileno, óxido de propileno e  $\beta$ -propiolactona agem como agentes alquilantes. Eles reagem com os grupos amino, carboxilo, sulfidril e hidroxilo das proteínas e ácidos nucleicos (Maillard, 2002).

Agentes oxidantes, tais como halogéneos, peróxido de hidrogénio, ácido peracético e ozono, interagem analogamente com os constituintes celulares. A actividade do peróxido de hidrogénio resulta da formação de radicais hidroxilo, que oxida grupos tiol presentes nas proteínas e enzimas (Maillard, 2002).

Aldeídos, principalmente Glutaraldeído e formaldeído, são compostos químicos altamente reactivos que se combinam com proteínas e ácidos nucleicos, através da formação de ligações intermoleculares cruzadas (Maillard, 2002).

Compostos catiónicos e, especialmente, a clorohexidina, têm a capacidade de provocar coagulação citoplasmática (Maillard, 2002).

## 2.5—Avaliação da actividade anti-microbiana em materiais

### têxteis

O grau de actividade anti-microbiana 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 aniquilação dos microrganismos. Assim sendo, os tratamentos anti-microbianos que inibem o crescimento e desenvolvimento dos microrganismos são designados de biostáticos, bacteriostáticos e fungistáticos, ao invés, os produtos que destroem por completo os microrganismos, são designados de biocidas, bactericidas e fungicidas. (Ramachandran *et al.*, 2004; Schindler *et al.*, 2005)

Uma série de testes foram desenvolvidos para determinar a eficácia dos têxteis anti-microbianos. Estes testes podem ser classificados em duas categorias: difusão em agar e em suspensão (Gao e Cranston, 2008).

### **2.5.1 Teste de difusão em agar**

Os testes baseados na difusão em agar são apenas qualitativos e de fácil execução. São muito utilizados como testes preliminares para detecção da actividade anti-microbiana, e quando há um grande número de amostras para examinar. Este teste estima a actividade anti-microbiana através da inibição do crescimento bacteriano, ou seja, é formada uma zona de inibição na zona circundante da amostra tratada com o composto anti-microbiano que é observada visualmente (Ramachandran *et al.*, 2004) (Gao e Cranston, 2008).

As células bacterianas são inoculadas em placas com nutriente agar sobre as quais são colocadas as amostras têxteis a testar. As placas são então incubadas a determinada temperatura durante um período de tempo. Após esse período de tempo, verifica-se se existe ou não zona de inibição. (Ramachandran *et al.*, 2004)

Se não se verificar nenhum crescimento bacteriano sob o substrato têxtil, significa que a amostra possui actividade anti-microbiana. No entanto, esta zona de inibição é uma medida indirecta da actividade da amostra, não apresentando proporcionalidade directa com a eficiência do tratamento anti-microbiano. A manifestação desta depende de factores como, concentração mínima de inibição (MIC), concentração de agente anti-microbiano no tecido, dependendo, igualmente, da temperatura e componentes orgânicos. (Ramachandran *et al.*, 2004). A taxa de difusão do agente para o inoculo influencia de igual modo o desenvolvimento da zona de inibição, e o seu tamanho indica o vigor da actividade anti-microbiana ou a taxa de libertação do agente activo. Uma forte fixação do agente ao substrato (formação de ligações covalentes), impede a sua difusão para o meio inoculado. Dessa forma, não é possível que decorra interacção entre agente e microrganismo, impossibilitando a formação de zona de inibição (Gao e Cranston, 2008).

Estes testes são mais úteis quando o composto bioactivo tem propriedades migratórias, formando halo.

### **2.5.2 Teste em suspensão**

Esta segunda classe de testes anti-microbianos avalia a eficácia anti-microbiana pela redução da população microbiana, baseando-se na técnica de contagem dos microrganismos. É, portanto, um método quantitativo. A actividade anti-microbiana é avaliada através da comparação do tamanho da população inicial com a que permanece após a incubação.

A técnica é mais morosa em comparação com os testes em difusão agar. De uma forma simples, uma colónia de microrganismos inoculada e incubada antecipadamente é colhida e diluída num solvente, de forma a que a concentração final da solução seja 0.5 ( $\sim 2 \times 10^8$ /mL CFU) segundo a escala turbimétrica de MacFarland. Seguidamente, injecta-se na amostra têxtil um volume conhecido da cultura diluída e leva-se a incubar a determinada temperatura e tempo. A seguir à incubação adiciona-se um determinado volume de meio e agita-se vigorosamente o frasco para remover as células viáveis da amostra têxtil. (Ramachandran *et al.*, 2004).

Até ao momento, poucos métodos para avaliação da capacidade anti-microbiana dos têxteis são elaborados sob as mesmas condições reais às de utilização. Para simular o mais possível as condições reais, foi desenvolvido um novo sistema de testes. O método JIS L 1902-2002 recomenda a utilização de meios de cultura bastante diluídos para limitar os níveis de nutriente, assemelhando-se, assim, às circunstâncias reais. A ISO (*International Organization for Standardization*) desenvolveu um método de ensaio (ISO 20743), em que as bactérias são impregnadas sobre a superfície da amostra têxtil sem o auxílio de um suporte aquoso. Em seguida, as amostras são incubadas debaixo de condições de humidade a uma temperatura de 20 °C durante um tempo especificado (18 a 24 h), após a qual se procede à contagem das células viáveis (Gao e Cranston, 2008).

A inserção de uma taxa de humidade nos ensaios é também essencial para compreender a acção do agente activo. Por vezes, a morte bacteriana não é consequência da capacidade anti-microbiana de determinado agente mas sim da humidade presente no meio, dando assim a impressão de uma falsa eficácia da capacidade anti-microbiana (Gao e Cranston, 2008).

Devido à grande diversidade de materiais com propriedades próprias, observa-se uma grande dificuldade em desenvolver um só teste que consiga satisfazer todos os requisitos. Por isso, grande parte das vezes, é necessária uma cascata de testes acessíveis para estudar completamente a actividade de um determinado material. (Ramachandran *et al.*, 2004)

Os testes anti-microbianos só avaliam a capacidade anti-microbiana do material têxtil previamente tratado. No entanto, antes da sua comercialização, estes têm que ser obrigatoriamente submetidos a outro tipo de testes, nomeadamente, de biocompatibilidade, que envolve três ensaios distintos: cito-toxicidade, sensibilidade e irritabilidade (Gao e Cranston, 2008).

## 2.6—Fibra de Lã

### 2.6.1 Morfologia e composição química

A fibra de lã tem uma origem polimérica natural, apresentando uma estrutura histológica de elevada complexidade, caracterizada pela presença de três componentes: cutícula, complexo de membrana celular e córtex (Aluigi *et al*, 2008).

A cutícula é constituída por células laminares em torno do córtex - as escamas, que se sobrepõem parcialmente umas às outras no sentido da raiz para a extremidade da fibra (Lewis, 1992).

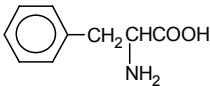
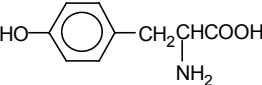
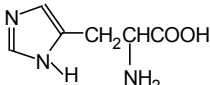
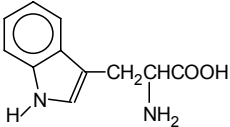
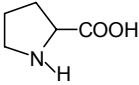
O córtex representa cerca de 90% em peso da fibra de lã. É formado por células alongadas e fusiformes onde cada célula é envolvida por um complexo de membrana celular. As células do córtex são constituídas por microfibrilas que se encontram agrupadas entre elas em agregados conhecidos por macrofibrilas. O córtex está geralmente diferenciado em duas partes distintas: ortocortex e paracortex, que não se apresentam nas mesmas circunstâncias e proporções em todos os tipos de lã (Lewis, 1992).

O complexo de membrana celular consiste numa rede de membranas celulares que mantêm a coesão entre as células corticais assim como a separação entre as células corticais e cuticulares, sendo por vezes referenciado como o cimento intercelular. A estrutura do complexo de membrana celular é altamente sujeita a acção enzimática (Lewis, 1992).

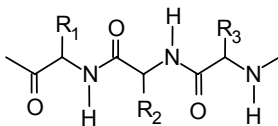
Em termos de composição química, a lã é essencialmente formada por uma proteína a queratina. O número, natureza e proporção dos aminoácidos constituintes variam de proteína para proteína, sendo no caso da lã, uma mistura contendo 18 aminoácidos na proporção indicada na tabela 2.1 (Lewis, 1992).

**Tabela 2.1:** Aminoácidos constituintes da lã (adaptado de Lewis, 1992)

Aminoácido	Estrutura	(%)
Glicina	$\begin{array}{c} \text{HCHCOOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	8,2
Alanina	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{CHCOOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	5,4

<b>Fenilalanina</b>		2,8
<b>Valina</b>	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{CCHCHCOOH} \\   \quad   \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{NH}_2 \end{array}$	5,7
<b>Leucina</b>	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{CCHCH}_2\text{CHCOOH} \\   \quad   \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{NH}_2 \end{array}$	7,7
<b>Isoleucina</b>	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{CCHCHCHCOOH} \\   \quad   \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{NH}_2 \end{array}$	3,1
<b>Serina</b>	$\begin{array}{c} \text{HOCH}_2\text{CHCOOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	10,5
<b>Treonina</b>	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{CCHCHCOOH} \\   \quad   \\ \text{HO} \quad \text{NH}_2 \end{array}$	6,3
<b>Tirosina</b>		3,7
<b>Ác. Aspártico</b>	$\begin{array}{c} \text{HOOCCH}_2\text{CHCOOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	6,6
<b>Ác. Glutâmico</b>	$\begin{array}{c} \text{HOOCCH}_2\text{CH}_2\text{CHCOOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	11,9
<b>Histidina</b>		0,8
<b>Arginina</b>	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{C}(=\text{N})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{CHCOOH} \\   \quad   \\ \text{HN} \quad \text{NH}_2 \end{array}$	6,9
<b>Lisina</b>	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{CHCOOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	2,8
<b>Mationina</b>	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{CS}(\text{CH}_2)_2\text{CHCOOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	0,4
<b>Cistina</b>	$\begin{array}{c} \text{HOOCCHCH}_2\text{SSCH}_2\text{CHCOOH} \\   \quad   \\ \text{NH}_2 \quad \text{NH}_2 \end{array}$	10,0
<b>Triptofano</b>		-
<b>Prolina</b>		7,2

A estrutura geral do polipeptídeo da lã representa-se pela fórmula geral:



Onde  $R_1$ ,  $R_2$  e  $R_3$  representam os aminoácidos das cadeias laterais (Lewis, 1992).

Os vários aminoácidos que compõem as cadeias laterais influenciam as propriedades da lã, nomeadamente no que diz respeito à reactividade química e processos tintoriais. Consoante a sua natureza química, estes podem conferir uma natureza polar ou apolar às cadeias laterais (Lewis, 1992).

### 2.6.2 Ionização dos péptidos constituintes da fibra de lã

Ainda que se tenham enunciado conceitos mais gerais de ácido e base, como o de Lewis e o de Usanovich, o de Bronsted é o mais adequado para o estudo da ionização dos sistemas biológicos, onde é universal a presença de água (Silva, 1962).

A concepção de Bronsted possibilita o estudo ácido-base em diferentes solventes; permite, além disso —o que tem maior relevância no caso presente — referir o comportamento de cada grupo protonotrópico das cadeias laterais dos aminoácidos que compõem a cadeia peptídica da lã (Silva, 1962).

O número de grupos protonotrópicos presentes na cadeia peptídica, que participam na transferência de protões, quando se põe a lã em contacto com soluções diluídas de ácidos ou de hidróxidos alcalinos, depende dos valores de  $pK'$  dos diversos grupos da proteína, por um lado, e do respectivo valor de pH, por outro (Silva, 1962).

Quando se mergulha a lã, no estado isoelectrico, em soluções ácidas, os grupos de carboxilação combinam-se com protões cedidos pela solução e tomam a forma carboxílica, neutra. Inversamente, quando a lã é mergulhada numa solução alcalina, por exemplo, o hidroxidião, os grupos protonotrópicos são progressivamente passados à forma básica, por remoção sucessiva de protões pelo anião hidroxilo.

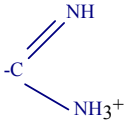
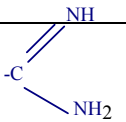
Porem, é de extrema importância salientar que, ao contrário do que se verifica na reactividade das soluções ácidas sobre a lã, conjunto de reacções reversíveis, a acção de soluções alcalinas sobre a lã, mesmo a baixas temperaturas, promove o ataque hidrolítico contra as ligações peptídicas e, especialmente, contra as ligações de dissulfureto, segundo um processo complexo e irreversível. Estas reacções, secundárias, tornam-se altamente pronunciadas acima de pH 12 (Silva, 1962).

A influência da temperatura nas reacções de equilíbrio de proteínas com soluções ácidas e alcalinas, foi estudada, para o caso da lã, em grande pormenor por Steinhardt, Fugitt e Harris (Silva, 1962). Verificaram estes investigadores que, enquanto a reacção de equilíbrio da lã com soluções ácidas era praticamente insensível às variações de temperatura, o mesmo não sucedia à “combinação” alcalina, pois a quantidade de hidróxido de potássio “combinado” com a lã, a determinado valor de pH, aumentava notoriamente, ao elevar-se a temperatura. Os mesmos investigadores completaram que os grupos protonotrópicos, que comandam as reacções de equilíbrio da lã com soluções ácidas, possuem baixos calores de ionização, e que, pelo contrário, os grupos determinantes da reacção em meio básico, se caracterizam por valores elevados do calor de ionização (Silva, 1962).

Da cadeia polipeptídica, constituinte das fibras de lã, destacam-se os aminoácidos, ácido aspártico, lisina e arginina, pois são os mais reactivos e sensíveis a variações de pH, devido aos seus grupos protonotrópicos presentes nas cadeias laterais: grupo carboxílico e amíno, respectivamente (Silva, 1962).

Com base nos valores apresentados na tabela 2.2, observa-se que o aumento progressivo do pH conduz a um aumento do número de grupos carboxílicos carregado negativamente, contrariamente aos grupos amino que tornam-se electricamente neutros. Por sua vez, uma diminuição progressiva do pH eleva o número de aminas positivamente carregadas, mas neste caso os grupos carboxílicos neutralizam-se. Verifica-se que é no intervalo de pH de 4 a 5 valores, que coexistem, em simultâneo, e em maior quantidade, os dois grupos protonotrópicos nas formas ionizadas, reflectindo-se, assim, num maior número de locais para o estabelecimento de ligações iónicas (Silva, 1962).

**Tabela 2.2:** Tabela de ionização/ pH da lâ. (Cegarra e Valdperas, 1981)

pH		2.0	4.4	5.0	7.0	10.0	11.0	12.0	14.0
<b>Ácido Aspártico</b>	-COOH	100	50	20	0	0	0	0	0
	-COO <sup>-</sup>	0	50	80	100	100	100	100	100
<b>Lisina</b>	-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	30	30	30	30	15	3	0	0
	-NH <sub>2</sub>	0	0	0	0	15	27	30	30
<b>Arginina</b>		50	50	50	50	50	45	25	0
		0	0	0	0	0	5	25	50
<b>Carga eléctrica total</b>		<b>+ 80</b>	<b>+ 30</b>	<b>0</b>	<b>- 20</b>	<b>- 35</b>	<b>- 52</b>	<b>- 75</b>	<b>- 100</b>

### 2.6.3 Ponto isoeléctrico da lâ.

No estudo da ionização dos aminoácidos e proteínas, tem especial importância o conceito de ponto isoeléctrico. Tal como se define, o ponto isoeléctrico, corresponde ao ponto de “combinação” ácida nula se os grupos carboxílicos se encontrarem, na proteína, em número igual aos dos grupos catiónicos e se outros catiões e aniões, além do hidrónio e hidroxidónio, não reagirem com a proteína. Se a última condição não se verificar, a proteína pode encontrar-se no estado isoeléctrico, a qualquer valor de pH (Silva, 1962).

Apesar dos diferentes estudos realizados para a detecção do ponto isoeléctrico da lâ, a discrepância entre os valores apresentados por diversos investigadores levou a que Speakman (Silva, 1962), ao passar em revisão as propriedades anfólicas da lâ, emitisse a opinião de que a queratina possui, não só um ponto isoeléctrico bem definido, mas antes uma região ou zona isoeléctrica, que se estenderia de cerca de pH 4 a cerca de pH 8, onde praticamente não haveria “combinação” da lâ com ácidos ou com hidróxidos alcalinos (Silva, 1962).

## 2.7—Aplicação de compostos anti-microbianos em substratos têxteis de origem proteica - lã

Na actualidade, os materiais têxteis tendem a evoluir no sentido de apresentarem múltiplas funcionalidades. É possível fazê-lo recorrendo a determinados compostos anti-microbianos, para obter materiais com funções anti-microbianas acrescidas de outras propriedades importantes que contribuem, significativamente, para obter materiais de maior valor acrescentado. No entanto, essa evolução tem recaído, sobretudo, ao nível das fibras de origem celulósica, como algodão, e fibras sintéticas, como o poliéster, comparativamente às fibras de lã que pouco têm sido alvo de investigação (Ramachandan *et al*, 2004) (Gao e Cranston, 2008).

Com base na bibliografia científica, os métodos que permitem a incorporação directa de compostos anti-microbianos em fibras têxteis foram, maioritariamente, testados em têxteis de algodão e sintéticos, sendo a aplicação dos mesmos, sobre lã, ainda pouco desenvolvida (Gao e Cranston, 2008).

Rajni e seus colaboradores (Singh *et al*, 2005) aplicaram corantes naturais, com potencial actividade anti-microbiana, sobre substratos de lã. Obtiveram uma redução significativa do crescimento das estirpes seleccionadas para o estudo. No entanto, a aplicação deste método só é vantajosa quando, associado ao efeito anti-microbiano pretendido, exista um objectivo paralelo de tingir o material têxtil (Singh *et al*, 2005).

Outro estudo levado a cabo por Dev e colaboradores (Giri *et al*, 2009), indica que o quitosano, para além de ser um anti-microbiano eficaz, a sua aplicação em tecidos de lã antes de processos de tingimento, tem duplo efeito: aumenta a absorção de corante por parte das fibras e melhora significativamente a actividade anti-microbiana do próprio corante. Contudo, ambos os métodos revelam desvantagens técnicas. Assim, novos métodos e aplicações são esperadas durante as presentes e futuras investigações.

## 2.8—Nova abordagem para a funcionalização anti-microbiana de materiais têxteis à base de lã

A optimização de qualquer género de material têxtil tem como finalidade melhorar as suas características intrínsecas, ou até mesmo adicionar novas propriedades, de forma a

tirar o maior proveito possível aquando da utilização desse material. O mesmo objectivo é pretendido quando se funcionaliza um têxtil de lã.

A opção pela utilização de um substrato têxtil de lã, deve-se tanto às suas características naturais; polímero natural, bom isolante térmico, fibras naturalmente elásticas que conferem conforto e apresentam uma elevada resistência à rotura e também, ao facto de este substrato ainda não ter sido alvo de grande investigação, podendo, ainda, ser aplicado em inúmeros artigos de aplicação pediátrica e geriátrica, em que os riscos de infecção são, naturalmente, mais elevados.

A funcionalização de um têxtil de lã com um aminoácido dotado de propriedades anti-microbianas, para além de ter um carácter inovador, pois é uma abordagem diferente de tudo aquilo que já está em fase de investigação, permite que o têxtil partilhe da mesma propriedade, inculcando-lhe assim uma nova característica. Desse modo, é possível que o material têxtil seja aplicado em situações propícias à proliferação de microrganismos. Poderá, assim, ser aplicado em situações particulares como revestimento de camas para doentes com infecções bacterianas temporárias ou com propensão à formação de infecções devido a situações de acamado permanente, ou até mesmo em produtos de geriatria e pediatria, em virtude das excelentes propriedades antialérgicas, de conforto e termo-isolantes, das fibras de lã.

A idealização da aplicação de aminoácidos ricos em grupos tiol em substratos têxteis, mais exactamente na lã, como responsáveis pelo princípio activo da actividade anti-microbiana, surge no âmbito da biotecnologia associada ao biomimetismo. É do conhecimento, com base na análise de artigos científicos, que a actividade anti-microbiana de certas células imunitárias dos vertebrados é da responsabilidade de determinados compostos presentes nas mesmas. Compostos esses, que possuem na sua constituição L-cisteína. Compostos do mesmo género e com actividade semelhante foram também encontrados em invertebrados. É exemplo, de uma lista infindável de compostos, as defensinas e drosomicinas presentes nos vertebrados e invertebrados, respectivamente (Dimarcq *et al*, 1998) (Ganz, 2004).

Acrescenta-se, ainda, e segundo Friedman (2001), que os grupos SH estão entre os mais reactivos grupos funcionais nos sistemas químicos e bioquímicos. Este grupo tem a capacidade de interagir com outros compostos através de múltiplas vias: ligação dissulfídrica, reacção de oxidação-redução, adição nucleófila e deslocamento. Podem, igualmente, actuar como antioxidantes (Friedman, 2001).

De uma forma geral, é de prever que no final do processo de incorporação o balanço seja positivo, pois tais propriedades para além de serem benéficas para a saúde humana, permitem que o próprio aminoácido ao estabelecer mais que um tipo de ligação, amplifique

o número de reacções possíveis, tanto ao nível da própria lã como com agentes extrínsecos, elevando, assim, a rentabilidade do processo. Outra vantagem é o facto de se tratar de um composto natural, presente em simultâneo na constituição da fibra como em alguns processos bioquímicos do ser vivo; pelo que não deverá apresentar efeitos nefastos para a lã nem para o seu utilizador.

### **2.8.1 Interação de compostos ricos em L-cisteína como potenciais agentes anti-microbianos para a lã**

Os organismos, desde o mais elementar ao mais complexo incluindo os seres humanos, produzem substâncias de protecção contra micróbios. Muitas dessas substâncias são de natureza peptídica, rica em resíduos de L-cisteína (Epanand e Vogel, 1999). O papel de defesa imunológica inata contra infecções, apresentado por estas substâncias, é dramaticamente ilustrado no caso dos pacientes com fibrose cística. Quando as  $\beta$ -defensinas, expressas nas vias respiratórias, são inactivadas por uma elevada concentração de sal na superfície do epitélio, abre-se uma lacuna propícia para a colonização das vias respiratórias por microrganismos patogénicos (Ganz, 2004). Mais provas da eficácia *in vivo* de péptidos com carácter anti-microbiano, são dadas por experiências feitas em mutantes de moscas *Drosophila*, em que ao lhes inculir uma deficiência imunológica, estas perdem a capacidade de produzir péptidos anti-microbianos e, conseqüentemente, tornam-se altamente sensíveis a infecções (Dimarcq *et al*, 1998).

Embora tais péptidos possuam um efeito directo sobre os micróbios, como danificar ou desestabilizar as membranas das células bacterianas, víricas, ou fúngicas, eles parecem estar amplamente envolvidos na expressão de respostas imunes inatas e inflamatórias (Jenssen *et al*, 2006).

No global os péptidos anti-microbianos, incluindo este género, têm carga positiva, são anfipáticos, e podem ser isoladas a partir de organismos unicelulares, insectos e outros invertebrados, plantas, anfíbios, aves, peixes, e mamíferos, incluindo seres humanos (Jenssen *et al*, 2006). Embora estas substâncias possuam uma grande diversidade estrutural e um amplo espectro de actividade, que inclui bactérias Gram positivas e Gram-negativas, fungos e, em casos mais particulares, alguns vírus, elas têm em comum a capacidade de permeabilizar membranas citoplasmáticas (Dimarcq *et al*, 1998). Para além disso, gozam da vantagem de não exhibir cito-toxicidade para as células de mamíferos (Ganz, 2004). É provável também que este não seja o único mecanismo de acção que possuam. No entanto, a interacção de péptidos com as membranas é um requisito

importante para a maioria, se não todos, dos péptidos anti-microbianos (Erand e Vogel, 1999).

Um outro grupo de compostos igualmente dotados de resíduos de L-cisteína, com potencial capacidade anti-microbiana mas de natureza não proteica é a designada classe dos tiosulfatos. Compostos desta classe química podem ser extraíveis de substratos vegetais. O modo de actuação deste género de compostos sobre os microrganismos é variável. Um dos modelos de actuação consiste numa interacção entre o composto anti-microbiano e a membrana da célula alvo, através de uma força electrostática que se cria entre a carga positiva do agente anti-bacteriano com os compostos carregados negativamente, como grupos fosfato ou ácido lipoteico, constituintes dos lipopolissacarídeos da membrana e parede celular, das bactérias Gram-negativas e positivas, respectivamente. Como consequência, o agente pode permeabilizar a membrana e / ou destruí-la por completo (Jenssen *et al*, 2006). Este método de actuação é representativo da maioria dos anti-microbianos de origem proteica.

Um estudo realizado com defensina, um género de péptido rico em resíduos de L-cisteína, é prova deste modo de actuação. O péptido perturba a permeabilidade da membrana citoplasmática das bactérias Gram-positivas, dando origem a uma cascata de consequências: perda de potássio do citoplasma, parcial despolarização do interior da membrana, diminuição da quantidade de ATP no citoplasma, e inibição da respiração celular (Dimarcq *et al*, 1998).

Contrariamente, os compostos da classe dos tiosulfatos interactivam de forma distinta com a membrana bacteriana, sendo no entanto o resultado final semelhante. A actividade anti-microbiana de extractos vegetais, especialmente do alho e couve, é reconhecida cientificamente. Com base em estudos realizados a estes produtos agrícolas, conclui-se que o efeito anti-microbiano provém de compostos sulfurados voláteis derivados de compostos não proteicos (Kiung e Lee, 2001) (Wilson e Adams, 2007).

Apesar de a couve ser taxonomicamente afastada do género a qual pertence o alho e cebola, partilham de compostos de idêntica constituição química. A couve contém S-metil-L-cisteína sulfóxido que é estruturalmente semelhante à S-alil-L-cisteína sulfóxido, *alliin*, presente no alho. S-metil-L-cisteína sulfóxido e *alliin* são derivados metilo e alil de L-cisteína sulfóxido, respectivamente. Os dois compostos, por meio de reacções enzimáticas, originam, respectivamente, metil metanotiosulfato (MMTSO) e allicin. O MMTSO e a allicin têm estrutura química semelhantes, são derivados de tiosulfatos e são eles que conferem propriedades anti-microbianas (Kiung e Lee, 2001) (Wilson e Adams, 2007).

Estudos realizados sobre a capacidade anti-microbiana destes dois derivados de tiosulfatos, apontam para que o efeito resulte da interacção dos grupos de enxofre, –S

(O)-S- presentes nos tiosulfatos, com os grupos tiol (- SH), das proteínas e enzimas essenciais à sobrevivência dos microrganismos tais como a tripsina e outras proteases, levando à inibição de crescimento dos mesmos. Segundo relatos bibliográficos, (Kiung e Lee, 2001), estes compostos têm a capacidade de inibir o crescimento anti-microbiano em *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Candida utilis*, entre outras. Em casos particulares, como o da *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa* que, apesar de apresentarem resistência a múltiplos antibióticos, incluindo a penicilina, estreptomicina, doxycilline e a cefalexina, o seu crescimento é inibido por compostos extraíveis do alho (Kiung e Lee, 2001) (Wilson e Adams, 2007).

Para além de bactérias inibem, de igual forma, fungos e leveduras, podendo até adoptar efeito bactericida quando em concentrações mais elevadas (Kiung e Lee, 2001).

Apesar dos dois métodos descritos serem cientificamente válidos como modelos explicativos para a capacidade anti-microbiana de determinados compostos tiolados, adoptaremos para esta tese o segundo modelo, como forma de justificar a capacidade anti-microbiana do composto bioactivo seleccionado, devido ao facto de neste modelo se destacar uma interacção directa dos grupos tiol do aminoácido L-cisteína, com os compostos membranares.

## **2.8.2 Caracterização do aminoácido: L-cisteína**

Como o seu nome indica, os aminoácidos comportam uma função ácida e uma função amina primaria. No mundo vivo, distinguem-se duas categorias (Weil, 2005).

A primeira compreende vinte  $\alpha$  aminoácidos constitutivos de todas as proteínas (as funções amina e carboxilo encontram-se ligadas ao mesmo átomo de carbono, designado por carbono  $\alpha$ ) (Weil, 2005). A segunda, abrange todos os outros aminoácidos: os que se encontram no estado livre e que desempenham muitas vezes funções metabólicas importantes, e os que se encontram nalguns “pequenos” péptidos produzidos exclusivamente por microrganismos ou plantas (Weil, 2005).

Os vinte aminoácidos constitutivos das proteínas desempenham igualmente papéis metabólicos importantes. Estes, podem classificar-se de acordo ou com a sua natureza química, ou consoante o carácter hidrofílico ou hidrofóbico que a cadeia lateral R apresenta (Weil, 2005).

A L-cisteína, um dos aminoácidos da primeira categoria, insere-se na categoria dos aminoácidos de cadeia lateral, alifática ou aromática, hidrofílica neutra. Embora a ligação

C—S não seja polar, a L-cisteína (ácido  $\alpha$ -amino- $\beta$ -mercaptopropiónico) classifica-se neste grupo devido ao carácter fortemente polar do seu grupo tiol (SH). Este é, efectivamente, um dador de ligações hidrogénio. Os grupos tiol da L-cisteína podem ionizar-se negativamente por perda de um protão, em meio alcalino (Weil, 2005).

### 2.8.2.1 Ionização de aminoácidos livres

Embora determinadas, na sua maioria, por grupos diferentes, as propriedades iónicas das proteínas e dos aminoácidos apresentam certas semelhanças (Silva, 1962).

Todos os aminoácidos possuem pelo menos dois grupos ionizáveis, o carboxílico e a amina; tal característica define-os como moléculas anfotéricas: o grupo carboxílico de um aminoácido pode ceder um protão dando origem a um anião. Por sua vez, o grupo aminado pode fixar um protão e formar um catião (Silva, 1962) (Weil, 2005).

A ionização da L-cisteína foi recentemente estudada por diversos cientistas. Após vários estudos realizados para a determinação dos valores de pK dos diferentes grupos protonotrópicos da L-cisteína, os resultados obtidos foram analisados, comparados entre si e tabelados, como mostra a tabela 2.3 (Silva, 1962).

**Tabela 2.3:** Valores de pK dos diferentes grupos protonotrópicos da L-cisteína a 23 °C (adaptado de Silva, 1962)

Grupo ácido		
—COOH $\alpha$	—SH	—NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> $\alpha$
pK <sub>1</sub> =1,71	Pk <sub>2</sub> =7,45	Pk <sub>3</sub> =6,77
pK <sub>21</sub> =2,79	pK <sub>12</sub> =8,53	pK <sub>13</sub> =8,86
pK <sub>31</sub> =3,80	pK <sub>32</sub> =9,09	pK <sub>23</sub> =8,41
pK <sub>231</sub> =4,74	pK <sub>132</sub> =10,03	pK <sub>123</sub> =10,36

O pK mede a tendência que um grupo tem para ceder um protão, isto é, quanto maior o pK menor a tendência para a cedência do protão. Com base na definição e comparando com os valores apresentados na tabela, deduz-se que o grupo carboxílico, como sendo o que apresenta menor valor de pK, é o que possui maior tendência para a cedência de um protão, o que indica que, existem mais hipóteses de existirem em

simultâneo as duas formas iônicas ( $\text{COO}^-$  e  $\text{NH}_3^+$ ) em meio alcalino que em meio ácido (Silva, 1962).

Desta forma, é de esperar que a pH ácido existam as formas  $\text{COOH}$  e  $\text{NH}_3^+$ . É também de esperar que a pH acima de 8, a forma SH esteja na forma oxidada.

## Capítulo III

---

### Funcionalização anti-bacteriana da lã com L-cisteína

### 3.1—Estrutura e metodologia do trabalho experimental

Neste capítulo, avaliou-se a capacidade de funcionalização da lã com L-cisteína, bem como os efeitos resultantes em termos de bioactividade e de propriedades de qualidade da lã. Para o efeito testou-se, numa primeira fase, a capacidade de ligação da L-cisteína às fibras de lã. O processo consiste na aplicação simples e directa da L-cisteína às fibras de lã, por técnicas de esgotamento, em equipamentos vulgarmente utilizados em secções de tinturaria e acabamento das empresas têxteis.

Recorrendo a uma adaptação do teste de reagente de Ellman's, para aplicação directa em substratos sólidos, analisou-se a porção de L-cisteína presente nas amostras tratadas, por comparação com o respectivo branco.

Após funcionalização do material têxtil, as amostras foram submetidas a ensaios de controlo de qualidade, especificamente ao ensaio de resistência à rotura, para avaliar o impacto provocado pela imobilização de L-cisteína no material têxtil.

O possível efeito bacteriostático foi comprovado sobre *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*. A inibição do crescimento e efeito anti-bacteriano, das estirpes mencionadas, foram verificados de acordo com a Norma JIS 1902-2002. Procedeu-se, paralelamente, à detecção da concentração mínima inibitória (MIC) da L-cisteína na forma livre, para subsequente comparação com a percentagem inibitória ligada à fibra e também para nos dar indicações das concentrações a usar na funcionalização do material têxtil.

Aproveitando a mesma linha de raciocínio, foi testada a mesma capacidade de ligação, mas com o aminoácido cistina, por se tratar, igualmente, de um composto tiolado. Contudo, devido à dificuldade encontrada na sua solubilização, assim como a baixa taxa de ligação à fibra, que depende, neste caso, da aplicação em soluções fortemente ácidas, foi apenas seleccionada a L-cisteína. Assim, o estudo realizado neste capítulo, debruçou-se apenas sobre a utilização de L-cisteína, para obtenção de resultados que permitam encontrar e validar um novo método de funcionalização e acabamento anti-bacteriano aplicável a fibras de lã.

## 3.2—Materiais e métodos

### 3.2.1 Caracterização do material

Pelos motivos anteriormente descritos, seleccionou-se um tecido 100% lã, para a realização deste trabalho. Utilizaram-se amostras de tecido de lã, de aproximadamente 1g cada provete, na sua fase final de acabamento.

**Tabela 3.1:** Caracterização das amostras têxteis

Característica	Norma	Valor	
Composição	NP 1808, 2247 e 2248	100% Lã	
Massa linear dos fios (título) (Nm e Tex)	NP 1876	Teia	Trama
		2×19,3 tex 2/51,8 Nm	2×18,7 tex 2/53,4 Nm
Massa por metro quadrado (g/m <sup>2</sup> )	NP 1701	169	
Densidades (fios/cm)	ASTM 7211-2	Teia	Trama
		21,7	19,0
Resistência à abrasão (ciclos)	<i>Standard method IWSTM</i> 112-2000	34000±3000	
Ligamento	NP 1700	Tafetá	

O tecido foi previamente submetido a uma lavagem industrial em corda, durante 45 minutos a 40 °C, usando 4 g/l Plurafac LF 400 e uma R.B. 50/1, para eliminação de produtos de acabamento.

### 3.2.2 Produtos auxiliares químicos

Os vários reagentes e auxiliares químicos utilizados neste trabalho estão indicados na tabela 3.2, assim como a sua caracterização e respectivo fabricante. As soluções aquosas foram preparadas com água destilada.

**Tabela 3.2:** Caracterização dos reagentes e auxiliares químicos

Reagentes	Fórmula química	Massa molar (g/mol)	Marca	Frases de risco	Frases de segurança
L-Cisteína	$C_3H_7NO_2S$	120,98	SARF	22	
Acetato de sódio trihidratado	$C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$	136,08	Riedel-deHaen		
Fosfato trissódico dodecahidratado	$Na_3PO_4 \cdot 12H_2O$	380,12	Merck		
Acido acético glacial	$CH_3COOH$	60,05	Pronalab	10-35	2-23-26
Acido clorídrico	HCl	36,461	Riedel-deHaen	36/37/38	26
Reagente de Ellman (5,5'-ditiobis (2 ácido nitrobenzoico)) (DTNB)	$C_{14}H_8N_2O_8S_2$	396,35	Sigma-Aldrich	36/37/38	26-36
Ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA)	$C_{10}H_{12}N_2Na_4O_8 \cdot 2H_2O$	416,20	Sigma	36/37/38	26
Tampão citrato: Ácido cítrico monohidratado	$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$	210,12	sigma		
Citrato de sódio dihidratado	$Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$	295,13	sigma		
Plurafac LF 400	-	-	BASF	-	

### 3.2.3 Equipamento

Na tabela 3.3 estão descritas algumas características do equipamento e aparelhos de análise utilizados no decorrer do trabalho experimental. Foi também, naturalmente, utilizado material de vidro de uso corrente em laboratório.

**Tabela 3.3:** Caracterização dos equipamentos

Designação	Marca	Modelo
Aparelho de tingir	Mathis	BFA12
Balança analítica	Kern	770
Centrifuga	Selecta	Mixtasel
Espectrofotómetro	Datacolor	Spectraflash®
Espectrofotómetro	UNICAM	300
Estufa	WTB	Blinder
Medidor de pH	Hanna	Hi 9017
Micropipetas (10-100µL, 100-1000µL)	Socorex	-
Placa de agitação	Labinco	LD-40
Vortex	Heidolph	Reax top
Dinamómetro	Adamel Lhomargy	DY 35

## 3.3—Ensaios prévios

### 3.3.1 Detecção da concentração mínima inibitória para a L-cisteína

A concentração mínima inibitória, ou MIC, define-se como a menor concentração de um agente anti-microbiano que impede o crescimento visível de um microrganismo em testes de sensibilidade, por diluição em agar ou caldo.

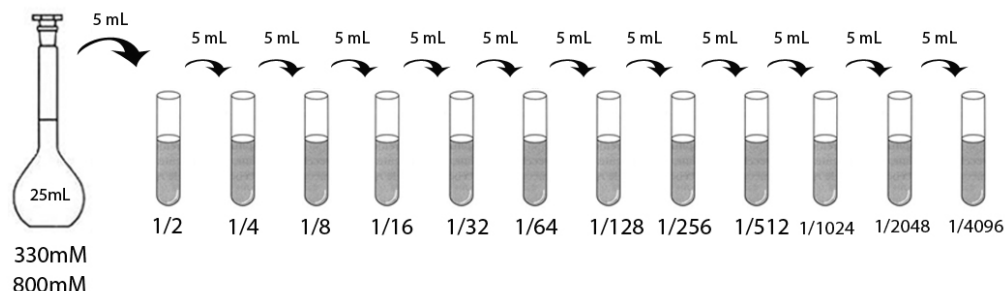
Para este trabalho experimental, adoptou-se o método da macrodiluição em caldo, para detecção da concentração mínima inibitória da L-cisteína, relativa às estirpes do mesmo género *Staphylococcus aureus* (ATCC29213) e *epidermidis* (ATCC12228). A selecção destas duas estirpes, teve como fundamento, o facto de se tratar de duas espécies

responsáveis por infecções hospitalares e por estarem disponíveis nos laboratórios de microbiologia da UBI.

Após preparação dos inoculos, ajustados à escala de McFarland e transferidos, cada um, para um caldo Muler-Hinton Broth, e respectivas diluições volumétricas do agente anti-microbiano, procedeu-se à realização do método propriamente dito: adicionou-se 1mL de cultura bacteriana a cada tubo contendo 1mL de agente anti-microbiano da série de diluições e a um tubo de controlo positivo. Foram, igualmente, a incubar, tubos de controlo do meio e do agente anti-microbiano contendo, somente caldo, e caldo com agente anti-microbiano, respectivamente.

Os tubos de macrodiluição inoculados, foram incubados a 37° C, durante 16-20 horas. Este procedimento foi executado fielmente, para ambas as estirpes.

O esquema indicado na figura 3.1 representa um procedimento conveniente e confiável da preparação das diluições do agente anti-microbiano.



**Figura 3.1:** Preparação das diluições

É, de salientar, que o método foi executado duas vezes, com base em soluções mãe de concentração diferente. Inicialmente, a partir de uma solução mãe de concentração 330mM, passando para uma outra mais concentrada, a 800mM, as quais correspondem a uma concentração mássica de 0,04g e 0,12g de agente por mL de solução, respectivamente. Para esta segunda solução mãe, o intervalo de concentrações estudado variou de 0,097g/mL até  $2,3 \times 10^{-5}$ g/mL, como mostra a tabela 3.4 (A e B).

**Tabela 3.4-A:** Tabela de diluições

	Diluições						
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
<b>Concentração (g/mL)</b>	$9,7 \times 10^{-2}$	$4,8 \times 10^{-2}$	$2,4 \times 10^{-2}$	$1,2 \times 10^{-2}$	$6,0 \times 10^{-3}$	$3,0 \times 10^{-3}$	$1,5 \times 10^{-3}$

**Tabela 3.4-B:** Tabela de diluições

	Diluições					
	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096
<b>Concentração (g/mL)</b>	$7,5 \times 10^{-4}$	$3,8 \times 10^{-4}$	$1,9 \times 10^{-4}$	$9,4 \times 10^{-5}$	$4,7 \times 10^{-5}$	$2,3 \times 10^{-5}$

## 3.4—Ensaio de Funcionalização

### 3.4.1 Aplicação da L-cisteína nas fibras de lã

Nesta etapa procedeu-se à incubação de várias amostras têxteis fazendo variar, de forma isolada, um parâmetro de cada vez, mantendo os restantes factores nas condições consideradas standard, de forma a testar a sua influência no processo de funcionalização do material têxtil em causa. Estipularam-se como parâmetros de avaliação, a temperatura, o pH e a percentagem de L-cisteína (spf), por serem parâmetros que influenciam a absorção de reagentes pela lã e para avaliação da capacidade de absorção de L-cisteína, respectivamente.

Os valores standard dos parâmetros para a incubação, como temperatura, tempo, agitação (rpm) e pH do banho de incubação, foram adaptados dos correntemente utilizados em

processos de tingimento da lã, levando a uma boa absorção com a menor degradação das fibras: 60°C, 60 minutos, 15 rpm, Razão de Banho (RB): 50/1 e pH 4,8 respectivamente. Estipulou-se, como valor padrão da percentagem de L-cisteína presente em solução o valor de 4% sobre o peso de fibra, atendendo aos valores encontrados para o MIC e à possível taxa de L-cisteína que não seja absorvida e fixada nas fibras de lã.

Usaram-se amostras de tecido de lã de aproximadamente 1g e uma razão de banho de 1/50. O banho de incubação foi preparado numa porção volumétrica de solução de Tampão Citrato, com a L-cisteína nela dissolvida, sendo, estas condições válidas para todos os ensaios. Os ensaios foram feitos em duplicado, incluindo os respectivos brancos para cada série. No final da incubação, procedeu-se ao enxaguamento de todas as amostras, com água destilada abundante, seguida de secagem a 30 °C durante 4 horas.

#### **3.4.1.1 Influência da temperatura**

Testou-se a influência da temperatura no processo de funcionalização variando esta, um nível acima (90°C) e um abaixo (30 °C) do valor padronizado (60 °C), e mantendo todas as restantes condições nos valores standard: 60 minutos, 15 rpm, pH 4,8, RB: 50/1 usando a concentração de 4% spf (sobre o peso de fibra) de L-cisteína.

#### **3.4.1.2 Influência do pH**

A influência do pH do banho de incubação, sobre o processo de funcionalização, foi testada de forma análoga à descrita para o estudo do efeito da temperatura: todos os parâmetros foram mantidos nas condições standard, à excepção do pH da solução de incubação, que se fez variar de 2,8, 4,8 e 7,8 para se complementar o estudo em condições de acidez e basicidade que, forçosamente e como referido anteriormente no capítulo II, influenciam e condicionam a ionização dos grupos amino, carboxílico e tiol, responsáveis pela possível ligação do aminoácido L-cisteína à lã, e pela disponibilidade do grupo tiol na forma livre, forma reduzida, que julgamos fundamental para conferir a pretendida bioactividade.

### 3.4.1.3 Influência da concentração de L-cisteína

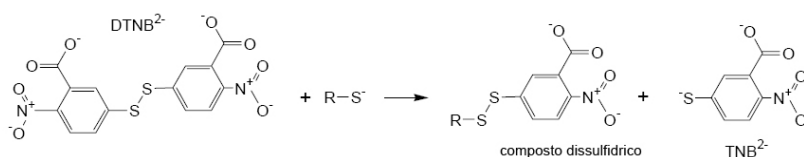
Neste ponto, procedeu-se à análise da influência de diferentes percentagens de L-cistena, no método de funcionalização. Para tal, foram testadas percentagens de 1,4,8 e 12% de L-cisteína sobre o peso de fibra da lã, mantendo todas as outras condições nos valores standard.

## 3.5—Ensaio de controlo

### 3.5.1 Determinação dos grupos tiol livres: Ensaio do reagente de Ellman

O ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoico), também conhecido como DTNB, é um corante que emite uma coloração amarela quando reage com grupos sulfidrilo livres, presentes em solução aquosa. Dessa forma, o reagente de Ellman é muito útil como ensaio para a determinação e quantificação desses mesmos grupos, devido à sua especificidade de reacção para grupos -SH (Protocolo Ellman's Reagent).

O DTNB reage com os grupos sulfidrilo livres, dando origem a duas moléculas: um composto dissulfídrico e a espécie corada, o ácido 2-nitro-5-thiobenzoico, ou TNB, como mostra a figura.3.2 (Protocolo Ellman's Reagent).



**Figura 3.2:** Reacção com reagente de Ellman (adaptado de Protocolo Ellman's reagent)

Os grupos sulfidrilícos podem ser estimados por comparação com uma curva padrão, formada por concentrações conhecidas de um composto que contenha o grupo sulfidrilo, como por exemplo a L-cisteína. No entanto, o procedimento do ensaio (Protocolo Ellman's Reagent) é limitado para soluções aquosas, por isso, houve necessidade de fazer ligeiras

adaptações ao método, de forma a ser possível a sua aplicação directa num meio sólido, como as amostras de lã, descritas a seguir no ponto 3.5.1.1.

Com este ensaio pretende-se avaliar, qualitativamente, a porção L-cisteína que se fixa na lã, aquando da funcionalização. Para isso, efectuou-se a análise dos grupos tiol livres, sobre os tecidos, através da medida da reflectância das diferentes amostras e traduzida pela relação K/S (relação de Kubelka-Munck). Uma coloração amarela mais intensa revela uma maior presença de grupos tiol livres, ligados às fibras.

Predefiniu-se uma proporção de 0,2g de corante por cada 60mL de solução fosfato. Procedeu-se à dissolução do corante, no volume de incubação, antes definido, de uma solução de fosfato de sódio de concentração 0,02M, preparada antecipadamente. De seguida, acertou-se o pH da solução corada, até um valor de 7,1, com ácido clorídrico 1M. O processo consistiu na incubação das amostras tratadas e respectivos controlos (brancos), usando as seguintes condições: razão de banho de 1/60, temperatura de incubação de 60°C, durante 45 minutos e com uma agitação constante de 15rpm.

No final da incubação, as amostras foram lavadas varias vezes em água destilada, para retirar o excesso de corante e colocadas na estufa a 30 °C durante 4 horas, para posterior análise das mesmas no espectrofotómetro de reflectância.

### **3.5.2 Ensaio de controlo de qualidade das fibras de lã**

Para avaliar a possível degradação causada no material têxtil, aquando da aplicação de novos tratamentos, realizaram-se vários ensaios de controlo de qualidade, nomeadamente: determinação de resistência à rotura, e, para avaliar se o tratamento influencia negativamente a qualidade de um tingimento posterior, procedeu-se também ao ensaio de tingimento com um corante ácido, vulgarmente utilizado no tingimento da lã.

#### **3.5.2.1 Ensaio de resistência à rotura**

Para detectar alterações ao nível da resistência mecânica, fizeram-se ensaios de resistência à rotura em todas as amostras, com e sem tratamento, para posterior comparação. Os ensaios foram realizados no Dinamómetro, de acordo com a Norma, NP EN ISO 2062. As amostras são cortadas em tiras de 50cmx5cm e os fios são retirados e colocados, um a um, entre as pinças do dinamómetro. Aplica-se uma pré-tensão definida e

inicia-se a medição até à rotura. Os resultados e respectivo tratamento estatístico são registados automaticamente no software do equipamento.

### **3.5.2.2 Avaliação da qualidade do tingimento com corantes ácidos**

Sobre todas as amostras, realizou-se um tingimento com um corante ácido (C.I. amarelo ácido 230, nome genérico do *color index*), pois são os mais indicados para aplicação em fibras de lã. A metodologia do tingimento é descrita nas seguintes alíneas.

- Tingimento com corante C.I. amarelo ácido 230

a) Banho de tingimento:

- RB 50:1;
- 1 % Corante (spf);
- 1,5g/L de sulfato de sódio anidro;
- 0.5% (spf) de avolan S (igualizador)

b) Tingimento: 98 °C, 60 minutos, agitação 15 rpm

No final do tingimento, procedeu-se ao enxaguamento e ensaboamento das amostras, de forma a retirar o corante não ligado à fibra.

### **3.5.3 Leituras espectrofotométricas**

#### **3.5.3.1 Leituras espectrofotométricas das amostras submetidas ao ensaio do reagente de Ellman**

Efectuaram-se as respectivas leituras espectrofotométricas no espectrofotómetro Spectraflash SF300 da Datacolor, nas seguintes condições: LAV/Spec. Incl., d/8, D65/10°.

Estas leituras foram realizadas para determinação das diferenças de reflectância (R) observáveis, relativas às amostras tratadas com o reagente de Ellman, e previamente funcionalizadas com a L-cisteína. Para comparação, foram, igualmente, feitas as leituras sobre os respectivos controlos.

Este aparelho mede a reflectância (R) da amostra em vários comprimentos de onda na zona do visível (400 -700 nm). A reflectância pode ser relacionada com a concentração, se utilizarmos a fórmula de Kubelka-Munck:

Equação 3.1

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

Onde R é a reflectância; K é o coeficiente de absorção do meio; S é o coeficiente de difusão do meio pois:

Equação 3.2

$$\frac{K}{S} = \alpha C$$

Sendo C a concentração de corante na fibra e  $\alpha$  uma constante (Shah e Gandhi, 1990; Völz, 1995).

O espectrofotómetro foi programado para fazer leituras no comprimento de onda, de 412nm, o qual corresponde à zona de máxima absorvância do corante utilizado, o reagente de Ellman.

### **3.5.3.2 Leituras espectrofotométricas das amostras tingidas com o corante ácido**

Seguidamente ao processo de tingimento de todas as amostras com o corante C.I. amarelo ácido 230, procedeu-se às respectivas leituras espectrofotométricas, no espectrofotómetro, já utilizado e descrito no ponto 3.5.3.1.

Estas leituras espectrofotométricas, foram direccionadas para a determinação das diferenças de intensidade de cor ( $\Delta L$ ) referentes à amostra tingida sem tratamento, a qual será o padrão, e das diferenças de cor dentro de cada amostra ( $\Delta E$ ) (CIELab).

O sistema de cor CIELab baseia-se nas seguintes coordenadas de cor (Billmeyer e Saltzman, 1981; Wyszeck e Stiles, 1982):

L\*— luminosidade/ intensidade de cor

L\*— luminosidade

a\*— eixo verde/ vermelho

ou

a\*— cromaticidade

b\*— eixo azul/ amarelo

b\*— tonalidade

Assim,  $\Delta L$  será a diferença de intensidade entre a amostra e o padrão ( $\Delta L = L^*_{amostra} - L^*_{padr\tilde{a}o}$ ), e apresenta um valor positivo quando a amostra está mais clara do que o padrão, ou negativo quando a amostra está mais escura em relação ao padrão (Billmeyer e Saltzman, 1981; Wyszeck e Stiles, 1982).

O  $\Delta E$  é a diferença total de cor e tem em conta o  $\Delta L$ , o  $\Delta a$  (diferença relativa ao verde/vermelho) e o  $\Delta b$  (diferença relativa ao azul/ amarelo) entre duas amostras ou, neste caso, entre as duas zonas diferentes da mesma amostra (Billmeyer e Saltzman, 1981; Wyszeck e Stiles, 1982).

Equação 3.3

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta a)^2 + (\Delta b)^2 + (\Delta L)^2}$$

Quando o  $\Delta E$  representa a diferença de cor entre dois pontos diferentes dentro da mesma amostra, permite avaliar a igualização do tingimento, isto é, a sua qualidade.

### 3.5.4 Testes anti-bacterianos

A avaliação da actividade anti-bacteriana das amostras funcionalizadas, foi realizada de acordo com a norma japonesa, *Industrial Standard JIS L 1902-2002*, específica para análise de amostras têxteis.

Foram praticados dois modelos de análise, descritos na norma: um qualitativo e outro quantitativo, com aplicação, sobre cada uma das estirpes seleccionadas para análise. Dessa selecção, incluem-se as estirpes *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva) e *Klebsiella pneumoniae* (Gram-negativa), pertencentes a filos distintos, Firmicutes e proteobactérias, respectivamente, pois são dos microrganismos patogénicos mais comuns em infecções hospitalares, e representativas das duas principais classes de bactérias.

Para cada teste, está estipulado um tamanho e formato que a amostra em estudo deverá apresentar. As preparações específicas das amostras, para cada teste, encontram-se descritas nos itens seguintes, relativos a cada ensaio.

Estes ensaios foram gentilmente realizados na Universidade do Minho, sob a coordenação da Prof. Mariana Henriques.

#### **3.5.4.1 Teste qualitativo: método do halo**

Este ensaio baseia-se na determinação qualitativa, pelo princípio da difusão, da actividade anti-bacteriana de um têxtil, a partir do desenvolvimento de um halo circundante à amostra têxtil. A existência do halo, após incubação, marca a presença de actividade anti-bacteriana, por parte da amostra têxtil, e o seu diâmetro de inibição pode ser quantificado a partir da seguinte fórmula:

Equação 3.4

$$W = \frac{T - D}{2}$$

Onde  $W$  é o diâmetro do halo de inibição,  $T$  e  $D$  o diâmetro total da amostra e zona de inibição em mm, e largura da amostra em mm, respectivamente. É de salientar, no entanto, que não é obrigatória a existência de halo, para descrever a actividade anti-bacteriana de um têxtil.

Para a realização deste ensaio, foram necessárias 6 amostras, três das quais funcionalizadas, sendo todas elas previamente preparadas e autoclavadas.

Preparou-se o respectivo inoculo, do qual foi, posteriormente, retirado 1mL e colocado numa caixa de Petri, devidamente esterilizada. Adicionou-se 15 mL de agar-A, também ele previamente preparado, à caixa de Petri, fazendo, em simultâneo, suaves movimentos circulares com a caixa sobre a bancada, de forma a homogeneizar. Deixou-se à temperatura ambiente para solidificar a cultura bacteriana.

O passo seguinte consistiu na aplicação das amostras têxteis, com a ajuda de uma pinça devidamente desinfectada, no centro das respectivas caixas de Petri. As placas foram colocadas na estufa, invertidas, onde ficaram a incubar a uma temperatura de 37 °C por um período de tempo de 24 a 48h.

Terminado o tempo de incubação, procedeu-se à análise dos resultados.

### 3.5.4.2 Teste quantitativo

Este ensaio assenta na determinação quantitativa, pelo princípio de contacto íntimo com uma suspensão de células, do valor da actividade bacteriostática e bactericida de uma amostra têxtil, de acordo com as fórmulas:

Equação 3.5 e 3.6

**Valor de actividade bacteriostática**

$$S = Mb - Mc$$

**Valor de actividade bactericida**

$$L = Ma - Mc$$

Onde:

- Ma: é a média do logaritmo do número de bactérias vivas, de três amostras, após inoculação do inoculo num tecido normal;
- Mb: é a média do logaritmo do número de bactérias vivas, de três amostras, após incubação de 18 horas num tecido normal;
- Mc: é a média do logaritmo do número de bactérias vivas, de três amostras, após incubação de 18 horas numa amostra tratada com o agente antibacteriano.

O número de bactérias vivas é obtido a partir da medição da concentração de bactérias imediatamente após preparação do inoculo, de acordo com a seguinte fórmula:

Equação 3.7

$$M = P \times 20$$

Onde:

- M: é o número de bactérias vivas (células)
- P: a concentração de bactérias imediatamente após preparação do inoculo (células/mL)
- 20: volume de salino fisiológico por abanão (mL)

Relativamente a este ensaio, foram necessárias nove amostras: seis de controlo e três com o tratamento à base de L-cisteína. Todas elas, pesavam aproximadamente 0,4g e tinham 18mm de lado, parâmetros prescritos pela norma.

As amostras foram colocadas em tubos separados e levados a autoclavar, assim como as respectivas tampas dos tubos. Após autoclavar, taparam-se bem os tubos onde permaneceram a secar durante 60 horas.

Pipetou-se 0,2 mL do inoculo, preparado de acordo com o protocolo descrito na norma e suspenso numa solução diluída de caldo nutriente, e inoculou-se em vários pontos de cada amostra. Processo repetido para todas as amostras. Seguidamente, deixaram-se a incubar os tubos que contêm as amostras tratadas, e apenas três dos seis que contêm as amostras não tratadas, a uma temperatura de  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  por um período  $18 \pm 1$  horas.

Relativamente aos três tubos com as amostras não tratadas, que não foram a incubar, foi-lhes adicionado 20mL de um soro fisiológico, antecipadamente preparado, seguida de agitação. A agitação permite separar as bactérias da amostra têxtil e pode ser feita manualmente, agitando num raio de 30cm, ou vortexando, cinco vezes durante 15 segundos.

Este passo foi analogamente executado para os tubos que foram a incubar, após finalizado o respectivo período de incubação. Findo este passo, procedeu-se à análise dos resultados obtidos.

## 3.6—Resultados e discussão

Neste ponto, são apresentados os resultados dos ensaios prévios, da funcionalização e dos ensaios de controlo, que são a base para a validação do método utilizado na funcionalização do material, e que, conseqüentemente, conduziram ao registo de uma patente nacional.

### 3.6.1 Concentração mínima inibitória da L-cisteína

Relativamente aos ensaios para a detecção da concentração mínima inibitória da L-cisteína, esta, apenas foi verificada, na segunda série de ensaios.

Na primeira série, observou-se crescimento em quase todos os tubos, sendo que, em alguns destes, a visualização era dificultada pela presença de um precipitado no fundo do tubo, acompanhado de turvação. Para esses casos, procedeu-se à detecção do MLC, concentração mínima letal, onde se verificou e concluiu existir crescimento do inoculo.

Quanto à segunda série de ensaios, verificou-se uma inibição de crescimento bacteriano nas concentrações intervaladas de  $2,4 \times 10^{-2}$  g/mL a  $1,2 \times 10^{-2}$  g/mL e  $2,4 \times 10^{-2}$  g/mL a  $3,0 \times 10^{-3}$

g/mL, para as estirpes *S. aureus* e *S. epidermidis*, respectivamente. Em ambas as estirpes, para as concentrações de  $9,7 \times 10^{-2}$  g/mL e  $4,8 \times 10^{-2}$  g/mL, foi difícil examinar o efeito, devido à densa precipitação depositada no fundo do tubo. Recorreu-se, novamente, ao método do MLC, para confirmação do possível efeito anti-microbiano, porém, apesar de se verificar uma inibição de crescimento os resultados não foram conclusivos.

Contudo, após análise dos resultados obtidos estima-se que a concentração mínima inibitória da L-cisteína, se encontre dentro do intervalo de valores de  $1,2 \times 10^{-2}$ — $9,7 \times 10^{-2}$  g/mL e  $3,0 \times 10^{-3}$ — $9,7 \times 10^{-2}$  g/mL para *S. aureus* e *S. epidermidis*, respectivamente.

Convertendo estas concentrações para valores de percentagem (peso/ volume), estas equivalem a 1,2—9,7% (p/v) e 0,3—9,7% (p/v), respectivamente.

Comparando estas concentrações mínimas inibitórias, com as obtidas em trabalhos anteriores, relativamente a outros compostos anti-microbianos, conclui-se que estas concentrações são significativamente mais elevadas que as encontradas por outros autores [27, 28], 0,05-0,1% (p/v) em relação ao quitosano e  $5,3 \times 10^{-6}$  % (p/v) relativamente ao triclosano.

Dos resultados obtidos dos vários controlos, verifica-se que o controlo do meio não apresenta qualquer tipo de crescimento, o que indica que não está contaminado por outras estirpes; o tubo que contém o agente bioactivo ficou turvo, com formação de um precipitado no seu fundo mas sem crescimento bacteriano, não havendo, portanto, nenhum género de contaminação por parte do agente e o controlo positivo, onde se observa crescimento bacteriano, indicando desta forma a viabilidade das estirpes.

É, de salientar, que o precipitado depositado no fundo dos tubos, de concentração mais elevada, possa derivar de alguma reacção química entre os constituintes do meio e o agente bioactivo, não sendo, contudo, concludente. A hipótese reside na possibilidade de oxidação do aminoácido com a conseqüente formação de ligações cruzadas do tipo dissulfureto, conduzindo à formação de cistina, que precipita em soluções aquosas, em coexistência com alguma L-cisteína.

A tabela 3.5 apresenta, pormenorizadamente, os resultados obtidos da segunda serie de ensaios.

**Tabela 3.5:** resultados obtidos na segunda série de ensaios, para a detecção concentração mínima inibitória da L-cisteína

Estirpes	Diluições												
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096
<b>S.aureus</b>	a b	a b	-	-	+	+ b	+ b	+ b	+ b	+ b	+ b	+ b	+ b
<b>S.epidermidis</b>	a b	a b	-	-	-	-	+ b	+ b	+ b	+ b	+ b	+ b	+ b

**Legenda:** + crescimento de inoculo; - sem crescimento de inoculo; a—não foi possível observar crescimento devido a densa precipitação presente no fundo do tubo. b—turbacão.

### 3.6.2 Funcionalização da lã e absorção da L-cisteína: resultados das leituras espectrofotométricas das amostras tratadas

As tabelas 3.6-3.9, abaixo indicadas, apresentam os resultados espectrofotométricos obtidos após a incubação com o reagente de Ellman, das amostras previamente funcionalizadas e dos respectivos brancos.

De uma forma geral, observa-se que a reflectância de todas as amostras tratadas, comparativamente com os respectivos brancos, diminui, contrariamente aos valores de K/S, que aumentam.

Com base nestes resultados, e segundo a teoria Kubelka-Munck e a equação 3.1, que relaciona a reflectância com a concentração, é possível prever, qualitativamente, a concentração de L-cisteína presente nas amostras tratadas.

Assim sendo, com base na proporcionalidade directa que existe entre o K/S e a concentração, e de acordo com os valores obtidos de K/S para as amostras tratadas serem mais elevados relativamente ao respectivo branco, é previsível que todas as amostras, em relação ao branco, possuam um maior número de grupos tiol na sua forma livre.

Nos próximos parágrafos, serão analisados, em detalhe, todos os parâmetros e variações dos mesmos, que possam influenciar significativamente a funcionalização do material.

### 3.6.2.1 Influência da temperatura

Com base numa análise mais detalhada à tabela 3.6, constata-se que é na temperatura de 90 °C, que se observa uma maior diferença no valor de K/S, relativo à diferença do branco com a respectiva amostra tratada, comparativamente com as restantes temperaturas em análise. Dessa forma, estima-se que para temperaturas de incubação mais elevadas, a percentagem de incorporação e absorção de L-cisteína seja, também, mais elevada.

**Tabela 3.6:** Resultados espectrofotométricos dos ensaios a diferentes temperaturas

Ensaio de Ellman's reagent	30°C	60°C	90°C
<b>Reflectâncias (%)</b>			
• Controlo/Branco	9,85	10,48	9,65
• Amostras tratadas	9,11	8,99	7,75
• Diferença (Branco-Amostra)	0,74	1,49	1,9
<b>Valores de K/S</b>			
• Controlo/Branco	4,13	3,82	4,23
• Amostras tratadas	4,54	4,61	5,49
• Diferença (Branco-Amostra)	-0,41	-0,79	-1,26

**Nota:** todos os valores apresentam um coeficiente de de variação inferior a 0,05

### 3.6.2.2 Influência do pH

Relativamente à influência do pH no método de funcionalização, apesar da amostra tratada com um banho de incubação a pH 4,8, possuir um valor de K/S mais baixo, em relação às tratadas com banhos de incubação a pH 2,8 e 7,8, esta é a que revela uma maior discrepância de valor, relativamente ao branco correspondente.

Adoptando a mesma linha de raciocínio, das conclusões anteriores, deduz-se que é com banhos de incubação aferidos a pH 4,8, que se alcança uma taxa de absorção de L-cisteína, pelas fibras de lã, mais elevada (ver tabela 3.7).

**Tabela 3.7:** Resultados espectrofotométricos dos ensaios a diferentes pH

Ensaio de Ellman's reagent	pH 2,8	pH 4,8	pH 7,8
<b>Reflectâncias (%)</b>			
• Controlo/Branco	9,36	10,48	9,01
• Amostras tratadas	8,36	8,99	8,09
• Diferença (Branco-Amostra)	1,00	1,49	0,92
<b>Valores de K/S</b>			
• Controlo/Branco	4,39	3,82	4,59
• Amostras tratadas	5,02	4,61	5,22
• Diferença (Branco-Amostra)	-0,63	-0,79	-0,63

**Nota:** todos os valores apresentam um coeficiente de de variação inferior a 0,05

### 3.6.2.3 Influência da concentração de L-cisteína presente em solução

Em relação às amostras tratadas com banhos de incubação contendo diferentes percentagens de L-cisteína, verifica-se que em todas elas o valor de K/S, comparativamente com o respectivo branco, é mais elevado, como se pode ver nas tabelas 3.8 e 3.9.

Verifica-se, também, que todos os valores de K/S aumentam, sempre, de forma gradual, desde o mais baixo, que corresponde à amostra funcionalizada apenas com 1% de L-cisteína, até ao mais elevado, pertencente à amostra funcionalizada com a maior percentagem de L-cisteína.

Assim sendo, conclui-se que é possível tratar a lã com grandes quantidades de L-cisteína. No entanto, não é possível apontar, com exactidão, uma percentagem máxima de fixação, visto que, de acordo com os resultados, não se verificou um valor de K/S máximo, que permanecesse constante nos ensaios seguintes. De qualquer forma, a variação usada para avaliação da concentração, já contemplou uma “sobredosagem” sob o ponto de vista tecnológico e económico, pelo que, não será expectável o tratamento com concentrações superiores.

**Tabela 3.8:** Resultados espectrofotométricos dos ensaios a diferentes percentagens de L-cisteína

Ensaio de Ellman's reagent	% L-cisteína (spf)			
	1%	4%	8%	12%
<b>Reflectâncias (%)</b>				
• Controlo/Branco	10,48	10,48	10,48	10,48
• Amostras tratadas	9,49	8,99	8,38	8,26
• Diferença (Branco-Amostra)	0,99	1,49	2,10	2,22
<b>Valores de K/S</b>				
• Controlo/Branco	3,82	3,82	3,82	3,82
• Amostras tratadas	4,32	4,61	5,01	5,10
• Diferença (Branco-Amostra)	-0,5	-0,79	-1,19	-1,28

**Nota:** todos os valores apresentam um coeficiente de de variação inferior a 0,05

**Tabela 3.9:** Resultados espectrofotométricos dos ensaios a diferentes percentagens de L-cisteína

Ensaio de Ellman's reagent	% L-cisteína (spf)			
	25%)	50%	75%	100%
<b>Reflectâncias (%)</b>				
• Controlo/Branco	8,62	8,62	8,62	8,62
• Amostras tratadas	5,89	5,57	5,35	5,21
• Diferença (Branco-Amostra)	2,73	3,05	3,27	3,41
<b>Valores de K/S</b>				
• Controlo/Branco	4,84	4,84	4,84	4,84
• Amostras tratadas	7,53	8,01	8,37	8,63
• Diferença (Branco-Amostra)	-2,69	-3,17	-3,53	-3,79

**Nota:** todos os valores apresentam um coeficiente de de variação inferior a 0,05

### 3.6.3 Resultados dos testes de controlo de qualidade

Na tabela 3.10, apresentam-se os resultados dos ensaios de tingimento com um corante aniónico, o C.I. amarelo ácido 230, e os resultados do ensaio de resistência à rotura. Verifica-se que não existe alteração muito significativa na cor dos tecidos tratados ( $\Delta E < 1$ ), o que permite a aplicação do tratamento anti-microbiano com L-cisteína, numa etapa/processo prévio ao tingimento, sem prejuízo das propriedades tintoriais, conforme demonstram os parâmetros CIELab. Por outro lado, a resistência à rotura dos fios retirados dos tecidos tratados com a L-Cisteína revela um decréscimo normal e aceitável, já que é inferior a uma perda de 10%, o que valida a aplicação sem que as propriedades mecânicas venham alteradas, negativamente, de forma significativa. Note-se que a ligeira redução da resistência à rotura é acompanhada por uma ligeira redução do alongamento na rotura, muito provavelmente, porque se poderá ter aumentado o número de ligações dissulfídricas ou dissulfureto, intermoleculares, diminuindo o “deslizamento” entre as cadeias macromoleculares

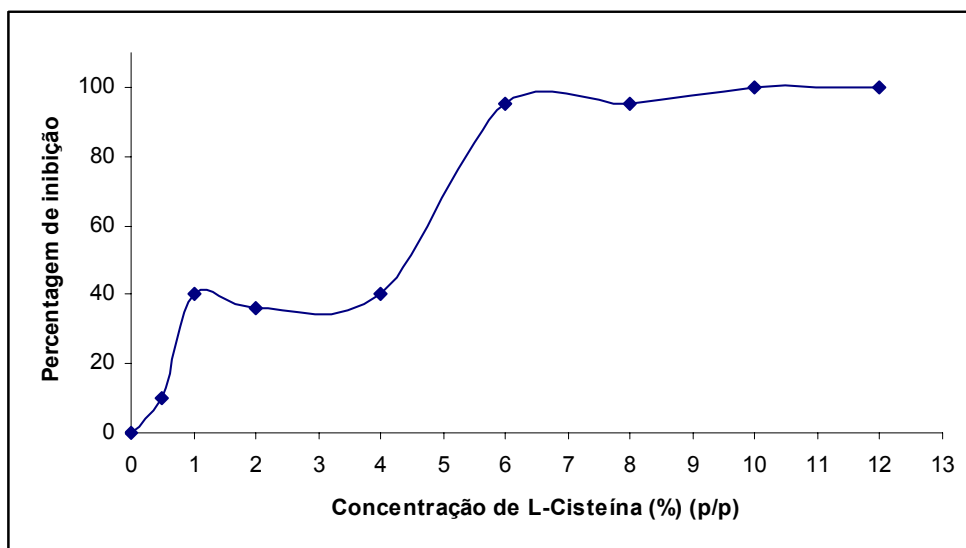
**Tabela 3.10:** Resultados obtidos, relativamente aos testes de controlo de qualidade: resistência à rotura e solidez dos tintos.

Ensaio	Controlo	L-Cisteína 1% spf	L-Cisteína 7% spf
<b>-Resistência dos fios</b> (Newton)	2,71±0,34	2,64±0,27	2,54±0,25
<b>-Alongamento (%)</b>	15,81±4,42	13,41±3,48	12,89±2,15
<b>-Solidez dos tintos com o corante ácido:</b>			
<b>alteração da cor</b>	4-5	4-5	4-5
-Parâmetros CIELab			
$\Delta E$	---	-0,790	-0,997
$\Delta L$	---	-0,774	-0,014
$\Delta C$	---	-0,074	-0,890
$\Delta H$	---	-0,137	-0,451

### 3.6.4 Resultados dos testes anti-bacterianos

A figura 3.3 apresenta a avaliação quantitativa da percentagem de inibição de crescimento bacteriano da bactéria Gram negativa, *Klebsiella pneumonia*, em função da concentração de L-Cisteína usada na funcionalização dos tecidos de lã.

Pela análise dos resultados, pode considerar-se que a partir de uma concentração de 1% (p/p) de L-cisteína, inclusive, já é observável uma inibição da actividade bacteriana em cerca de 40%, atingindo o seu pico máximo, isto é, a erradicação total de 100% de bactérias para concentrações que oscilam entre 6-8% (p/p), mantendo-se extinguíveis para concentrações superiores.



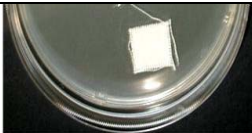

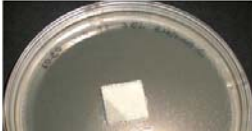



**Figura 3.3:** Resultado obtido do ensaio quantitativo, relativo à actividade bactericida sobre *Klebsiella pneumonia* (Gram negativa)

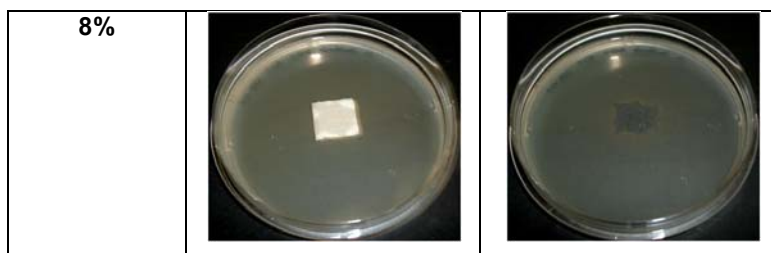
Por outro lado, a tabela 3.11, mostra as diferentes amostras funcionalizadas e as respectivas zonas de inibição de crescimento bacteriano; verificando que é possível ocorrer inibição mesmo para concentrações de cerca de 1% (p/p), resultando um efeito sem halo, o que revela que a funcionalização não tem efeito migratório. Esta observação poderá ser um indicador favorável para a funcionalização permanente da lã, com L-cisteína. De facto, grande parte dos agentes anti-microbianos são libertados e “perdidos” durante as lavagens sucessivas. São, normalmente, produtos que, neste tipo de análise anti-bacteriana, têm

migração, formando halo. Por outro lado, é provável que a libertação dos agentes bioactivos, pelos materiais têxteis, durante a utilização dos mesmos, possa causar uma maior probabilidade de se verificar irritabilidade ou mesmo cito-toxicidade. Assim, apesar de não existir a formação de halo, pode verificar-se inibição na zona coberta pelo têxtil, o que garante as suas propriedades anti-bacterianas.

A concentração mínima inibitória é de 0,02% (p/v). Esta concentração é mais baixa que a encontrada por outros autores (No *et al*, 2002) (Gao e Craston, 2008), 0,05-0,1% (p/v) em relação ao quitosano (polissacárido de custo semelhante ao da L-Cisteína), o que revela uma menor exigência na quantidade a usar, traduzindo-se num benefício económico. Por sua vez, é maior que a determinada relativamente aos compostos de amónio quaternários 0,001—0,01% (p/v), ao PHMB, 0,0005—0,001 % (p/v) e ao triclosano, que é inferior a 0,001% (p/v) (Jones *et al*, 2000) (Cazzaniga *et al*, 2002) (Russel, 2004) (Gao e Craston, 2008)

**Tabela 3.11:** Resultados obtidos da análise qualitativa relativa à inibição microbiana da bacteria Gram positiva, *Staphylococcus aureus*.

	Amostra	Zona de inibição
Controlo		
1%		
6%		



### 3.7— Conclusão

Com base nos resultados obtidos nos ensaios realizados neste capítulo, conclui-se, que o método adoptado para funcionalização do material têxtil é válido e adequado para a obtenção de um novo acabamento anti-bacteriano, como pretendido, através da incorporação de L-cisteína como potencial agente bacteriostático/bactericida, em substratos têxteis de lã. A sua aplicação não aparenta originar qualquer alteração nas propriedades das fibras que levem a uma diminuição da sua qualidade. De acordo com os dados obtidos nos ensaios de controlo de qualidade, conferiu-se que, apesar de se ter verificado uma ligeira alteração, tanto ao nível da cor dos tecidos tratados, como da sua resistência à rotura, estas não são significativamente relevantes, sendo até aceites dentro dos padrões de qualidade, o que valida a aplicação do tratamento sem que estas propriedades venham alteradas negativamente de forma significativa.

Também de acordo com os dados obtidos dos ensaios anti-bacterianos, verifica-se que o acabamento anti-bacteriano, aplicado às fibras de lã, apresenta ser viável, tendo-se produzido efeito inibitório, tanto em bactérias Gram-positivas como negativas, sem no entanto haver formação de halo, o que leva a crer que o aminoácido, após incorporação na fibra, não possui um carácter migratório. Assim sendo, poderá ser uma mais-valia, pois possibilita um acabamento perduravelmente mais eficaz e, eventualmente, uma menor libertação nos efluentes, diminuindo o risco de potenciar o aparecimento de bactérias multirresistentes, e durante o uso, diminuindo o risco de cito-toxicidade.

Da mesma forma, é de prever que a L-cisteína, no seu estado livre, possua, pelo menos, efeito bacteriostático, pois apesar de cientificamente comprovado e bem documentado que resíduos de L-cisteína, na forma associada com outros compostos, exibem actividade bacteriostática e bactericida, o mesmo não é muito esclarecedor quanto à sua forma livre, devido à escassa informação bibliográfica.

A concentração mínima inibitória exibida na forma livre, comparativamente com a apresentada associada às fibras têxteis, é significativamente mais elevada. Tal discrepância poderá ser justificada com a possível reactividade dos grupos sulfídricos para o desenvolvimento de reacções de oxidação-redução, perturbando, dessa forma, a bioactividade do aminoácido em causa.

Todos estes resultados ostentam um carácter inovador, pois até então, e de acordo com as pesquisas exaustivas realizadas, este produto natural não foi alvo de estudo como potencial agente anti-bacteriano, quer na sua forma livre quer aplicado a quaisquer materiais, incluindo os têxteis, razão pela qual, esta nova abordagem foi motivo do registo de uma patente nacional.

Deste modo, perspectiva-se, aqui, uma grande inovação em termos científicos e tecnológicos com possibilidades inúmeras para outras aplicações. Contudo, e atendendo ao seu valor económico, torna-se necessário realizar uma optimização do método de funcionalização, de forma a garantir a aplicação com fortes probabilidades de sucesso industrial. Essa optimização será realizada no capítulo seguinte.

## Capítulo IV

---

### Optimização do processo de funcionalização anti-bacteriana da lã, com L-cisteína

## 4.1—Estrutura e metodologia do trabalho experimental

Com base nos resultados obtidos e examinados no capítulo anterior, procedeu-se a um estudo mais detalhado dos factores que aparentam ter maior influência no acabamento pretendido, de forma a obtê-lo com o mínimo consumo possível de L-cisteína e gasto energético, sem no entanto, afectar o seu desempenho. Para a optimização do processo, recorreu-se à Metodologia de Superfície de Resposta (Box Hunter, 1978; Montgomery, 1991), através de um desenho experimental do tipo central composto (*central composite design*), fazendo variar os factores mais importantes, seleccionados de acordo com os resultados obtidos no capítulo anterior e, incluindo, um quarto factor para análise: o tempo de tratamento. Assim, admitiram-se 4 factores ou variáveis independentes para a análise, sendo eles, o pH do banho de incubação, a concentração de L-cisteína, o tempo e temperatura de incubação, com cinco níveis de variações, cada um, num total de 30 ensaios experimentais, replicados. Como respostas (variáveis dependentes) seleccionaram-se a percentagem de esgotamento e o K/S.

Seguidamente, foi determinada, qualitativa e quantitativamente, a percentagem de L-cisteína absorvida nas fibras, com recurso ao teste do reagente de Ellman.

A acção bacteriostática/bactericida, foi avaliada, pelo mesmo método utilizado nos ensaios do capítulo anterior, somente nos pontos óptimos, devido à morosidade e complexidade destes testes. Desta forma, a análise anti-bacteriana foi efectuada sobre as amostras em que o grupo bioactivo (grupo tiol) imobilizado nas fibras, se encontra mais disponível e, por essa razão, mais activo.

Recorreu-se, mais uma vez, a testes como, solidez à lavagem e testes de controlo de qualidade, nomeadamente o ensaio de resistência à abrasão, para avaliação da capacidade de fixação do composto sobre a fibra e qualidade da mesma após funcionalização, respectivamente.

Por fim, avaliou-se o efeito cito-tóxico para garantir que este novo processo e as condições encontradas para o ponto óptimo são adequadas e seguras para o potencial utilizador.

## 4.2—Materiais e métodos

### 4.2.1 Caracterização do material

O material utilizado foi o mesmo que o descrito e caracterizado no ponto 3.2.1, do capítulo III, e que consiste num tecido 100% lã, na sua fase final de acabamento, tendo sido usadas amostras com, aproximadamente, 1g para cada provete.

### 4.2.2 Produtos auxiliares químicos

Os reagentes e auxiliares químicos utilizados foram os mesmos que os descritos e caracterizados no ponto 3.2.2.

### 4.2.3 Equipamento

O equipamento utilizado foi o mesmo que o enumerado e caracterizado no ponto 3.2.3, pertencente ao capítulo três, com a introdução de apenas dois novos aparelhos, indicados na tabela 4.1.

**Tabela 4.1:** Caracterização dos equipamentos

Designação	Marca	Modelo
Martindale	Mark III	B55690
Linitest	Ahiba	-

## 4.3—Optimização do processo anti-bacteriano

### 4.3.1 Delineamento do desenho experimental e otimização do processo

O desenho experimental utilizado é do tipo *Central Composite Design* (CCD), já que permite, para além de pontos factoriais, adicionar pontos centrais e axiais (estrela), necessários à construção de um modelo giratório. Trata-se de um desenho mais adequado quando se pretende variar 3 ou mais factores a 3 ou mais níveis (n), já que diminui o número de experiências em relação ao desenho factorial  $2^N$  e possibilita a análise em pontos axiais, de valores  $n \pm 1$  níveis, em variáveis codificadas, aumentando, desta forma, a variação de cada factor a estudar com menor número de experiências necessárias relativamente ao desenho factorial completo.

O desenho experimental foi elaborado a partir do software *Design-expert*, de forma a criar o maior número de combinações possíveis entre os vários valores dos diferentes parâmetros de análise. Na tabela 4.2 encontram-se os níveis correspondentes às variáveis estudadas enquanto na tabela 4.3 está representada a matriz utilizada com os factores na forma real.

**Tabela 4.2:** Níveis dos Factores (variáveis independentes) utilizados de acordo com o Desenho Experimental CCD.

Variáveis	Níveis				
	-2	-1	0	+1	+2
A: pH	2.8	3.8	4.8	5.8	6.8
B: temperatura (°C)	30	45	60	75	90
C: % L-cisteína (sfp)	1	3	5	7	9
D: tempo (min)	10	30	50	70	90

**Tabela 4.3:** Matriz dos ensaios para o Desenho Experimental CCD com as variáveis nas unidades reais.

Layout		pH	Temperatura (°C)	% L-cisteína (spf)	Tempo min
7	1	3.80	75.00	7.00	30.00
24	2	4.80	60.00	5.00	90.00
28	3	4.80	60.00	5.00	50.00
20	4	4.80	90.00	5.00	50.00
6	5	5.80	45.00	7.00	30.00
25	6	4.80	60.00	5.00	50.00
14	7	5.80	45.00	7.00	70.00
10	8	5.80	45.00	3.00	70.00
16	9	5.80	75.00	7.00	70.00
29	10	4.80	60.00	5.00	50.00
15	11	3.80	75.00	7.00	70.00
5	12	3.80	45.00	7.00	30.00
2	13	5.80	45.00	3.00	30.00
1	14	3.80	45.00	3.00	30.00
23	15	4.80	60.00	5.00	10.00
8	16	5.80	75.00	7.00	30.00
3	17	3.80	75.00	3.00	30.00
27	18	4.80	60.00	5.00	50.00
22	19	4.80	60.00	9.00	50.00
17	20	2.80	60.00	5.00	50.00
12	21	5.80	75.00	3.00	70.00
13	22	3.80	45.00	7.00	70.00
21	23	4.80	60.00	1.00	50.00
18	24	6.80	60.00	5.00	50.00
26	25	4.80	60.00	5.00	50.00
11	26	3.80	75.00	3.00	70.00
9	27	3.80	45.00	3.00	70.00
4	28	5.80	75.00	3.00	30.00
30	29	4.80	60.00	5.00	50.00
19	30	4.80	30.00	5.00	50.00

Parte da metodologia aplicada a esta nova sequência de incubações, é análoga à descrita no ponto 3.4.1. Foi, igualmente, utilizado como banho de incubação uma solução de tampão citrato, ajustada a diferentes pH, usando uma razão de banho de 1:50 e 15 rpm durante a incubação.

Todos os restantes parâmetros de análise foram testados de acordo com a combinação de variáveis atribuídas a cada parâmetro, definida pelo desenho experimental.

Todos os ensaios voltaram a ser realizados em duplicado, incluindo os respectivos brancos e os pontos centrais, numa sequência em dois blocos de experiências (block 1 e 2). Da mesma forma que nos ensaios realizados no capítulo anterior, no final de incubação procedeu-se ao enxaguamento e ensaboamento (para testar a solidez e permanência do efeito), seguido de novo enxaguamento com água destilada abundante.

#### **4.3.2 Determinação qualitativa dos grupos tiol livres no substrato têxtil**

Este ensaio foi realizado de acordo com o descrito no ponto 3.5.1, referente aos ensaios do capítulo III. De realçar que o valor de K/S é já o valor absoluto da diferença entre o branco e a respectiva amostra funcionalizada.

As leituras espectrofotométricas foram realizadas no espectrofotómetro Spectraflash SF300 da Datacolor e efectuadas pelo mesmo princípio que o enunciado no ponto 3.5.3.1.

#### **4.3.3 Determinação quantitativa dos grupos tiol livres na solução.**

Com este ensaio pretende-se avaliar a quantidade de L-cisteína que terá sido absorvida pela lã, aquando da funcionalização. Para isso, efectuou-se a análise dos grupos tiol livres, em solução, nas soluções de incubação, ao início (t=0 minutos) e no final (t=45 minutos), através da medida da transmitância das soluções.

Uma coloração mais intensa significa que existe uma maior quantidade de grupos tiol livres, em solução. A diferença entre a coloração inicial e a final, dar-nos-á indicação sobre a maior ou menor absorção do aminoácido, nas diferentes condições utilizadas para a funcionalização da lã, sendo traduzida pela percentagem de esgotamento, (%E).

Após a recolha das fracções dos banhos de incubação, antes e após o processo, e devidamente assinaladas, foram centrifugadas a 500 rpm, durante 3 minutos. Seguidamente, retirou-se 1mL de cada fracção, colocou-se em tubos de ensaio, fez-se uma diluição na proporção de 1/10, e levou-se ao vortex.

Em tubos previamente preparados com 50 $\mu$ L e 2.5mL de reagente de Ellman e solução fosfato de sódio, respectivamente, foram adicionadas aliquotas de 250 $\mu$ L de cada fracção diluída. Os tubos foram agitados e incubados à temperatura ambiente durante 15 minutos. Findo os 15 minutos de reacção, procedeu-se às leituras das absorvâncias relativas a cada fracção, pelo mesmo processo que o referido no ponto 4.3.3.1, descrito mais adiante.

O facto da lei de Lambert-Beer não ser válida para concentrações elevadas, pois deixa de haver uma proporcionalidade directa entre a absorvância e a concentração da solução, e até mesmo pelo facto das concentrações das fracções em análise, serem significativamente mais elevadas que o intervalo de concentrações verificado nas curvas de calibração, procedeu-se a uma diluição com 10 mL de água destilada em cada tubo, antes da leitura espectrofotométrica.

**Nota:** é de salientar que às fracções correspondentes ao banho de incubação a pH 2,8 não foram adicionados quaisquer volumes de diluição, por não se verificar necessário.

#### **4.3.3.1 Curvas de calibração**

A necessidade de preparação destas curvas prende-se com o facto da análise dos grupos tiol livres, em solução, ser dependente do pH, em virtude da reacção com o reagente de Ellman ser influenciada por este. Assim, prepararam-se 5 soluções de tampão citrato, de acordo com as indicações necessárias à obtenção de soluções com diferentes valores de pH a utilizar no desenho experimental.

Com base num protocolo já existente para a determinação de grupos sulfidrilos, (Protocolo Ellman's Reagent) e adequando alguns dos passos para este trabalho, procedeu-se à realização de 5 curvas de calibração, nos respectivos pH: 2,8; 3,8; 4,8; 5,8 e 6,8.

Seguidamente, prepararam-se várias soluções padrão de L-cisteína, de concentrações conhecidas, como mostra a tabela 4.4, abaixo indicada.

**Tabela 4.4:** Diferentes soluções padrão e respectivas concentrações finais (adaptada de Protocolo Ellman's Reagent)

Solução padrão	Volume de solução tampão	Quantidade de L-cisteína	Concentração final
<b>A</b>	100 mL	18,50mg	1,5mM
<b>B</b>	5 mL	25 mL da solução A	1,25mM
<b>C</b>	10 mL	20 mL da solução A	1,0mM
<b>D</b>	15 mL	15 mL da solução A	0,75mM
<b>E</b>	20 mL	10 mL da solução A	0,5mM
<b>F</b>	25 mL	5 mL da solução A	0,25mM
<b>G</b>	30 mL	0 mL	0,0mM (branco)

O passo seguinte consistiu em distribuir para cada tudo de ensaio, previamente preparado com 50  $\mu$ L de solução de Ellman e 2,5mL de solução fostato de sódio, 250  $\mu$ L de cada solução padrão. Agitou-se, e deixou-se a incubar à temperatura ambiente, durante 15 minutos, para no final diluir com 10 mL de água destilada e realizar nova agitação.

O mesmo procedimento foi repetido para as 5 soluções tampão. Por fim, foram realizadas as medições espectrofotométricas, e traçadas as respectivas curvas de concentração de L-cisteína vs absorvância. Para o efeito, terminado o tempo de reacção, entre o reagente de Ellman e os grupos sulfidrilos livres, presentes nas soluções padrão de L-cisteína, procedeu-se às respectivas leituras espectrofotométricas no espectrofotómetro UNICAM 300.

Após calibração do aparelho e fixando o comprimento de onda em função da substancia a determinar, que para este caso específico é de 412nm, procedeu-se à leitura das absorvâncias, para posterior aplicação da lei de Lambert-Beer, para cada solução padrão.

Conhecidas as absorvâncias de todas as soluções padrão de L-cisteína, assim como as respectivas concentrações, procede-se à execução, a partir da ferramenta de trabalho *Microsoft Office Excel*, das curvas de calibração respeitantes a cada solução de L-cisteína para os cinco valores de pH em análise.

Desta forma, será possível determinar concentrações de soluções de L-cisteína, resultantes do processo de incubação/funcionalização da lã, por aplicação da lei de Lambert-Beer.

#### **4.3.4 Ensaio de controlo de qualidade: ensaio da resistência à abrasão**

Para efectuar o controlo de qualidade da lã tratada, optou-se por realizar o ensaio de resistência à abrasão (de acordo com a Norma IWSTM 112-2000), não só por ser um método que nos dá uma informação sobre a eventual degradação das fibras, ainda que muito ligeira, como também pelo facto de permitir usar amostras mais pequenas, o que, sob o ponto de vista de consumo do reagente L-cisteína, nos permite economizar nos custos inerentes a um elevado número de experiências necessárias para proceder à optimização das condições óptimas de aplicação/funcionalização.

O método consiste em testar os tecidos tratados e não tratados, contra um tecido abrasivo e sob agitação circular, medindo-se em ciclos o número necessário até à rotura de dois fios.

#### **4.3.5 Ensaio da solidez à lavagem**

O efeito permanente da funcionalização bioactiva da lã foi atestado recorrendo a ensaios de lavagem, em particular, de solidez à lavagem. De facto, como referido no capítulo II, grande parte dos agentes anti-microbianos não resiste bem a lavagens posteriores. Desta forma, para que o novo processo resulte eficaz, entendeu-se ser condição fundamental, efectuar este procedimento antes da avaliação do efeito anti-bacteriano, de forma a garantir que a L-cisteína presente nas fibras se encontra ligada, quimicamente, e não apenas retida fisicamente nas fibras de lã. Garante-se, desta forma, a durabilidade do tratamento/funcionalização.

Este ensaio permite, normalmente, avaliar a solidez dos tintos dos têxteis à lavagem. No entanto, o recurso a este método estandardizado, ligeiramente adaptado para o caso em específico, garante que a L-cisteína se encontra ligada quimicamente às fibras de lã.

A realização deste ensaio foi feita de acordo com a Norma NP EN ISO 105-C06. O ensaio consiste num ensaboamento intermédio, seguido de enxaguamento, para eliminar a L-cisteína não ligada à fibra.

Para o efeito, as amostras têxteis funcionalizadas em cada um dos pontos experimentais são colocadas num recipiente, com uma solução de sabão previamente preparada e aquecida à temperatura de  $40 \pm 2^\circ\text{C}$ , por um período de tempo de 30 minutos, debaixo de constante agitação mecânica.

Concluído o tempo de lavagem, procedeu-se ao enxaguamento das amostras com água destilada com imediata secagem das mesmas na estufa a 30 °C, até obtenção de massa constante.

Após este tratamento, o material tratado encontra-se em condições de ser avaliado quantos às propriedades bioactivas e à qualidade da lã.

#### **4.3.6 Testes anti-bacterianos**

Por questões de complexidade dos ensaios de determinação das propriedades anti-bacterianas, sobretudo no que respeita às delimitações de tempo, a bioactividade dos tecidos, nesta etapa, foi analisada apenas nos pontos óptimos.

À semelhança da utilização da norma no ponto 3.5.4, para avaliação da capacidade anti-bacteriana, a mesma foi aplicada neste item, no entanto, apenas o teste quantitativo foi seleccionado e executado na sua íntegra, para validação da actividade antibacteriana sobre as estirpes *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Klebsiella pneumonia* (ATCC 11296). Esta selecção é fundamentada pelo facto do teste qualitativo não fornecer valores exactos, como se pode observar nos resultados obtidos da tabela 3.11 referente ao ensaio realizado no ponto 3.5.4.1, para se comparar com alguma precisão entre as várias condições distinguidas, e porque a inibição bacteriana da lã funcionalizada com L-cisteína, já terá sido validada no capítulo anterior.

#### **4.3.7 Testes cito-tóxicos**

Por razões relacionadas quer com a disponibilidade de tempo, quer dos meios disponíveis para a realização deste trabalho, recorreu-se à contratação da análise cito-tóxica do material funcionalizado, ao reconhecido laboratório internacional Hohenstein Institute. Por outro lado, o recurso a este laboratório permitiu também a emissão de um certificado, reconhecido nacional e internacionalmente, fundamental para a possibilidade de comercialização deste novo processo. Assim, não será descrita a técnica que poderá, no entanto, ser seguida ou analisada através da norma EN ISO 10993-5.

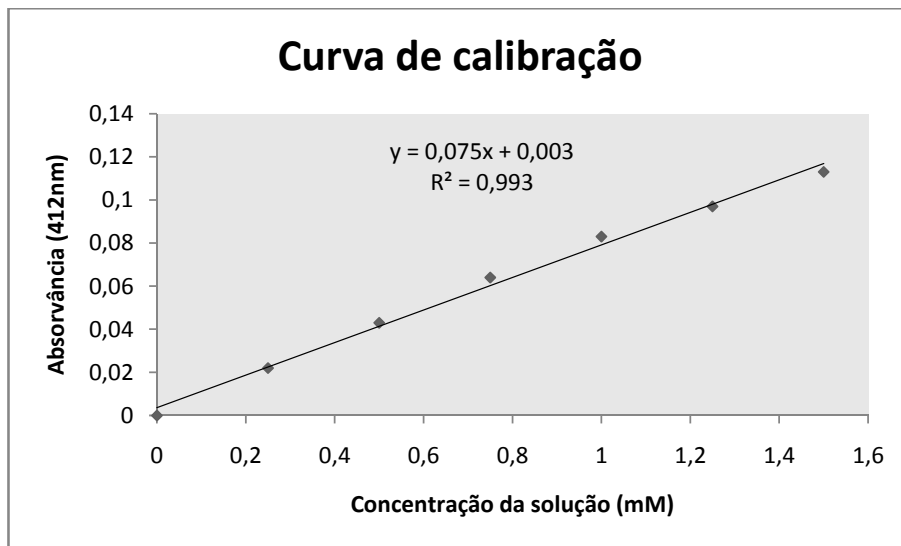
## 4.4—Resultados e Discussão

Com base na forma de apresentação/interpretação dos resultados, utilizada no capítulo três, a mesma foi aplicada para apresentar e interpretar os resultados relativos a este capítulo, otimização do processo da funcionalização anti-bacteriana da lã com L-cisteína.

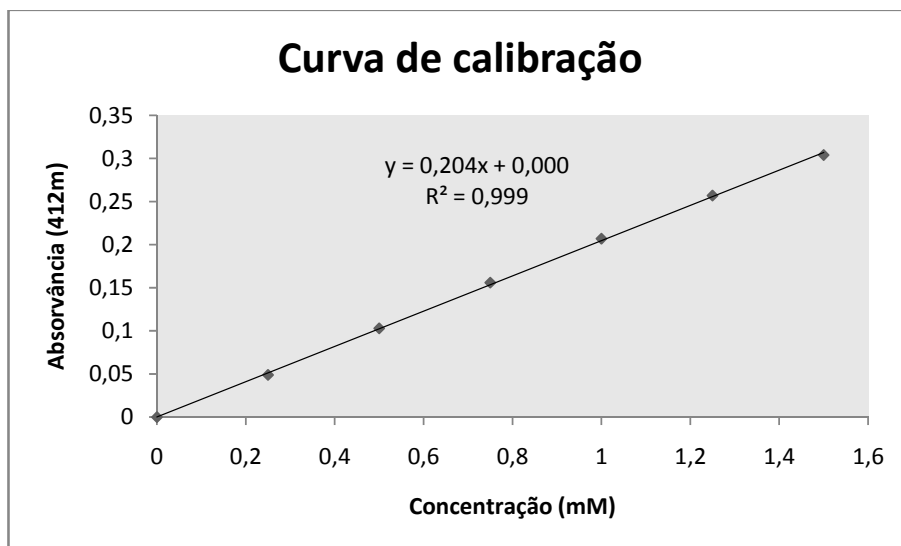
O recurso à versão 7.1 do “Design-Expert” da *StateEase Inc.*, permite, de acordo com alguns dados estatísticos obtidos, avaliar o grau de compatibilidade entre o modelo utilizado e a resposta associada, assim como elaborar uma análise gráfica das respostas, bem detalhada e fundamentada, sobre uma base estatística sólida. Só assim, fazendo uma análise de variância e recorrendo a uma otimização baseada em ferramentas estatísticas, se poderá concluir sobre as condições óptimas a utilizar neste novo processo.

### 4.4.1 Curvas de calibração

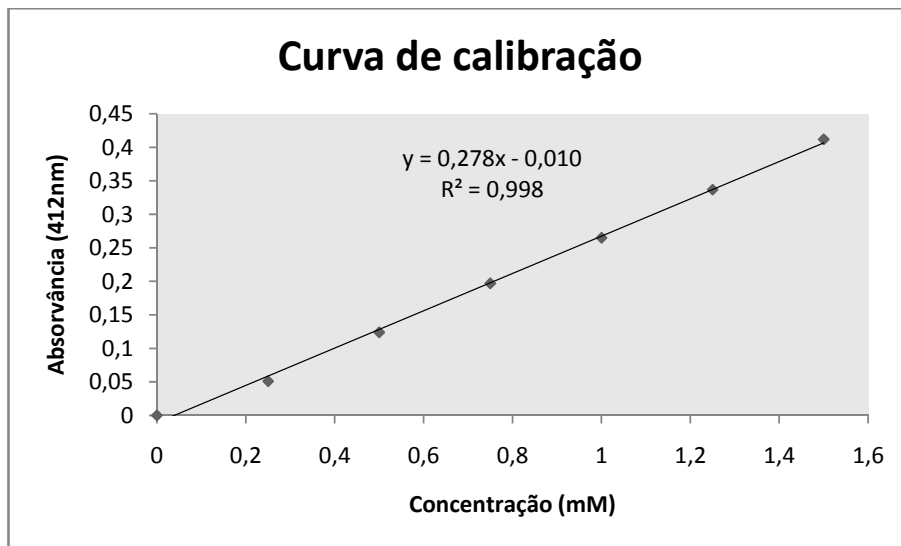
Nas figuras 4.1-4.5, encontram-se as curvas de calibração da L-cisteína vs absorvância, em função dos valores de pH: 2,8; 3,8; 4,8; 5,8 e 6,8. Pode observar-se que os coeficientes de correlação ao quadrado mostram uma excelente correlação entre a concentração de L-cisteína e os valores de absorvância, qualquer que seja o valor de pH. Desta forma, as curvas podem ser usadas para determinar a concentração de L-cisteína em soluções em que essa concentração não é conhecida. Realça-se, novamente, o facto da necessidade de fazer uma curva para cada valor de pH, já que a extensão da reacção do DTNB com os grupos tiol livres é fortemente dependente do pH, revelando-se na intensidade da cor resultante da reacção.



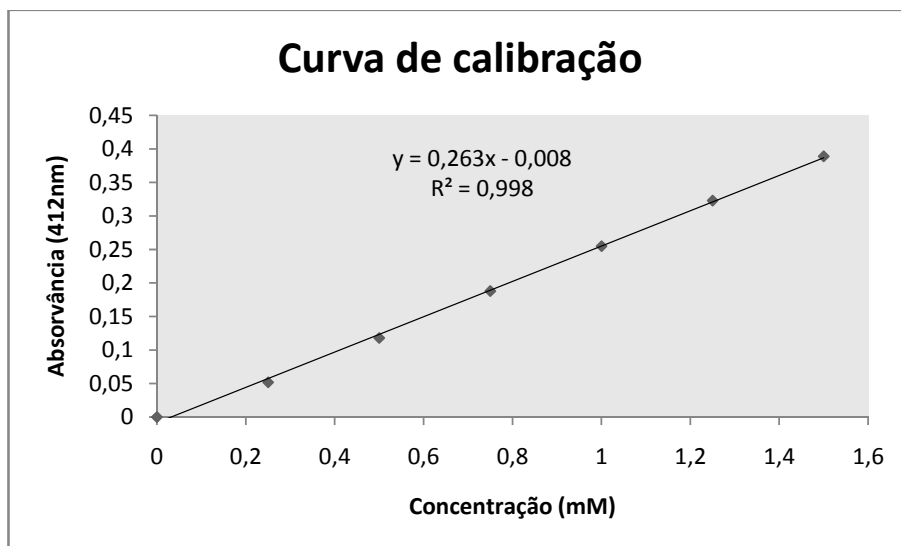
**Figura 4.1:** Curva de calibração obtida com a solução tampão a pH 2,8.



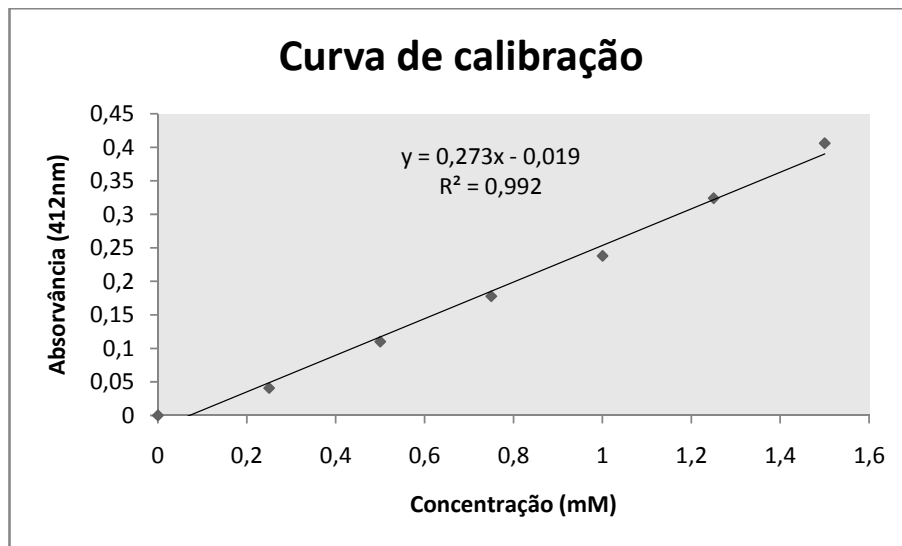
**Figura 4.2:** Curva de calibração obtida com a solução tampão a pH 3,8.



**Figura 4.3:** Curva de calibração obtida com a solução tampão a pH 4,8.



**Figura 4.4:** Curva de calibração obtida com a solução tampão a pH 5,8.



**Figura 4.5:** Curva de calibração obtida com a solução tampão a pH 6,8.

#### 4.4.2 Optimização do processo

Os resultados das leituras espectrofotométricas dos ensaios após determinação dos grupos tiol livres, tanto na amostra, como em solução, com o reagente de Ellman, foram utilizados como respostas (variáveis dependentes) da optimização, traduzidas, respectivamente, pelo K/S e %E. Na tabela 4.5 está representada a matriz do desenho experimental com as respectivas respostas.

A quantidade de grupos tiol na forma livre, foi calculada sobre os tecidos, através da medida da força de ligação do DTNB às fibras (K/S) (valor encontrado entre a diferença do branco e da amostra funcionalizada) e na solução, através da percentagem de absorção/esgotamento (%E).

Da análise dos valores de K/S e %E, interessa realçar que, curiosamente, nem sempre um valor elevado de K/S corresponde a um valor mais elevado de %E. Estes resultados revelam que as condições de fixação da L-cisteína, em maior extensão, avaliadas pelo valor de K/S, nem sempre coincidem com as condições nas quais existe uma maior absorção do aminoácido, avaliada pela percentagem de esgotamento. Isto significa que, em determinadas condições, poderá existir uma elevada absorção mas a fixação e durabilidade desejadas poderão requerer outras condições de aplicação. Desta forma, pode dizer-se que a selecção de ambas as respostas revelou-se eficaz mas também absolutamente necessária.

**Tabela 4.5:** Matriz do desenho experimental e respectivas respostas

LAYOUT			pH	Temperatura	% cisteína	Tempo	K/S	%E
7	1	Block 1	3.80	75.00	7.00	30.00	2.22	16.51
24	2	Block 1	4.80	60.00	5.00	90.00	1.72	19.3
28	3	Block 1	4.80	60.00	5.00	50.00	1.26	18.18
20	4	Block 1	4.80	90.00	5.00	50.00	1.56	33.64
6	5	Block 1	5.80	45.00	7.00	30.00	0.95	9.09
25	6	Block 1	4.80	60.00	5.00	50.00	1.32	15.79
14	7	Block 1	5.80	45.00	7.00	70.00	0.77	19.18
10	8	Block 1	5.80	45.00	3.00	70.00	0.41	30.6
16	9	Block 1	5.80	75.00	7.00	70.00	1.09	61.69
29	10	Block 1	4.80	60.00	5.00	50.00	1.29	15.65
15	11	Block 1	3.80	75.00	7.00	70.00	2.16	28.76
5	12	Block 1	3.80	45.00	7.00	30.00	1.22	11.06
2	13	Block 1	5.80	45.00	3.00	30.00	0.5	12.17
1	14	Block 1	3.80	45.00	3.00	30.00	0.25	15.05
23	15	Block 1	4.80	60.00	5.00	10.00	0.69	15.06
8	16	Block 1	5.80	75.00	7.00	30.00	0.69	32.8
3	17	Block 1	3.80	75.00	3.00	30.00	0.66	22.11
27	18	Block 1	4.80	60.00	5.00	50.00	1.3	15.35
22	19	Block 1	4.80	60.00	9.00	50.00	2.57	20
17	20	Block 1	2.80	60.00	5.00	50.00	0.83	3.57
12	21	Block 1	5.80	75.00	3.00	70.00	0.38	79.43
13	22	Block 1	3.80	45.00	7.00	70.00	0.54	10
21	23	Block 1	4.80	60.00	1.00	50.00	0.59	19.61
18	24	Block 1	6.80	60.00	5.00	50.00	0.77	43.22
26	25	Block 1	4.80	60.00	5.00	50.00	1.28	16.45
11	26	Block 1	3.80	75.00	3.00	70.00	0.84	36
9	27	Block 1	3.80	45.00	3.00	70.00	0.45	14.94
4	28	Block 1	5.80	75.00	3.00	30.00	0.69	41.67
30	29	Block 1	4.80	60.00	5.00	50.00	1.28	6.94
19	30	Block 1	4.80	30.00	5.00	50.00	0.27	7.05
36	31	Block 2	5.80	45.00	7.00	30.00	0.94	6.71
53	32	Block 2	4.80	60.00	5.00	10.00	0.67	15.25
51	33	Block 2	4.80	60.00	1.00	50.00	0.63	22
38	34	Block 2	5.80	75.00	7.00	30.00	0.7	31.53

<b>58</b>	35	Block 2	4.80	60.00	5.00	50.00	1.37	18
<b>46</b>	36	Block 2	5.80	75.00	7.00	70.00	1.04	63.05
<b>31</b>	37	Block 2	3.80	45.00	3.00	30.00	0.24	16.13
<b>40</b>	38	Block 2	5.80	45.00	3.00	70.00	0.41	28.57
<b>60</b>	39	Block 2	4.80	60.00	5.00	50.00	1.36	16
<b>32</b>	40	Block 2	5.80	45.00	3.00	30.00	0.53	12.14
<b>43</b>	41	Block 2	3.80	45.00	7.00	70.00	0.6	10.09
<b>37</b>	42	Block 2	3.80	75.00	7.00	30.00	2.09	16.97
<b>47</b>	43	Block 2	2.80	60.00	5.00	50.00	0.78	3.77
<b>44</b>	44	Block 2	5.80	45.00	7.00	70.00	1.04	19
<b>42</b>	45	Block 2	5.80	75.00	3.00	70.00	0.47	77.94
<b>52</b>	46	Block 2	4.80	60.00	9.00	50.00	2.43	22
<b>55</b>	47	Block 2	4.80	60.00	5.00	50.00	1.37	15
<b>34</b>	48	Block 2	5.80	75.00	3.00	30.00	0.65	38.78
<b>41</b>	49	Block 2	3.80	75.00	3.00	70.00	0.65	35.48
<b>35</b>	50	Block 2	3.80	45.00	7.00	30.00	1.15	9.8
<b>57</b>	51	Block 2	4.80	60.00	5.00	50.00	1.32	15
<b>45</b>	52	Block 2	3.80	75.00	7.00	70.00	2.16	27.8
<b>48</b>	53	Block 2	6.80	60.00	5.00	50.00	0.77	44.63
<b>39</b>	54	Block 2	3.80	45.00	3.00	70.00	0.39	16.3
<b>59</b>	55	Block 2	4.80	60.00	5.00	50.00	1.36	17
<b>56</b>	56	Block 2	4.80	60.00	5.00	50.00	1.37	18
<b>50</b>	57	Block 2	4.80	90.00	5.00	50.00	1.65	38.57
<b>33</b>	58	Block 2	3.80	75.00	3.00	30.00	0.69	21.98
<b>49</b>	59	Block 2	4.80	30.00	5.00	50.00	0.27	7.05
<b>54</b>	60	Block 2	4.80	60.00	5.00	90.00	1.55	22.61

#### 4.4.2.1 Resposta K/S

Na tabela 4.6, pode observar-se e debater a informação correspondente à análise de variância (ANOVA), para a resposta K/S (relativo à percentagem de L-cisteína presente nas amostras têxteis analisadas com o reagente de Ellman).

**Tabela 4.6:** Quadro ANOVA para a resposta K/S

Origem da variação	Soma dos quadrados	G.L	Média dos quadrados	Valor de F	Valor de p Prob> F
Block	1.667E-004	1	1.667E-004		
Modelo	18,56	20	0,93	43,71	< 0.0001 significativo
A-pH	1.225E-003	1	1.225E-003	0.058	0.8115
B-Temperatura	1.78	1	1.78	83.95	< 0.0001
C-Concentração	3.57	1	3.57	168.26	< 0.0001
D-Tempo	0.91	1	0.91	42.96	< 0.0001
AB	1.31	1	1.31	61.62	< 0.0001
AC	0.72	1	0.72	33.77	< 0.0001
AD	0.015	1	0.015	0.70	0.4077
BC	0.30	1	0.30	14.05	0.0006
BD	0.077	1	0.077	3.63	0.0644
CD	3.828E-003	1	3.828E-003	0.18	0.6735
A <sup>2</sup>	1.77	1	1.77	83.23	< 0.0001
B <sup>2</sup>	1.10	1	1.10	51.80	< 0.0001
D <sup>2</sup>	0.41	1	0.41	19.12	< 0.0001
ABC	0.53	1	0.53	25.11	< 0.0001
ACD	0.29	1	0.29	13.87	0.0006
BCD	0.20	1	0.20	9.57	0.0037
A <sup>2</sup> B	0.16	1	0.16	7.42	0.0097
A <sup>2</sup> C	0.16	1	0.16	7.73	0.0084
A <sup>2</sup> D	0.74	1	0.74	34.70	< 0.0001
AB <sup>2</sup>	0.24	1	0.24	11.16	0.0019
Residual	0.81	38	0.021		
Falta de ajuste	0.80	28	0.029	72.28	< 0.0001 significativo
Erro	3.967E-003	10	3.967E-004		
Total	19.37	59			

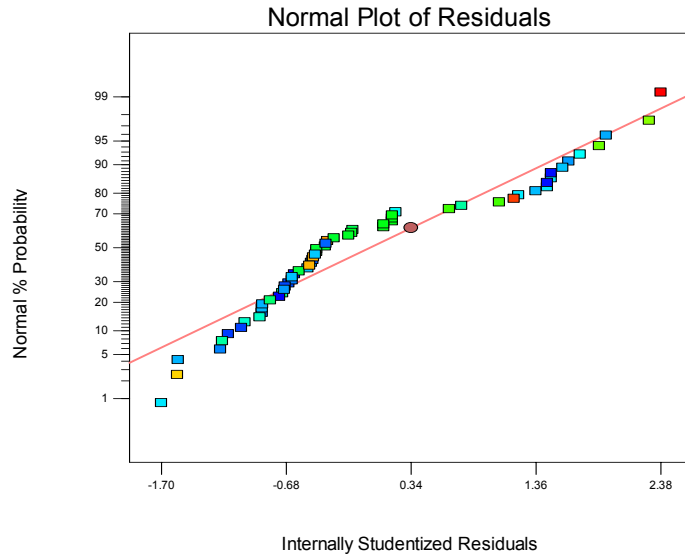
$R^2 = 0,9583$ ;  $R^2$  ajustado = 0,9364

A análise dos resultados, permite retirar as seguintes conclusões:

- O valor de F de 43,71, indica que o modelo é significativo e que existe apenas uma probabilidade de 0.01% para que este valor seja alterado devido à existência de ruído. Assim sendo, conclui-se que o modelo cúbico para a resposta K/S tem significado para um nível de significância de 0,01%.
- Os valores de “Prob > F” menores que 0,05 indicam que os valores dos coeficientes dos factores incluídos no modelo são significativos. Desta forma, B, C, D, AB, AC, BC,  $A^2$ ,  $B^2$ ,  $D^2$ , ABC, ACD, BCD,  $A^2B$ ,  $A^2C$ ,  $A^2D$  e  $AB^2$  são os termos significativos do modelo.
- Os restantes coeficientes foram eliminados por apresentarem níveis de significância superiores a 5% (sem contar com os necessários para garantir a hierarquia do modelo).
- O valor de “Prob> F” menor que 0,0001 para os desvios ao ajuste, significa que poderá existir falta de ajuste ao modelo. Contudo, o coeficiente de correlação ao quadrado ajustado de 0,9364, garante que 93,64% dos pontos experimentais se ajustaram ao modelo. Assim, existe apenas uma probabilidade de 0,01% para que um desvio ao ajuste ocorra devido a factores extrínsecos (ruído), como se pode observar na figura 4.6 na qual os resíduos se distribuem bem ao longo de uma distribuição normal.

Design-Expert® Software  
K/S

Color points by value of  
K/S:  
2.57  
0.24



**Figura 4.6:** Distribuição dos resíduos

- O modelo apresenta um coeficiente de correlação ao quadrado ( $R^2$ ) de 0,9583, mostrando que 95,83% dos pontos obtidos e previsionais se ajustarão ao modelo.
- O parâmetro *adeq precision* mede a taxa de tendência para o ruído. Uma taxa maior que 4 valores é o desejado. Para o modelo em análise, a taxa obtida foi de 24,668, o que indica que existe uma tendência adequada, concluído que este modelo pode ser usado para prever valores para a resposta K/S, conhecidos os valores dos factores ou variáveis independentes.

Assim, a equação final ajustada para a resposta K/S é:

Equação 4.1

$$\begin{aligned} K/S = & +1.34 - 8.750E-003 * A + 0.33 * B + 0.47 * C + 0.24 * D - 0.20 * A * B - 0.15 * A * C + 0.022 * A * D + 0.097 * B * C \\ & + 0.049 * B * D - 0.011 * C * D - 0.18 * A^2 - 0.14 * B^2 - 0.085 * D^2 - 0.13 * A * B * C + 0.096 * A * C * D + 0.080 * B * C * D - \\ & 0.12 * A^2 * B - 0.12 * A^2 * C - 0.26 * A^2 * D - 0.15 * A * B^2 \end{aligned}$$

Analisando os resultados do quadro ANOVA e o nível de significância dos coeficientes da equação 4.1, verificamos que o efeito linear da concentração de L-cisteína se revela o mais importante na variação da resposta ( $p < 0,0001$  e  $\beta = +0,47$ ). Da mesma forma, o efeito linear da temperatura apresenta um contributo muito significativo ( $p < 0,0001$  e  $\beta = +0,33$ ) para a variação de K/S. O efeito do tempo também contribui, de forma significativa, para o modelo ( $p < 0,0001$  e  $\beta = +0,24$ ).

De facto, a concentração de L-cisteína, a Temperatura e o Tempo, revelaram-se factores importantes na variação do valor de K/S, pelo que a sua manipulação pode permitir a obtenção da máxima quantidade de L-cisteína sobre as fibras, o que reflecte a máxima actividade anti-bacteriana.

O efeito do quadrado do pH, da Temperatura e do Tempo também contribuem de forma significativa para o modelo ( $p < 0,0001$ ).

Existe, ainda, uma interacção clara e significativa ( $p < 0,0001$ ) entre o pH e a concentração de L-cisteína (AC), o pH e a Temperatura (AB) e a Temperatura e Concentração (BC) ( $p < 0,0006$ ).

A influência dos diferentes factores e os efeitos positivos ou negativos podem ser melhor evidenciados através de uma análise gráfica das respostas de superfície.

Sublinha-se que nos pontos seguintes só serão analisadas, em detalhe, através da análise pela metodologia de superfície de resposta, os termos do modelo em que se concluiu existir valor significativo na interacção entre factores do modelo experimental.

#### **4.4.2.1.1 Efeito pH/Temperatura: (AB)**

Analisando a figura 4.7, verifica-se existir elevada interacção entre o pH e a temperatura.

Design-Expert® Software

K/S

● Design Points

2.57

0.24

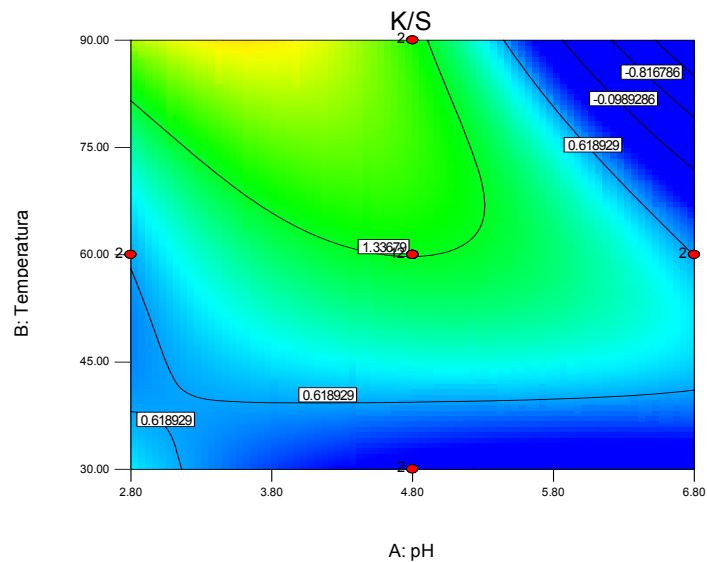
X1 = A: pH

X2 = B: Temperatura

Actual Factors

C: Concentração = 5.00

D: Tempo = 50.00



Design-Expert® Software

K/S

● Design points above predicted value

○ Design points below predicted value

2.57

0.24

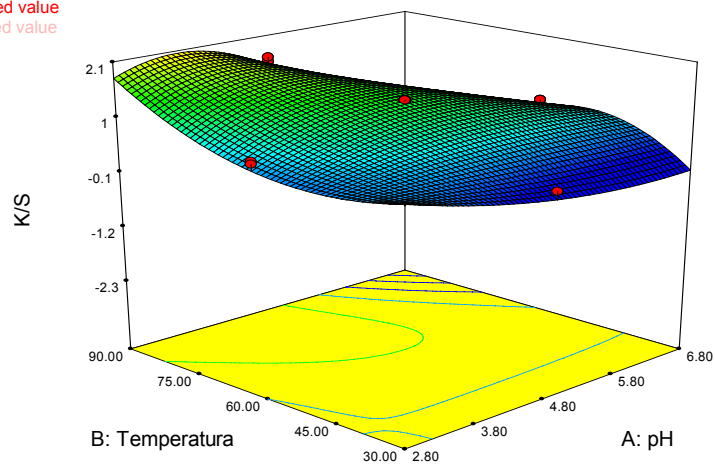
X1 = A: pH

X2 = B: Temperatura

Actual Factors

C: Concentração = 5.00

D: Tempo = 50.00



**Figura 4.7:** Influência do pH e temperatura na resposta K/S

Verifica-se, que à medida que aumenta a temperatura, o valor de K/S aumenta apenas dentro do intervalo de pH de 2,8 a 5, sugerindo que a fixação do aminoácido nas fibras é máxima neste intervalo de pH.

Fora deste intervalo, para valores superiores de pH, observa-se um decréscimo no valor da resposta K/S, assim como para qualquer gama de valores de pH desde que a temperatura seja inferior a 60 °C, traduzindo-se num efeito negativo, isto é, um valor baixo de K/S, indicando que existe pouca formação ou presença de grupos tiol livres, nas fibras de lã.

#### 4.4.2.1.2 Efeito pH/Concentração: (AC)

Analisando a figura 4.8, observa-se, também, que a interação entre os factores pH e concentração, é elevada, já que o efeito de um factor ou variável independente, está dependente do efeito do outro.

Por outro lado, a ionização dos grupos carboxílicos e amino quer da lã, quer da L-cisteína, parece favorecer a ligação, a pH 4,8, isto é, no ponto isoelectrico sendo mais propício à formação de ligações iónicas entre o aminoácido e a lã.

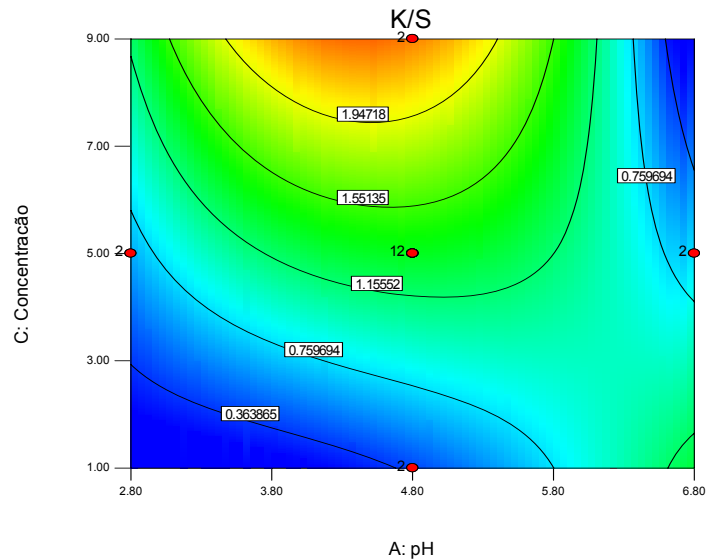
Design-Expert® Software

K/S



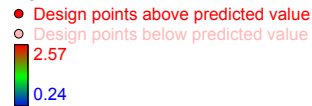
X1 = A: pH  
X2 = C: Concentração

Actual Factors  
B: Temperatura = 60.00  
D: Tempo = 50.00



Design-Expert® Software

K/S



X1 = A: pH  
X2 = C: Concentração

Actual Factors  
B: Temperatura = 60.00  
D: Tempo = 50.00

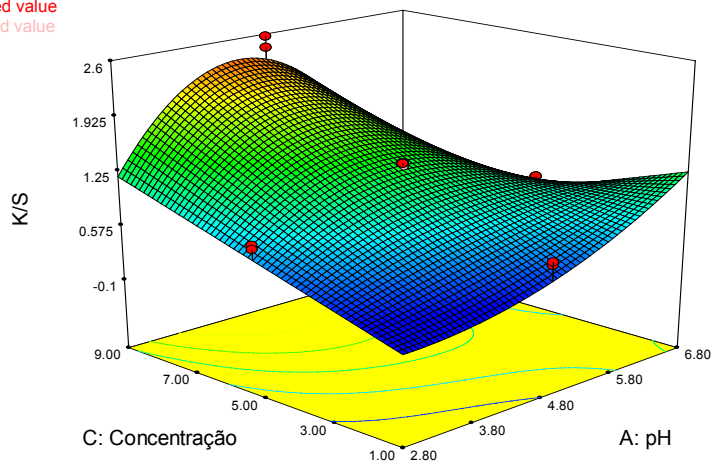


Figura 4.8: Influência do pH e concentração na resposta K/S

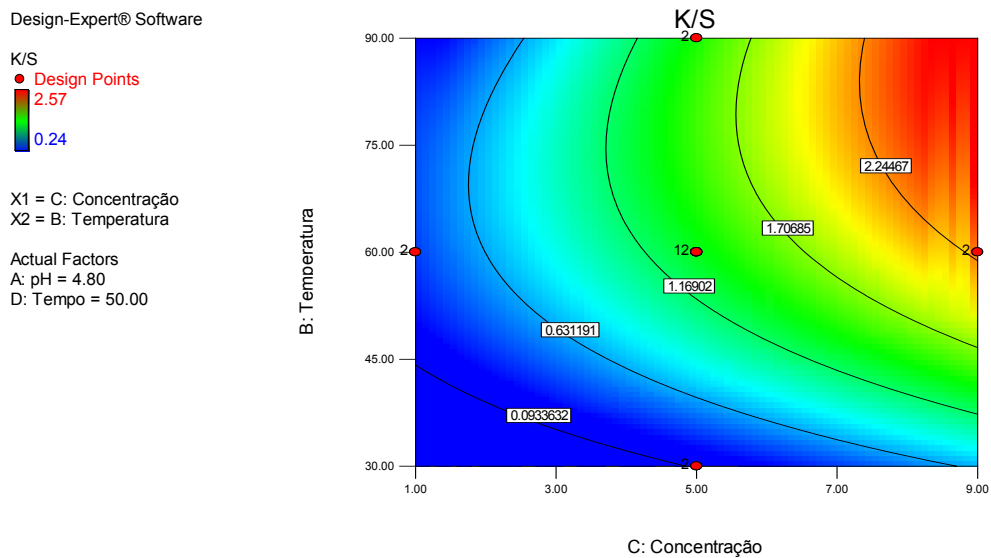
Observa-se que o aumento da concentração de L-cisteína é acompanhado por um aumento do valor de K/S, apenas no intervalo de pH de 3,8 a 5,8, porque para valores de pH superiores ao intervalo, a condição não se verifica.

Para o mesmo intervalo de pH mas reduzindo a concentração abaixo de 5%, verifica-se uma diminuição drástica do valor de K/S, o que caracteriza um efeito negativo no que respeita à presença de L-cisteína fixada nas fibras.

#### 4.4.2.1.3 Efeito Temperatura / Concentração (BC)

Relativamente à influência da temperatura e concentração na resposta K/S, verifica-se que é o factor concentração que contribui com mais relevância para a mesma.

Pode verificar-se, pela análise da figura 4.9, que o aumento gradual do valor de K/S resulta, sobretudo, do aumento da concentração, para qualquer valor de temperatura, tomando, este factor, parte relevante no resultado da resposta.



K/S

● Design points above predicted value

○ Design points below predicted value

2.57

0.24

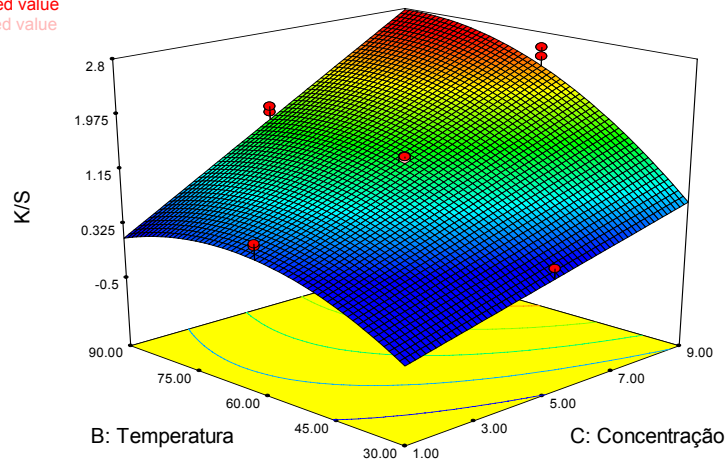
X1 = C: Concentração

X2 = B: Temperatura

Actual Factors

A: pH = 4.80

D: Tempo = 50.00



**Figura 4.9:** Influência da concentração e temperatura na resposta K/S

#### 4.4.2.2 Resposta %E

Na tabela 4.7, encontram-se descritos os dados relativos à análise de variância (ANOVA), para a resposta %E, isto é, a concentração de L-cisteína que terá sido absorvida pelas fibras (calculada através da medida das concentrações inicial e residual presente nas soluções de incubação).

**Tabela 4.7:** Quadro ANOVA para a resposta %E

Origem da variação	Soma dos quadrados	G.L	Média dos quadrados	Valor de F	Valor de p Prob> F
<b>Block</b>	4.42	1	4.42		
<b>Model</b>	14958.89	16	934.93	60.57	< 0.0001
					significativo
<b>A-pH</b>	1620.47	1	1620.47	104.98	< 0.0001
<b>B-Temperatura</b>	844.19	1	844.19	54.69	< 0.0001
<b>C-Concentração</b>	0.038	1	0.038	2.464E-003	0.9606
<b>D-Tempo</b>	33.64	1	33.64	2.18	0.1473
<b>AB</b>	1095.00	1	1095.00	70.94	< 0.0001
<b>AC</b>	30.52	1	30.52	1.98	0.1670
<b>AD</b>	655.31	1	655.31	42.46	< 0.0001

<b>BD</b>	538.49	1	538.49	34.89	< 0.0001
<b>A<sup>2</sup></b>	520.66	1	520.66	33.73	< 0.0001
<b>B<sup>2</sup></b>	349.97	1	349.97	22.67	< 0.0001
<b>C<sup>2</sup></b>	304.76	1	304.76	19.74	< 0.0001
<b>D<sup>2</sup></b>	148.47	1	148.47	9.62	0.0034
<b>A<sup>2</sup>B</b>	264.11	1	264.11	17.11	0.0002
<b>A<sup>2</sup>C</b>	167.51	1	167.51	10.85	0.0020
<b>A<sup>2</sup>D</b>	408.09	1	408.09	26.44	< 0.0001
<b>AB<sup>2</sup></b>	46.30	1	46.30	3.00	0.0906
<b>Residual</b>	648.28	42	15.44		
<b>Falta de ajuste</b>	560.88	32	17.53	2.01	0.1219 não significativo
<b>Erro</b>	87.40	10	8.74		
<b>Total</b>	15611.59	59			

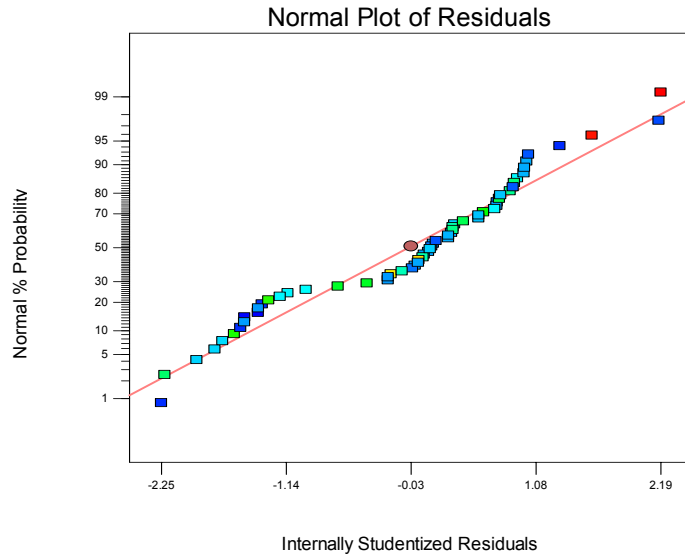
$R^2 = 0,9585$ ;  $R^2$  ajustado =  $0,9426$

A análise dos resultados permite retirar as seguintes conclusões:

- O valor de F de 60,57, indica que o modelo é significativo e que existe apenas uma probabilidade de 0,01% para que este valor seja alterado devido a factores externos (ruído). Assim sendo, conclui-se que o modelo cúbico para a resposta %E tem significado para um nível de significância de 0,01%.
- Os valores de “Prob > F” menores que 0,05 indicam que os valores dos coeficientes dos factores incluídos no modelo são significativos. Assim, A, B, AB, AD, BD, A<sup>2</sup>, B<sup>2</sup>, C<sup>2</sup>, D<sup>2</sup>, A<sup>2</sup>B, A<sup>2</sup>C e A<sup>2</sup>D, são os termos significativos do modelo.
- Os restantes coeficientes foram eliminados por apresentarem níveis de significância superiores a 5% (sem contar com os necessários para garantir a hierarquia do modelo).
- O valor de F correspondente à falta de ajuste é de 2.01, o que indica que não existe falta de ajuste do modelo, como se pode observar na figura 4.10 na qual os resíduos se distribuem bem ao longo de uma distribuição normal.

Design-Expert® Software  
% E

Color points by value of  
% E:  
79.43  
3.57



**Figura 4.10:** Distribuição dos resíduos

- O modelo apresenta um coeficiente de correlação ao quadrado ajustado ( $R^2$ ) de 0.9426, mostrando que 94,26% dos pontos obtidos se ajustaram ao modelo.
- O parâmetro *adeq precision* mede a taxa de tendência para o ruído, sendo que uma taxa maior que quatro valores é o desejado. Para o modelo em análise, a taxa obtida foi de 32,913, o que indica que existe uma tendência adequada, concluindo que este modelo pode ser usado para prever valores para a resposta %E uma vez conhecidos os valores dos factores ou variáveis independentes.

Assim, a equação final ajustada para a resposta %E é:

Equação 4.2

$$\begin{aligned} \% E = & +15.61 + 10.06*A + 7.26*B + 0.049*C + 1.45*D + 5.85*A*B - 0.98*A*C + 4.53*A*D + 4.10 \quad *B*D \\ & + 3.08*A^2 + 2.53*B^2 + 2.36*C^2 + 1.65*D^2 + 4.98*A^2*B - 3.96*A^2*C + 6.19*A^2*D - 2.08*A*B^2 \end{aligned}$$

Analisando os resultados do quadro ANOVA e o nível de significância dos coeficientes da equação 4.2, verificamos que o efeito linear do pH se revela o mais importante na variação da resposta ( $p < 0,0001$  e  $\beta = +10,06$ ). Da mesma forma, o efeito linear da temperatura apresenta um contributo muito significativo ( $0,0001$  e  $\beta = +7,26$ ) para a variação de %E. O efeito do tempo e da concentração de L-cisteína não se revelaram, embora contribuam, de forma significativa, para o modelo ( $p > 0,05$ ).

De facto, o pH e a Temperatura, revelaram-se factores importantes na variação do valor de %E, pelo que a sua manipulação pode permitir a absorção máxima de L-cisteína pelas fibras, o que, à partida, deverá reflectir a máxima actividade anti-bacteriana.

O efeito do quadrado do pH, da Temperatura, da Concentração e do Tempo também contribuem de forma significativa para o modelo ( $0,0001 < p < 0,01$ ).

Existe, ainda, uma interacção clara e significativa ( $p < 0,0001$ ) entre o pH e Temperatura (AB), o pH e Tempo (AD) e a Temperatura e Tempo (BD).

A influência dos diferentes factores e os efeitos positivos ou negativos podem ser melhor evidenciados através de uma análise das respostas de superfície.

Sublinha-se que nos pontos seguintes, só serão analisadas em detalhe, através da análise pela metodologia de superfície de resposta, os termos do modelo em que se concluiu existir valor significativo na interacção entre factores do modelo experimental.

#### **4.4.2.2.1 Efeito pH/Temperatura: (AB)**

Pela análise da figura 4.11, observa-se que existe uma elevada interacção entre os factores pH e temperatura, e que este último exerce maior influência no valor da resposta.

Por outro lado, a ionização dos grupos carboxílicos e amino quer da lã, quer da L-cisteína, parece ser afectada pela temperatura e não apenas pelo pH, como referido anteriormente no capítulo III (Silva 1962). Assim, para valores elevados de temperatura, a absorção máxima a pH 2,8 ou 6,8, mostra que a ionização poderá ser também mais propícia à formação de ligações iónicas entre o aminoácido e a lã, enquanto para valores de temperatura mais baixos, a ligação parece ser máxima a pH 4,8, isto é, no ponto isoeléctrico.

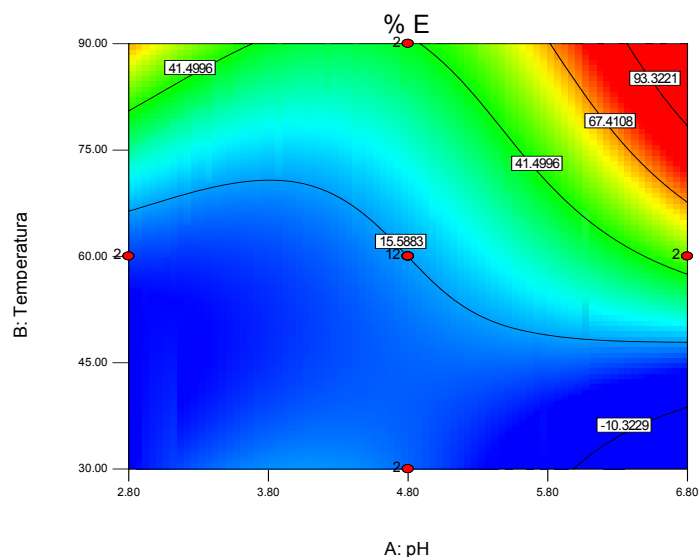
De realçar, que na análise da resposta anterior (K/S) a fixação revelou-se ser máxima, a pH 4,8. Desta forma, o facto de existir uma elevada absorção a valores de pH 2,8 e 6,8, não estarão garantidas as condições de fixação, que determinam a solidez ou durabilidade da funcionalização.

Design-Expert® Software

% E  
● Design Points  
79.43  
3.57

X1 = A: pH  
X2 = B: Temperatura

Actual Factors  
C: Concentração = 5.00  
D: Tempo = 50.00

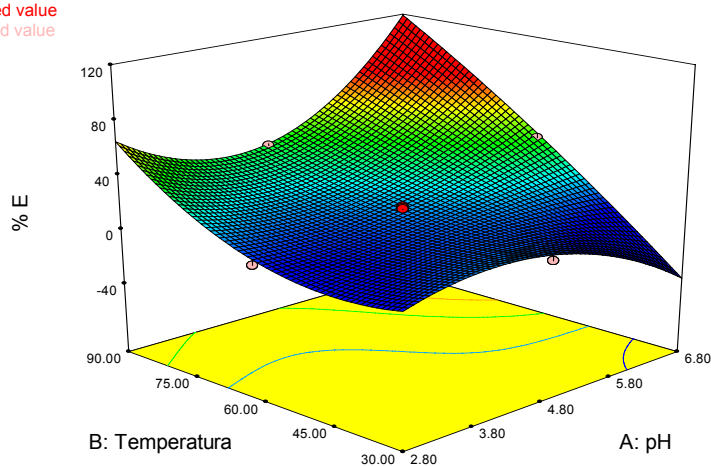


Design-Expert® Software

% E  
● Design points above predicted value  
○ Design points below predicted value  
79.43  
3.57

X1 = A: pH  
X2 = B: Temperatura

Actual Factors  
C: Concentração = 5.00  
D: Tempo = 50.00



**Figura 4.11:** Influência do pH e temperatura na resposta %E

Verifica-se também que um aumento da temperatura é seguido pelo aumento positivo do valor da resposta %E, para qualquer valor de pH. Observa-se, ainda, que a temperatura mínima limite para a obtenção de uma resposta de valor positivo, deverá rondar os 50 °C, visto que abaixo desse valor é estatisticamente possível obter-se uma resposta de valor negativo, como mostra a figura 4.11, isto é, o esgotamento do aminoácido L-cisteína não deverá fazer-se sentir.

#### 4.4.2.2.2 Efeito pH/Tempo: (AD)

Relativamente à influência e interação dos factores pH/tempo no valor da resposta, constata-se que é o tempo, o factor determinante. Verifica-se, também, que existe uma forte interação entre ambos.

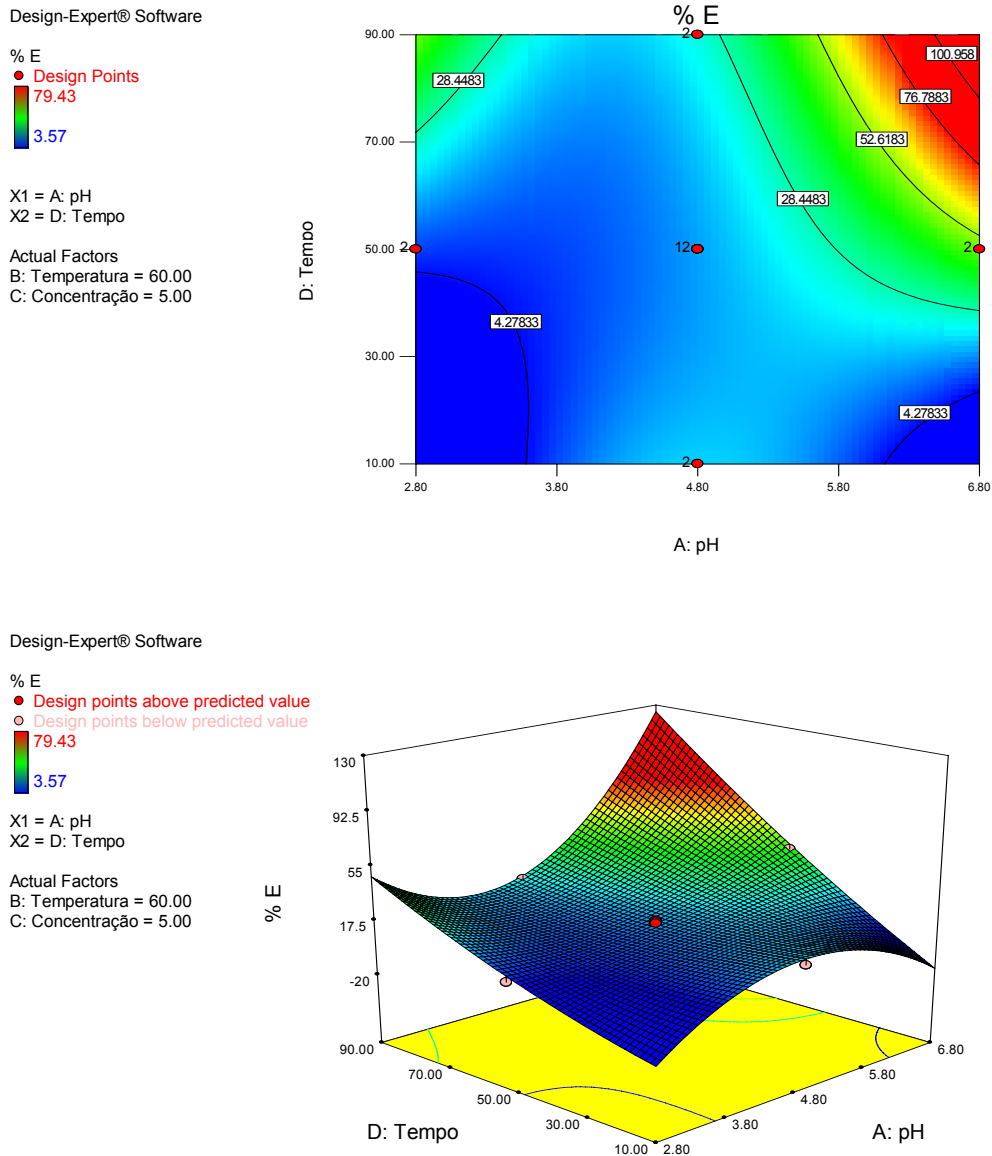


Figura 4.12: Influência do pH e tempo na resposta %E

De facto, o aumento do valor de %E resulta influenciado distintamente para tempos mais longos ou mais curtos, em função do pH. Para valores elevados do factor tempo ( $t > 60$  minutos), a %E é máxima para valores de pH acima de 5,8 sendo, também, mais elevada, para valores de pH da ordem dos 2,8. No caso de tempos mais curtos ( $t < 30$  minutos), a %E é máxima para valores de pH na ordem dos 4,8. Esta constatação revela-se interessante e pode revelar que a ionização dos grupos carboxílicos e amino, quer da Iã, quer da L-cisteína, sejam também dependentes do factor tempo, quando em presença de ambos (Iã e L-cisteína), condicionando a absorção através das ligações iónicas entre esses grupos.

#### 4.4.2.2.3 Efeito Tempo/Temperatura: (BD)

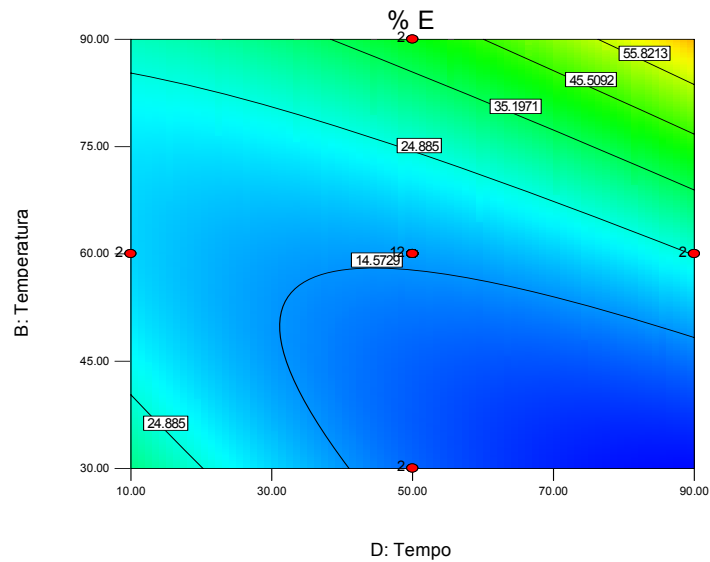
De acordo com a figura 4.13, verifica-se que existe uma interacção entre os factores. No entanto, esta é mais expressiva e favorável positivamente para a resposta, quando se atingem temperaturas elevadas, num curto período de tempo mas, sobretudo em tempos mais elevados.

Design-Expert® Software

% E  
 ● Design Points  
 79.43  
 3.57

X1 = D: Tempo  
 X2 = B: Temperatura

Actual Factors  
 A: pH = 4.80  
 C: Concentração = 5.00



% E

● Design points above predicted value

○ Design points below predicted value

79.43

3.57

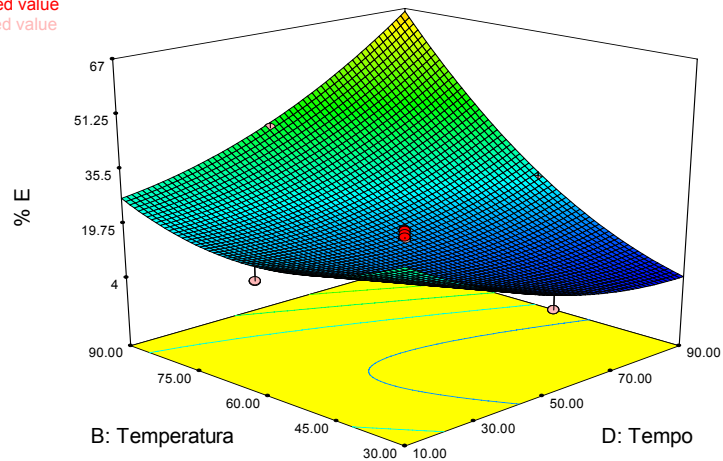
X1 = D: Tempo

X2 = B: Temperatura

Actual Factors

A: pH = 4.80

C: Concentração = 5.00



**Figura 4.13:** Influência do tempo e temperatura na resposta %E

Verifica-se que mais facilmente se obtêm um elevado esgotamento (%E), em casos em que se induzam temperaturas elevadas, logo nos primeiros tempos de processamento, comparativamente com situações em que só se atinge temperaturas semi elevadas a meio do processo, ou, então, para tempos mais elevados. Esta interacção é conhecida como Strike (Lewis, 1992) e significa que para tempos curtos existe uma absorção rápida, devida a forças de afinidade, na fase cinética. À medida que se estabelece a reacção entre a L-cisteína e as fibras de lã, até se atingir o início da fase de equilíbrio dinâmico, existe uma absorção e desabsorção, até se alcançar o equilíbrio, onde o esgotamento é máximo.

#### 4.4.2.3 Optimização numérica e gráfica

Após ter sido feita a análise de variância, das respectivas respostas, foi realizada a optimização do processo anti-bacteriano utilizando, mais uma vez, o programa *Design-expert*. Esta optimização foi efectuada no sentido de minimizar o consumo de L-cisteína e energia, no processo de funcionalização por razões económicas sem, no entanto, afectar a acção bacteriostática e/ou bactericida.

É possível prognosticar as melhores condições de aplicação, impondo alguns critérios que a seguir se indicam e que têm como objectivo reduzir o número de opções possíveis, garantindo no entanto, a sua funcionalidade.

Desta forma, os critérios impostos são tais que a percentagem de esgotamento, %E, e K/S deverão ser superiores a 20% e 1,5, respectivamente.

Esta triagem de valores teve como base os bons resultados anti-bacterianos obtidos nos ensaios realizados e analisados no capítulo anterior, para amostras tratadas cujo K/S era igual ou superior a 1,19 (8% L-cisteína, pH 4,8, 60 °C e 50 minutos) e cuja percentagem de esgotamento foi realizada, *à posteriori*, tendo-se constatado ser superior a 19%. Assim, para garantir que existirá bioactividade, entendemos ser prudente seleccionarem-se os valores acima indicados (20% e 1,5) como valores mínimos para garantir essa mesma bioactividade. Realça-se, mais uma vez, a impossibilidade de se determinar o efeito anti-bacteriano em cada ponto experimental, por razões não só relacionadas com a morosidade e complexidade do processo, mas também pela desnecessidade verificada e discutida neste capítulo.

### **Optimização numérica:**

Perante os critérios impostos, %E > 20 % e K/S > 1,5, resultam duas situações previsíveis de funcionalização, com as seguintes condições óptimas de pH, Temperatura, Concentração de L-cisteína e Tempo, como mostra a tabela 4.8.

Para estas condições, resulta uma previsão, indicada também na tabela 4.8, calculada através dos modelos predictivos (%E e K/S).

**Tabela 4.8:** previsão de resultados para as respostas %E e K/S aplicando as condições óptimas de pH, Temperatura, Concentração e Tempo, resultantes da aplicação numérica.

Ponto	pH	Temperatura	Concentração	Tempo	K/S	% E	Probabilidade
1	4.99	73.82	6.00	43.77	1.601	26.0263	1.000
2	4.47	51.64	8.93	32.33	1.860	22.06	1.000

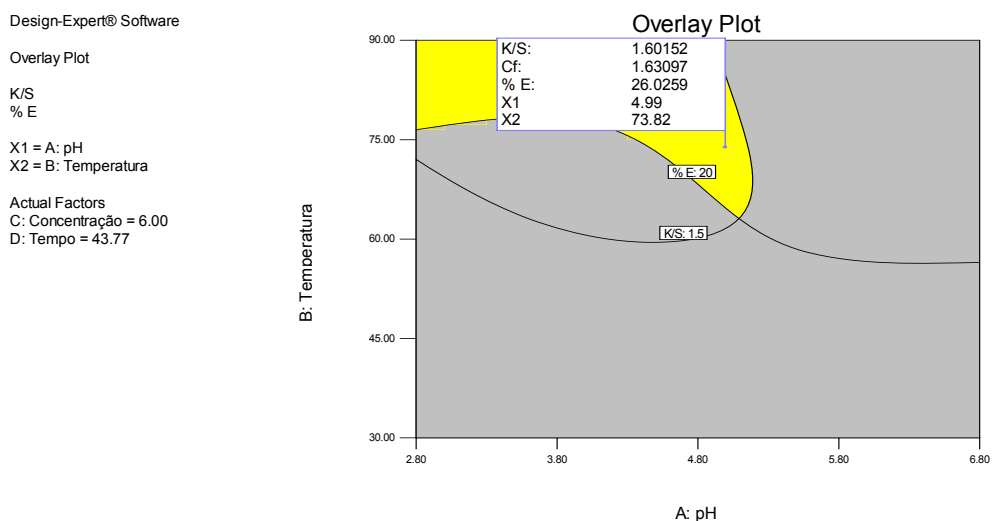
Intervalos de confiança: K/S [1,04—1,95] e %E [13,36—28,87]

Desta forma, os requisitos ou critérios impostos são satisfeitos quando se utilizam as condições assinaladas nos pontos 1 e 2.

## Optimização gráfica:

Este tipo de optimização permite o manuseamento dos valores, graficamente, para melhor ajustar as condições óptimas, isto é, possibilita o ajuste dos valores alcançados na optimização numérica, baseando-se em critérios impostos novamente pelo utilizador. Assim, as exigências surgem no sentido de diminuir a temperatura de incubação, no sentido de haver um menor consumo energético.

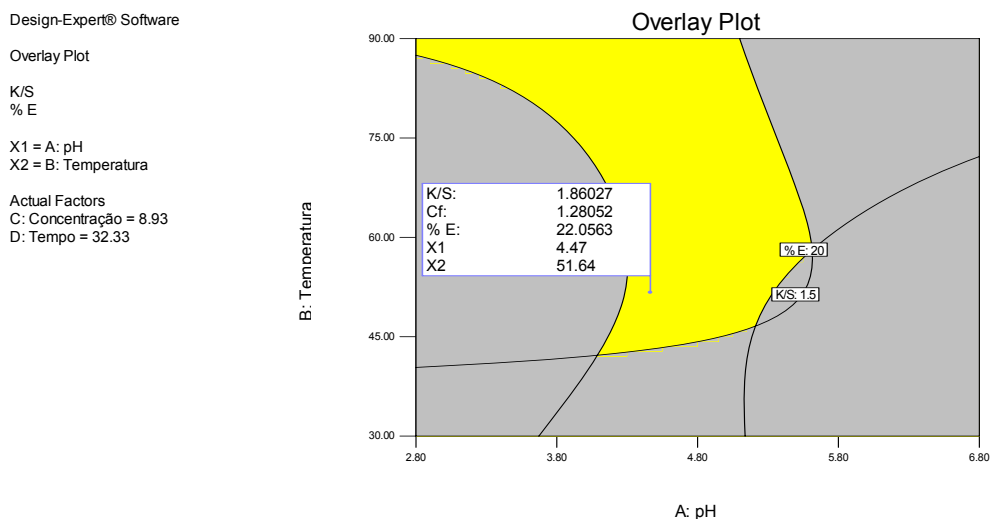
As regiões óptimas obtidas para cada uma das previsões, apontadas na optimização numérica, encontram-se definidas a amarelo nos gráficos das figuras seguintes (figuras 4.14 e 4.15).



**Figura 4.14:** Região óptima para a previsão número um, resultante da sobreposição das respostas %E e K/S, em função do pH e temperatura, mantendo fixa a concentração e o tempo.

Verifica-se que é possível diminuir a temperatura até aos 65 °C, para um valor de pH correspondente a 5,0, sem haver perturbação dos valores estabelecidos para as respostas, como observável na figura 4.14.

Relativamente à optimização gráfica da previsão número dois, verifica-se, pela análise da figura 4.15, que também é possível diminuir, sem interferir com os critérios impostos, a temperatura para valores na ordem dos 45 °C, para um intervalo de pH de 4,0 os 5,0.



**Figura 4.15:** Região óptima para a previsão número dois, resultante da sobreposição das respostas %E e K/S, em função do pH e temperatura, mantendo fixa a concentração e o tempo.

Para avaliar qual das duas possibilidades será mais recomendada, no sentido de possuir maior eficiência anti-bacteriana, foram realizados, ensaios antibacterianos, nestes dois pontos. Os resultados podem ser consultados no ponto seguinte.

#### 4.4.2.4 Pontos óptimos: testes anti-bacterianos

Estes testes foram realizados para permitir a validação da optimização do processo de funcionalização anti-bacteriano com L-cisteína, e a avaliação quantitativa da percentagem de inibição de crescimento bacteriano das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*, relativa aos pontos óptimos obtidos.

Verifica-se que nas duas amostras é atingido o máximo de actividade anti-bacteriana, traduzindo-se numa erradicação total de 100% de bactérias, para ambas as estirpes: *S. aureus* (ATCC 6538) e *K. pneumoniae* (ATCC 11296).

As concentrações em L-cisteína presentes nestas amostras relativas aos pontos óptimos 1 e 2, respectivamente, oscilam entre 0,0012g/mL e 0,0018 g/mL.

Atendendo aos resultados obtidos, pode concluir-se que o ponto óptimo 2, correspondente a um menor valor de concentração de L-cisteína e a uma temperatura também mais baixa, relativamente ao ponto 1, será mais economicamente recomendável.

Desta forma, apesar de não ser possível comparar os valores obtidos com os de outros autores, no que toca a uma quantia mínima de inibição, pelo facto deste novo processo ser completamente inovador, é esperado que essa concentração seja inferior a 0,0012g/mL ou 0,02% (p/v). Mais ainda, tal como referido no ponto 3.6.4 do capítulo três, valores encontrados por outros autores (Gao e Cranston, 2008), para compostos como, por exemplo, o quitosano, que é de 0,05-0,1% (p/v) (No *et al*, 2002), conclui-se que o valor encontrado para a L-cisteína, nas condições óptimas de funcionalização, é significativamente mais baixo. Porém, quando comparado com compostos de amónio quaternário, 0,001—0,01% (p/v), ou PHMB, 0,0005—0,001 % (p/v) e triclosano, inferior a 0,001% (p/v), o MIC revela-se bastante mais elevado (Jones *et al*, 2000) (Cazzaniga *et al*, 2002) (Russel, 2004) (Gao e Craston, 2008).

#### **4.4.3 Ensaio de cito-toxicidade**

O resultado do ensaio de cito-toxicidade, realizado de acordo com a Norma EN ISO 10993-5, revelou o seguinte:

Verificou-se que o extracto do material bioactivo extraído a 33,3% (*perspiration method*), provoca uma inibição de crescimento celular de  $25 \pm 0,0595$ . Este resultado revela que não existe uma libertação de produtos tóxicos do material funcionalizado, nas condições referidas para o ponto óptimo (ponto 2 da análise numérica e gráfica), já que, de acordo com a referida norma, o valor obtido para a inibição do crescimento celular do extracto extraído a 33,3% deverá ser superior a 30%, para que isso aconteça.

Assim, podemos dizer, com absoluta confiança, que o novo método desenvolvido permite funcionalizar a lã com as desejadas propriedades bioactivas, em condições de segurança para os potenciais utilizadores, devido a sua comprovada não toxicidade.

#### 4.4.4 Resultados obtidos no ensaio de controlo de qualidade: ensaio da resistência à abrasão

A Tabela 4.9 mostra a influência do processo de funcionalização bioactiva com L-cisteína, sobre a propriedade de resistência à abrasão, nos materiais funcionalizados. Verifica-se que o material tratado apresenta uma escala de valores, relativos à resistência a abrasão, mais alargada, sendo mesmo observável valores acima e abaixo do intervalo de valores, referente ao mesmo efeito, mas obtido para o material original. No entanto, em média, o material tratado apresenta maior resistência ao efeito de abrasão, o que dessa forma leva a concluir que é possível praticar o respectivo tratamento antimicrobiano no material, sem que haja penalização das suas propriedades físicas.

O aumento da resistência à abrasão poderá ser, presumivelmente, consequência do aumento do número de ligações dissulfídicas, que possam ocorrer entre moléculas de cadeias subjacentes - ligações intermoleculares, promovendo uma maior coesão entre microfibrilas, melhorando a resistência a forças de abrasão e tracção.

**Tabela 4.9:** Resultados obtidos, nos testes de controlo de qualidade: resistência à abrasão

Ensaio	Original	Tratado
<b>Resistência à abrasão</b>		
Ciclos	34000±3000	37500±7500

## 4.5— Conclusão

De uma forma global conclui-se que o processo de optimização, aplicado ao método utilizado para funcionalização do material têxtil, revelou-se eficaz, permitindo, desta forma, a obtenção de um material têxtil dotado de propriedades anti-bacterianas, com recurso às condições mais favoráveis à funcionalização, de forma mais económica, e sem libertação de produtos cito-tóxicos. Estão, assim, garantidas as condições para a funcionalização de materiais à base de lã, para inúmeras aplicações.

Tal facto é comprovado pelos resultados obtidos nos ensaios anti-bacterianos, onde se verifica que, em ambos os pontos óptimos e para as duas estirpes em análise, teve lugar uma eliminação total de bactérias, prenunciando mesmo um potencial efeito bactericida.

Desta forma, apesar de não ser possível comparar os valores obtidos com os de outros autores, no que toca a uma quantia mínima de inibição, pelo facto deste novo processo ser completamente inovador, é esperado que essa concentração seja inferior a 0,0012g/mL ou 0,02% (p/v).

A avaliação dos factores mais importantes que permitem obter os melhores resultados foi ainda alcançada recorrendo à Metodologia de Resposta de Superfície (RSM), já que só um tratamento estatístico ajustado ao fenómeno permite concluir sobre quais as variáveis que causam um maior efeito em cada resposta. A análise dos resultados do capítulo anterior possibilitou a informação necessária a introduzir no desenho experimental, nomeadamente os factores aparentemente mais importantes e os respectivos níveis a utilizar. Contudo, a sua observação directa não permitiria uma optimização rigorosa e com elevada precisão. Sem este estudo prévio, o desenho experimental poderia não ter permitido uma optimização com elevada precisão, ou poderia ter sido incorrectamente desenhado à partida.

De facto, a optimização recorrendo à Metodologia de Resposta de Superfície, revelou-se importante em termos não só estatísticos mas também processuais. Conseguiu-se uma maior eficiência do processo optimizado, salvaguardando a qualidade do material têxtil.

Embora as funções quadráticas de ambas respostas apresentassem coeficientes de correlação ao quadrado de 0.89 e 0.9, respectivamente, a função cúbica revelou um coeficiente de correlação ao quadrado superior, razão pela qual foi seleccionada. Apesar do desenho experimental basear-se apenas em pontos factoriais e axiais, a utilização da função cúbica para optimização do desenho experimental seleccionado é perfeitamente adequada. Contudo, para prever ou estimar valores para as respostas através das funções cúbicas é aconselhável adicionar novos pontos ao desenho experimental para melhorar a robustez dos modelos ou funções cúbicas obtidas.

De acordo com a interpretação de todos os gráficos obtidos, conclui-se que os factores concentração e temperatura são claramente determinantes para a obtenção de uma resposta de elevado valor, traduzindo uma elevada absorção (%E) e fixação (K/S) da L-cisteína. Já os factores pH e tempo, embora com um nível de significado importante, não se revelaram muito determinantes.

A região óptima relativa ao ponto dois, relativo à segunda previsão numérica para o ponto óptimo, é mais amoldada ao processo de funcionalização do material têxtil, pois permite que o método aplicado para funcionalização seja realizado a baixas temperaturas, o que é economicamente favorável para o processo, estando garantida, no final da funcionalização, a desejada bioactividade do material têxtil.

## Capítulo V

---

Discussão geral, conclusão e perspectivas  
futuras

## 5.1—Discussão Geral

O estudo realizado ao longo deste trabalho, permitiu aprofundar alguns conhecimentos relativos à bioactividade anti-bacteriana da L-cisteína, tanto na sua forma livre como associada a fibras têxteis, bem como acerca da melhor forma de funcionalização dos têxteis de lã, dotando-os de grupos funcionais, neste caso de grupos sulfídricos presentes nos aminoácidos cisteínicos, capazes de estabelecer interacções com células bacterianas, modificando o seu metabolismo e induzindo, dessa forma, um efeito bacteriostático ou bactericida, consoante o grau de destruição celular. Apesar de não ter sido possível estabelecer qual o mecanismo, através do qual os grupos sulfídricos ou tiol livres induzem a inibição do crescimento bacteriano, e atendendo aos diferentes tipos de mecanismos já estabelecidos, tudo aponta para que a inibição se estabeleça através de interacções com sistemas enzimáticos ou outras proteínas presentes na membrana citoplasmática das diferentes bactérias. Acrescenta-se ainda, e segundo Friedman (2001) os grupos tiol têm a capacidade de interagir através de múltiplas vias: ligação dissulfídrica, reacção de oxidação-redução e adição nucleófila.

Este trabalho permitiu-nos desenvolver um novo acabamento anti-bacteriano, aplicável em materiais têxteis, com a finalidade de se obterem têxteis anti-microbianos para aplicação na área hospitalar, e em produtos com potencial aplicação, nomeadamente, no sector geriátrico e pediátrico.

Como já referido ao longo deste trabalho, este produto natural não foi alvo de estudo como potencial agente anti-bacteriano, quer na sua forma livre, quer aplicado a quaisquer materiais, incluindo os têxteis, razão pela qual este novo processo já foi alvo do registo de uma patente nacional. Procedeu-se, ainda, à determinação do MIC da L-cisteína e fez-se a comparação com outras concentrações mínimas inibitórias, relativas a outros compostos dotados da mesma propriedade. Concluiu-se que as concentrações mínimas inibitórias obtidas neste trabalho para a L-cisteína no seu estado livre, são de 1,2–9,7% (p/v) para *S.aureus* e 0,3–9,7% (p/v) para *S. epidermidis*, sendo mais elevadas que as encontradas por outros autores (No *et al*, 2002) (Cottell *et al*, 2009), 0,05-0,1% (p/v) em relação ao quitosano e  $5,3 \times 10^{-6}$  % (p/v) relativamente ao triclosano.

Por outro lado e, curiosamente, a concentração mínima inibitória obtida para a L-cisteína aplicada às fibras de lã, isto é, imobilizada nas fibras, revelou que a mesma é significativamente mais baixa, comparativamente à forma livre (aminoácido em solução) e

tem o valor de 0,02% (p/v), sendo, neste caso, mais baixa que a encontrada por outros autores (Gao e Cranston, 2008): 0,05-0,1% (p/v) em relação ao quitosano, ou equivalente, para os compostos de amónio quaternários, PHMB e triclosano, para os quais se obteve valores de 0,001—0,01% (p/v) e 0,0005—0,001 % (p/v), respectivamente (Gao e Cranston, 2008). A razão para a menor concentração necessária para promover a inibição bacteriana, quando o aminoácido se encontra ligado às fibras, deverá residir no facto de, neste caso, os grupos tiol livres se encontrarem disponíveis, conferindo, através dos mesmos, um maior efeito anti-bacteriano. De facto, a L-cisteína liga-se à lã através dos grupos amino e/ou carboxílicos, como revelaram os resultados do ensaio do reagente de Ellman, sobre os tecidos, já que se verificou um aumento dos grupos tiol livres, após funcionalização. Por outro lado, em solução, o aminoácido poderá formar agregados, através do estabelecimento de ligações dissulfídicas entre moléculas de L-cisteína, diminuindo a disponibilidade desses grupos para interagirem com as membranas bacterianas.

Ao contrário de resultados alcançados em outros estudos, relativos à avaliação cito-tóxica de determinados compostos também utilizados na funcionalização de materiais têxteis para obtenção de efeitos bacteriostáticos ou bactericidas, a L-cisteína aplicada à lã, nas condições optimizadas, não revela qualquer efeito cito-tóxico. De facto, verificou-se que o triclosano é reactivo quando exposto à luz solar, formando compostos tóxicos para as células, assim como nos compostos de prata, na presença de humidade, aquela difunde-se até à superfície da fibra formando iões de prata igualmente tóxicos para as células. (Gao e Cranston, 2008) De facto, a análise da eventual cito-toxicidade dos têxteis funcionalizados com L-cisteína veio confirmar a sua ausência, significando que o material não mostra nenhuma actividade biológica tóxica significativa. Verificou-se apenas uma inibição de crescimento de 25%, valor inferior ao estipulado para se declarar na presença de um efeito tóxico-celular, que corresponde a uma percentagem de inibição de crescimento maior que 30%. Para além disso, conclui-se que nenhuma substância cito-tóxica foi libertada, durante o uso deste material, que possa levar a irritações em contacto com a pele.

Para este processo de funcionalização a imobilização do aminoácido L-cisteína nas fibras de lã é alcançável mesmo a baixas temperaturas, o que torna o processo ainda mais rentável e interessante, comparativamente com outros processos utilizados para o mesmo objectivo, mas que impõem recurso a temperaturas mais elevadas, como são exemplo, os processos descritos pelos autores em (Han, e Yang 2004) (Singh *et al*, 2005) (Giri *et al*, 2009) (Kangwansupamonkon *et al*, 2009) (Tomsic *et al*, 2009), onde são necessárias temperaturas acima dos 80 °C. No final, a fixação do aminoácido L-cisteína manifesta uma

solidez relevante e indispensável para a obtenção de um efeito permanente e duradouro, mostrando resistência à perda de bioactividade, causada pela remoção parcial do agente bioactivo, normalmente verificada nos processos de lavagens sucessivas do material funcionalizado. Tal facto, é uma vantagem acrescida, pois alguns tratamentos antimicrobianos, particularmente à base de corantes, metais e PHMB, aplicados em materiais têxteis, gozam de uma actividade bastante limitada, verificando-se uma gradual perda do efeito ao longo das lavagens (Gao e Cranston, 2008) (Giri *et al*, 2009).

A concentração mínima letal (MLC), isto é, a concentração mínima de L-cisteína à qual as estirpes analisadas, *S. aureus* e *K. pneumoniae*, são totalmente erradicadas, é verificada mesmo nas amostras funcionalizadas a baixas temperaturas, o que leva a concluir que o processo de funcionalização para além de ser rentável é apropriado ao efeito pretendido

Relativamente à qualidade do material tratado com L-cisteína, não se verificou, de acordo com os resultados obtidos nos ensaios de controlo de qualidade, uma degradação significativa da sua qualidade. Em contrapartida, determinados tratamentos antimicrobianos com aplicação em materiais têxteis, proporcionam deterioração das fibras, como é o exemplo o quitosano quando aplicado à lã, conferindo-lhe um toque mais áspero.

Uma outra vantagem da utilização do tratamento anti-bacteriano com L-cisteína, é que não altera a cor dos tecidos tratados, o que permite a aplicação do tratamento, numa etapa/processo prévio ao tingimento, sem prejuízo das propriedades tintoriais. Tal facto já não é verificado quando se utilizam tratamentos à base de determinados corantes, ou até de iões de prata, em que no final do tratamento a cor dos artigos é afectada negativamente (Gao e Cranston, 2008). Assim, este tratamento surge como uma promissora alternativa aos já existentes, para a funcionalização bioactiva de materiais têxteis à base de lã.

## 5.2—Conclusão

O novo processo desenvolvido e respectivas condições necessárias para a funcionalização anti-bacteriana do material têxtil é bastante simples, de fácil execução e economicamente favorável, comparativamente com outros processos convencionais, utilizados para a obtenção do mesmo efeito, mas que são mais morosos, solicitam mais equipamento e material, e são, por vezes, de complexa execução. Para além disso, esta técnica não exige a utilização de reagentes tóxicos, o que a torna bastante mais ecológica e amiga do ambiente. De facto, a utilização de L-cisteína, sendo um aminoácido não fundamental, em áreas como a alimentação e cosmética e a sua presença natural na pele, cabelo e unhas humanas, garantem a compatibilidade e a não toxicidade quando aplicada em artigos em contacto com o corpo humano

Desta forma, com esta invenção e análise quer das condições mais favoráveis à funcionalização, quer do efeito obtido, pretende-se contribuir para a fácil, segura, ecológica e permanente funcionalização anti-bacteriana de materiais à base de lã, para potencial aplicação biomédica ou em artigos de uso pediátrico e geriátrico, objectivos esses que consideramos terem sido atingidos com bastante sucesso.

## 5.3—Perspectivas Futuras

Os resultados deste trabalho originaram um crescente interesse na sua continuação, com o objectivo de avaliar e estudar, em maior detalhe, os mecanismos envolvidos na funcionalização deste e de outros potenciais materiais de base têxtil. Assim, deixamos em aberto este tema, para futuros desenvolvimentos, embora alguns deles no âmbito disciplinar de outras áreas científicas. De facto, este novo agente biocida permitirá o estudo e a fundamentação científica, em particular, dos seguintes aspectos:

- Estudo e análise, detalhada, do mecanismo de acção que se desencadeia entre os grupos sulfídricos livres da L-cisteína e os componentes celulares constituintes das bactérias, como resposta à capacidade bacteriostática e/ou bactericida, presente nesses mesmos grupos;

- Estudo e análise do mecanismo de ligação dos aminoácidos cisteínicos às cadeias polipeptídicas, constituintes das fibras de lã, e avaliação da influência do pH da solução no mecanismo de ligação, com recurso ao ensaio da determinação de grupos carboxílicos terminais e grupos amino terminais livres;
- Incorporação do aminoácido L-cisteína em outras fibras têxteis de origem celulósica e sintética e posterior avaliação da capacidade anti-microbiana do têxtil previamente funcionalizado, passando pelo estudo do mecanismo de ligação da L-cisteína com as respectivas fibras de natureza celulósica e sintética. Neste caso, os resultados recentes dos ensaios anti-bacterianos contra *S. Aureus*, de amostras de poliamida, revelaram ser também possível a funcionalização desta fibra com L-cisteína.
- Análise da actividade antioxidante da L-cisteína, para aplicação em têxteis cosméticos.
- Avaliação da potencial actividade anti-microbiana e anti-parasitária, assim como dos respectivos mecanismos de acção, para futura funcionalização de materiais têxteis, para posteriores aplicações em clínica biomédica humana e veterinária.
- Potencial actividade anti-microbiana, assim como analisar a concentração mínima inibitória da L-cisteína, relativa a fungos e parasitas e direccionada para estirpes bacterianas exclusivas e responsáveis de doenças apuradas em clínica veterinária.

---

## Bibliografia

**Alonso D., Miquel Gimeno, Roberto Olayo, Humberto Vázquez-Torres, José D. Sepúlveda-Sánchez, Keiko Shirai, (2009).** Cross-linking chitosan into UV-irradiated cellulose fibers for the preparation of antimicrobial-finished textiles, *Carbohydrate Polymers*

**Aluigi A., C. Vineis, A. Ceria, C. Tonin, (2008).** Composite biomaterials from fibre wastes: Characterization of wool–cellulose acetate blends, *Composites*, 39: 126–132

**Borkow G., Gabbay J., (2008).** Biocidal textiles can help fight nosocomial infections, *Medical Hypotheses*, 70: 990-994

**Cazzaniga, A., Serralta, V., Davis, S., Orr, R., Eaglstein, W., and Mertz, P. M., (2002).** The Effect of an Antimicrobial Gauze Dressing Impregnated with 0.2-percent Polyhexamethylene Biguanide as a Barrier to Prevent *Pseudomonas aeruginosa* Wound Invasion, *Wound-compend. Clin. Res. Prac.*, 14:169–176

**Cegarra P. J., Valdperas J., (1981).** Dyeing of textile materials: the scientific bases and the techniques, *Textilia*

**Collier, P.J., Ramsey, A.J., Austin, P. and Gilbert, P., (1990).** Growth inhibition and biocidal activity of some isothiazolone biocides. *Journal of Applied Bacteriology* 69, 569–577

**Cottell A., S.P. Denyer, G.W. Hanlon, D. Ochs, J.-Y. Maillard, (2009).** Triclosan-tolerant bacteria: changes in susceptibility to antibiotics, *Journal of Hospital Infection* 72: 71-76

**Dimarcq J.-L., Philippe Bulet Charles Hetru Jules Hoffmann, (1998).** Cysteine-Rich Antimicrobial Peptides in Invertebrates, *Biopolymers (Peptide Science)*, 47: 465-477

**Epand R. M., Vogel H. J., (1999).** Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1462: 11-28

**Friedman M., (2001).** Application of the S-Pyridylethylation Reaction to the Elucidation of the Structures and Functions of Proteins, *Journal of Protein Chemistry*, 20:431-453

**Ganz T., (2004).** Defensins: antimicrobial peptides of vertebrates, *C. R. Biologies*, 327: 539-549

**Gao Y. e Cranston R., (2008).** Recent Advances in Antimicrobial Treatments of Textiles, *Textile Research Journal*, 78: 60-72

**Giri V.R. Dev, J. Venugopal, S. Sudha, G. Deepika, S. Ramakrishna, (2009).** Dyeing and antimicrobial characteristics of chitosan treated wool fabrics with henna dye, *Carbohydrate Polymers*, 75: 646-650

**Greene, A.K., Few, B.K. and Serafini, J.C., (1993).** A comparison of ozonation and chlorination for the disinfection of stainless steel surfaces, *Journal of Dairy Science*, 76: 3612–3620.

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

**Han S., Yang Y., (2005).** Antimicrobial activity of wool fabric treated with curcumin, *Dyes and Pigments* 64: 157-161

**Jenssen H., Pamela Hamill, and Robert E. W. Hancock, (2006).** Peptide Antimicrobial Agents, *Clinical Microbiology Reviews*, 19: 491–511

**Jones, D.S., Gorman, S.P., McCafferty, D.F. and Woolfson, A.D., (1991).** The effects of three non-antibiotic antimicrobial agents on the surface hydrophobicity of certain micro-organisms evaluated by different methods. *Journal of Applied Bacteriology* 71, 218–227

**Jones, R. D., Jampani, H. B., Newman, J. L., and Lee, A. S., Triclosan (2000).** A Review of Effectiveness and Safety in Health Care Settings, *Am. J. Infect. Contr.*, 28: 184–196

**Kangwansupamonkon W., Vichuta Lauruengtana, Suvimol Surassmo, Uracha Ruktanonchai, (2009).** Antibacterial effect of apatite-coated titanium dioxide for textiles applications, *Nanomedicine*

**No K. H., Young Park, Shin Ho Lee, Samuel P. Meyers, (2002).** Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights, *International Journal of Food Microbiology*, 74: 65– 72

**Kyung K. H., Lee Y. C., (2001).** Antimicrobial Activities of Sulfur Compounds Derived from S-alk (EN) YL-L-Cysteine Sulfoxides in Allium and Brassica, *Food Reviews International*, 17: 183-198

**Lewis D. M., (1992).** Wool Dyeing, *Society of Dyers and Colourists*

**Maillard J.-Y., (2002).** Bacterial target sites for biocide action, *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, 92: 16-27

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

**Mlynarcik, D., Denyer, S.P. and Hugo, W.B, (1981).** A study of the action of a bisquaternary ammonium salt, an amine oxide and an alkoxy phenylcarbamic acid ester on some metabolic functions in *Staphylococcus aureus*. *Microbios* 30, 27–35

**Prescott, Harley, Klein, (2005).** *Microbiology*, Mc Graw-Hill, 6ª Edição.

Protocolo Ellman's Reagent, Pierce Biotechnology, USA, 7/2004

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

**Ramachandran T., K. Rajendrakumar, R. Rajendran, (2004).** Antimicrobial Textiles—an overview, *Journal TX*, 84: 42-47

**Ren X., Hasan B. Kocer, S.D. Worley, R.M. Broughton, T.S. Huang, (2009).** Rechargeable biocidal cellulose: Synthesis and application of 3-(2,3-dihydroxypropyl)-5,5-dimethylimidazolidine-2,4-dione, *Carbohydrate Polymers* 75: 683-687

**Russell, A. D., (2004).** Bacterial Adaptation and Resistance to Antiseptics, Disinfectants and Preservatives is Not a New Phenomenon, *J. Hosp. Infect.*, 57:97–104

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

**Schmidt H, Naumann M, Muller TS, Akarsu M., (2005).** Application of spray techniques for new photocatalytic gradient coatings on plastics, *Thin Solid Films*, 502:132-7

**Seiler, D.A.L. and Russell, N.J., (1991).** Ethanol as food preservative. In *Food Preservatives* ed. Russell, N.J. and Gould, G.W. 153–171

**Shieh KJ, Li M, Lee YH, Sheu SD, Liu YT, Wang YC., 2006.** Antibacterial performance of photocatalyst thin film fabricated by defection effect in visible light, *Nanomedicine*, 2:121-6

**Silva M. Alves, (1962).** *Estudo da Acção do Ácido Sulfúrico sobre a lã*, Coimbra

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

**Sun G., Xiangjing Xu, Julie R. Bickett, Jeffrey F. Williams, (2001).** Durable and Regenerable Antibacterial Finishing of Fabrics with a New Hydantoin Derivative, *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 40, 1016-1021

**Sun Y., Sun G., (2002).** Synthesis, Characterization, and Antibacterial Activities of Novel N-Halamine Polymer Beads Prepared by Suspension Copolymerization, *Macromolecules*, 35: 8909-8912

**Tomšić B., Barbara Simončić, Boris Orel, Metka Z'erjav, Hans Schroers, Andrej Simončić, Zoran Samardžija, (2009).** Antimicrobial activity of AgCl embedded in a silica matrix on cotton fabric, *Carbohydrate Polymers* 75: 618-626

**Wanga X., Yumin Dua, Jiwen Luo, Jianhong Yang, Weiping Wanga, John F. Kennedy., (2009).** A novel biopolymer/rectorite nanocomposite with antimicrobial activity, *Carbohydrate Polymers*

**Weil J.H., (2005).** *Bioquímica Geral*, 2ª Edição

**Wilson E. A., Adams Barbara Demmig, (2007).** Antioxidant, anti-inflammatory, and antimicrobial properties of garlic and onions, *Nutrition & Food Science*, 37: 178-183